

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) PI0707796-3 A2



(22) Data de Depósito: 15/02/2007
(43) Data da Publicação: 10/05/2011
(RPI 2105)

(51) Int.CI.:
A61K 39/00
A61K 39/395

(54) Título: FORMULAÇÃO, E, MÉTODO DE TRATAMENTO

(30) Prioridade Unionista: 15/02/2006 US 60/774,101

(73) Titular(es): Imclone Systems Incorporated

(72) Inventor(es): Arvind Srivastava, Joel Goldstein

(74) Procurador(es): Momsen, Leonardos & CIA.

(86) Pedido Internacional: PCT US2007004050 de 15/02/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/095337de 23/08/2007

(57) Resumo: FORMULAÇÃO, E, MÉTODO DE TRATAMENTO
A presente invenção provê formulações e métodos para a estabilização de anticorpos. Em uma forma de realização, a invenção provê a formulação estável de anticorpos que são propensos à fragmentação não enzimática na região da articulação. Em uma outra forma de realização, a invenção provê métodos de estabilização de anticorpos compreendendo a liofilização de uma formulação aquosa de um anticorpo. As formulações podem ser liofilizadas para estabilizar os anticorpos durante o processamento e armazenamento, e então as formulações podem ser reconstituídas para administração farmacêutica. Em uma forma de realização, a presente invenção provê métodos de estabilização de anticorpos anti-VEGFR compreendendo a liofilização de uma formulação aquosa de um anticorpo anti-VEGFR. As formulações podem ser liofilizadas para estabilizar os anticorpos anti-VEGFR durante o processamento e armazenamento, e então as formulações podem ser reconstituídas para administração farmacêutica.

“FORMULAÇÃO, E, MÉTODO DE TRATAMENTO”
REFERÊNCIA CRUZADA A PEDIDOS RELACIONADOS

Este pedido reivindica prioridade para pedido US 60/774 101, depositado em 15 de fevereiro de 2006, que é incorporado aqui por referência

5 em sua totalidade.

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção é dirigida a formulações e métodos para a estabilização de anticorpos. Em uma forma de realização, a invenção provê formulações e métodos para estabilizar anticorpos que são propensos a uma

10 clivagem não enzimática na região de gancho. Mais particularmente, esta invenção refere-se a uma formulação de anticorpos que são propensos a uma clivagem não enzimática na região de gancho com um tampão e um lioprotetor. Em outra forma de realização, a invenção provê métodos e formulações para a estabilização de anticorpos anti-VEGFR.

15 FUNDAMENTOS DA INVENÇÃO

Os anticorpos em formulações líquidas são suscetíveis a uma variedade de processos químicos e físicos incluindo hidrólise, agregação, oxidação, desamidação e fragmentação na região de gancho. Esta fragmentação é um processo não enzimático que pode ser dependente de

20 temperatura e/ou pH, e tipicamente ocorre na região de gancho de cadeia pesada próxima do sítio de clivagem de papaína. Estes processos podem alterar ou eliminar a eficácia clínica de anticorpos terapêuticos por diminuição da disponibilidade de anticorpos funcionais e por redução ou eliminação de suas características de ligação de抗ígenos. A presente invenção dirige-se à

25 necessidade de formulações estáveis de anticorpos monoclonais, especialmente os que são propensos a clivagem não enzimática na região de gancho e ainda prove um método e formulação para a liofilização destes anticorpos.

BREVE SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção é dirigida a formulações e métodos para a estabilização de preparações de anticorpos. Além disso, a presente invenção é dirigida também a formulações e métodos para a estabilização de anticorpos que são propensos a clivagem não enzimática particularmente na região de 5 gancho.

Em uma forma de realização, a invenção provê uma formulação estável compreendendo um anticorpo que é propenso a clivagem não enzimática, e um tampão. A formulação também pode conter um ou mais agentes estabilizantes. Além disso, a formulação pode conter um tensoativo.

10 Em outra forma de realização, a invenção provê uma formulação que é compatível com a liofilização e pode conter um lioprotetor.

Em outra forma de realização, a invenção provê uma formulação liofilizada compreendendo um anticorpo que é propenso à clivagem não enzimática, um tampão histidina, e um açúcar lioprotetor.

15 Em outra forma de realização, a presente invenção provê métodos de estabilização de anticorpos que são propensos à clivagem não enzimática, compreendendo a formulação em um tampão histidina e um açúcar lioprotetor. Além disso, a formulação pode conter um tensoativo. As formulações podem ser liofilizadas para estabilizar os anticorpos durante o 20 processamento e armazenamento, e então as formulações podem ser reconstituídas para administração farmacêutica. Em outra forma de realização, os anticorpos reconstituídos podem ser usados em um formato de múltiplas doses.

25 Em uma forma de realização, a invenção provê uma formulação liofilizada estável compreendendo um anticorpo anti-VEGFR, um tampão, e um lioprotetor. A formulação também pode conter um ou mais agentes estabilizantes. Além disso, a formulação pode conter um tensoativo.

Em outra forma de realização, a invenção provê uma formulação liofilizada estável compreendendo um anticorpo anti-VEGFR2,

um tampão, e um lioprotetor. A formulação também pode conter um ou mais agentes estabilizantes. Além disso, a formulação pode conter um tensoativo

5 Em outra forma de realização, a invenção provê uma formulação liofilizada compreendendo um anticorpo anti-VEGFR2, um tampão histidina e um açúcar lioprotetor.

10 Em outra forma de realização, a presente invenção provê métodos de estabilização de anticorpos anti-VEGFR compreendendo liofiltrar uma formulação aquosa de um anticorpo anti-VEGFR. As formulações podem ser liofilizadas para estabilizar os anticorpos anti-VEGFR durante o processamento e o armazenamento, e então as formulações podem ser 15 reconstituídas para administração farmacêutica.

15 Em outra forma de realização, a presente invenção provê um método de inibir a atividade de VEGFR ao prover uma composição da presente invenção. A presente invenção também provê um método de inibir a via VEGF em mamíferos, particularmente humanos, compreendendo a administração de uma composição da presente invenção. A presente invenção também provê um método para tratar condições dependentes de VEGFR compreendendo a administração de uma composição da presente invenção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

20 Figura 1 mostra um cromatograma de cromatografia de exclusão de tamanho- cromatografia de líquido de desempenho elevado (SEC-HPLC) do anticorpo IMC-1121B em PBS após 3 meses de incubação a 40°C

25 Figura 2 mostra a seqüência de aminoácido para a cadeia pesada de IMC- 112 IB, e os sítios onde clivagem não enzimática ocorre.

Figura 3 mostra SDS-PAGE de IMC-1121B degradado e suas frações de exclusão de tamanho.

Figura 4 mostra um gráfico de regressão para análise DSC de IMC-1121B.

Figura 5 mostra um perfil de previsão para um estudo de agitação.

Figura 6 mostra um perfil de previsão de tempo real, estabilidade em temperatura acelerada de IMC-1121B a 40°C

5 Figura 7 mostra um perfil de previsão de real-time acelerada temperatura estabilidade de IMC-112 IB a -20°C.

Figura 8 é cromatograma de SEC-HPLCof IMC-1121B após incubação para 150 dias a 40°C e a temperatura ambiente em PBS e 10 mM tampão histidina (pH 6,0).

10 Figura 9 mostra a variação de porcentagem de monômero de IMC-1121B em PBS e 10 mM tampão histidina (pH 6,0) como uma função de tempo de incubação a 40°C e temperatura ambiente.

15 Figura 10 mostra a variação de porcentagem de agregado de IMC-1121B em PBS e 10 mM tampão histidina (pH 6,0) como uma função de tempo de incubação a 40°C e temperatura ambiente.

Figura 11 mostra a variação de porcentagem de agente degradante de IMC- 1121 B em PBS e 10 mM tampão histidina (pH 6,0) como uma função de tempo de incubação a 40°C e temperatura ambiente.

20 Figura 12 é um cromatograma de SEC-HPLC de IMC-1121B após 30 e 150 dias de incubação a RT e 40°C.

Figura 13 mostra SDS-PAGE redutor e não redutor de IMC-1121B em PBS e 10 mM tampão histidina (pH 6,0) após 150 dias de incubação a RT e 40°C.

25 Figura 14 mostra focalização isoelétrica de IMC-112 IB após 150 dias de incubação a RT e 40°C

Figura 15 mostra o ciclo de secagem por congelamento para processo de liofilização IMC-112 IB

Figura 16 mostra a porcentagem de monômeros restantes em produtos liofilizados IMC-1121B após 100 dias de incubação a 40°C e 50°C.

Figura 17 mostra a porcentagem de monômeros restantes em IMC-1121B em formulações liofilizadas e em solução como uma função de tempo de incubação a 50°C.

5 Figura 18 mostra a porcentagem de agregados para IMC- 1121 B em formulações liofilizadas e em solução como uma função de tempo de incubação a 50°C.

Figura 19 mostra a porcentagem de agentes degradantes para BVIC-1121B em formulações liofilizadas e em solução como uma função de tempo de incubação a 50°C

10 Figura 20 mostra a porcentagem de monômeros restantes para IMC-112 IB em formulações liofilizadas e em solução como uma função de tempo de incubação a 40°C.

15 Figura 21 mostra a porcentagem de agregados para IMC-1121B em formulações liofilizadas e em solução como uma função de tempo de incubação a 40°C.

Figura 22 mostra a porcentagem de agentes degradantes para IMC-112 IB em formulações liofilizadas e em solução como uma função de tempo de incubação a 40°C.

20 Figura 23 mostra a porcentagem de monômeros restantes para IMC-112 IB liofilizado e formulado em solução após incubação a 50°C.

Figura 24 mostra a porcentagem de agregado para IMC-1121B liofilizado e formulado em solução após incubação a 50°C.

Figura 25 mostra a porcentagem de agente degradante para IMC-1121B liofilizado e formulado em solução após incubação a 50°C.

25 Figura 26 mostra a porcentagem de monômeros restantes para IMC-112 IB liofilizado e formulado em solução após incubação a 40°C.

Figura 27 mostra a porcentagem de agregado para IMC-1121B incubado a 40°C em formulações em solução e secadas por congelamento.

Figura 28 mostra a porcentagem de agente degradante para

IMC-1121B liofilizado e formulado em solução após incubação a 40°C.

Figura 29 é cromatograma de SEC-HPLC de IMC- 1121 B incubado para 3 meses a 40°C em formulações em solução e secadas por congelamento.

5 Figura 30 mostra a porcentagem de monômeros restantes para IMC-112 IB liofilizado e formulado em solução após temperatura ambiente incubação.

10 Figura 31 mostra a porcentagem de agregados para IMC-1121 B liofilizado e formulado em solução após incubação em temperatura ambiente.

Figura 32 mostra a porcentagem de agentes degradantes para 1121B liofilizado e formulado em solução após incubação em temperatura ambiente.

15 Figura 33 é um cromatograma de SEC-HPLC de IMC-1121B em formulações em solução e secadas por congelamento após incubação a temperatura ambiente para 3 meses.

Figura 34 mostra SDS-PAGE redutor de IMC-1121B em formulações em solução e secadas por congelamento após incubação a temperatura ambiente, 40°C e 50°C para 3 meses.

20 Figura 35 mostra SDS-PAGE não redutor de IMC-1121B em formulações em solução e secadas por congelamento após incubação a temperatura ambiente, 40°C e 50°C durante 3 meses.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

25 A presente invenção provê formulações para a secagem por congelamento de anticorpos, incluindo fragmentos funcionais dos mesmos, que são propensos à clivagem não enzimática. As formulações podem compreender elementos adicionais como agentes estabilizantes, tensoativos, agentes redutores, veículos, conservantes, aminoácidos e agentes quelantes. A presente invenção também provê métodos de estabilizar uma composição de

anticorpo compreendendo liofilizar uma formulação aquosa de um anticorpo em na presença de um lioprotetor. As formulações podem ser liofilizadas para estabilizar os anticorpos durante processamento e armazenamento e então reconstituída antes da administração farmacêutica. Preferivelmente, o 5 anticorpo substancialmente retém sua estabilidade física e química e integridade da produção até a administração. Vários componentes de formulação podem ser apropriados para melhorar a estabilidade de acordo com a presente invenção, incluindo tampões, tensoativos, açúcares, álcoois de açúcar, derivados de açúcar e aminoácidos. Várias propriedades da 10 formulação podem ser apropriadas para melhorar a estabilidade de acordo com a presente invenção, incluindo pH e concentração de componentes da formulação.

De acordo com a presente invenção, um tampão pode ser usado para manter o pH da formulação. O tampão minimiza flutuações em pH 15 devido a variações externas. As formulações da presente invenção contém um ou mais tampões para prover as formulações em um pH apropriado, preferivelmente cerca de 5,5 a cerca de 6,5, e mais preferivelmente cerca de 6,0. Exemplares tampões incluem, mas não são limitados a tampões orgânicos, geralmente, como histidina, citrato, malato, tartarato, succinato, e 20 acetato. Em uma forma de realização, a concentração do tampão é cerca de 5 mM a cerca de 50 mM. Em forma de realização a concentração de tampão é cerca de 10 mM.

As formulações da presente invenção podem conter um ou mais agentes estabilizantes, que podem ajudar a evitar agregação e 25 degradação de anticorpos. Os agentes estabilizantes apropriados incluem, mas não são limitados a açúcares poliídricos, álcoois de açúcar, derivados de açúcar, e aminoácidos. Os agentes estabilizantes preferidos incluem, mas não são limitados a ácido aspártico, ácido lactobiônico, glicina, trealose, manitol, e sacarose.

As formulações da presente invenção podem conter um ou mais tensoativos. As soluções de anticorpo tem uma tensão superficial elevada na interface ar – água. A fim de reduzir esta tensão superficial, anticorpos tendem a se agregar na interface ar – água. Um tensoativo minimiza agregação de anticorpos na interface ar – água, assim ajudando a manter a atividade biologia do anticorpo em solução. Por exemplo, adição de 0,01% Tween 80 pode reduzir a agregação de anticorpo em solução. Quando a formulação é liofilizada, o tensoativo pode também reduzir a formação de particulados na formulação reconstituída. Em uma formulação liofilizada da presente invenção, o tensoativo pode ser adicionado a uma ou mais das formulações pré-liofilizadas, a formulação liofilizada, e a formulação reconstituída, mas preferivelmente a formulação pré-liofilizada. Por exemplo 0,005% Tween 80 pode ser adicionado à solução de anticorpo antes da liofilização. Tensoativos incluem, mas não são limitados a Tween 20, Tween 80, Pluronic F-68, e sais de bile. Em forma de realização, a concentração de tensoativos é de cerca de 0,001% a cerca de 1,0%.

O processo de liofilização pode gerar várias tensões que podem desnaturar a proteínas ou polipeptídeos. Estas tensões incluem diminuição da temperatura, formação de cristal de gelo, aumento da resistência iônica, mudanças de pH, separação de fase, remoção de envoltório de hidratação, e mudanças na concentração. Os anticorpos que são sensíveis às tensões do congelamento e/ou processo de secagem podem ser estabilizados por adição de um ou mais lioprotetores. Um lioprotetor é um composto que protege contra as tensões associadas com liofilização. Assim, os lioprotetores como uma classe incluem crioprotetores, que apenas protegem do processo de congelamento. Um ou mais lioprotetores podem ser usados para proteger das tensões associadas com a liofilização e podem ser, por exemplo, um açúcar como sacarose, ou trealose; um aminoácido como glutamato de monossódio ou histidina; a metilamina como betaina, um sal

liotrópico como sulfato de magnésio, um poliol como álcoois triídricos ou de açúcar superior, por exemplo glicerina, eritritol, glicerol, arabinol, xilitol, sorbitol, e manitol; propileno glicol; polietileno glicol; Pluronics; e combinações dos mesmos. Exemplos de lioprotetores preferidos incluem, mas 5 não são limitados a agentes estabilizantes e tensoativos como descrito acima.

A presente invenção provê formulações estabilizadas, que podem ser preparadas através do processo de liofilização. Liofilização é um processo estabilizante em que uma substância é primeiro congelada e então a quantidade de solvente é reduzida, primeiro por sublimação (o processo de 10 secagem primário) e então dessorção (processo de secagem secundário) em valores que não irão mais suportar a atividade biológica ou as reações químicas. Em uma formulação liofilizada, as reações de hidrólise, desamidação, oxidação e fragmentação associadas com soluções podem ser evitadas ou retardadas de modo significante. A formulação liofilizada pode 15 também evitar dano devido a flutuações de temperatura a curto prazo durante a expedição e permitir armazenamento em temperatura ambiente. As formulações da presente invenção também podem ser secadas por outros métodos conhecidos na técnica como secagem por pulverização e secagem 20 por borbulhamento. Salvo especificado em contrário, as formulações da presente invenção são descritas em termos de suas concentrações de componente como medido na formulação antes da liofilização.

Em uma forma de realização, a presente invenção provê métodos e formulações para estabilizar anticorpos que são propensos a degradação não enzimática, que pode ocorrer na região de gancho. Os fatores 25 que podem predispor um anticorpo a clivagem não enzimática incluem seqüência de aminoácidos, conformação e processamento pós-translacional. A determinação quem um anticorpo sofre clivagem não enzimática pode ser obtida por incubação de anticorpo em uma solução aquosa. Tipicamente, a incubação é realizada em temperaturas elevadas para encurtar a duração do

estudo. Por exemplo, incubação durante 3 meses a 40°C ou 50°C. Após a incubação, os produtos de degradação podem ser analisados usando cromatografia de exclusão de tamanho - cromatografia de líquido de desempenho elevado (SEC-HPLC).

5 Várias técnicas analíticas conhecidas na técnica podem medir a estabilidade do anticorpo de uma formulação liofilizada reconstituída. Estas técnicas incluem, por exemplo, determinar (i) estabilidade térmica usando calorimetria de varredura diferencial (DSC) para determinar a temperatura de fusão média (Tm); (ii) estabilidade mecânica usando agitação controlada a 10 temperatura ambiente; (iii) estabilidade em temperatura acelerada isotérmica em tempo real a temperaturas de cerca de -20°C, cerca de 4°C, temperatura ambiente (cerca de 23°C-27°C), cerca de 40°C, e cerca de 50°C; (iv) turvações da solução por monitoração da absorbância a cerca de 350 nm e (v) 15 a quantidade de monômero, agregados e agentes degradantes usando SEC-HPLC. Estabilidade pode ser medida em uma temperatura selecionada durante um período de tempo selecionado.

20 Em uma forma de realização, a formulação liofilizada provê uma concentração elevada do anticorpo na reconstituição. Em uma outra forma de realização, a formulação liofilizada estável é reconstituível com um líquido para formar uma solução com uma concentração de anticorpo de cerca 25 de 1-10 vezes maior do que a concentração de anticorpo da formulação antes da liofilização. Por exemplo, em uma forma de realização, a formulação liofilizada é reconstituída com 1 mL de água ou menos para obter uma formulação reconstituída isenta de partículas com uma concentração de anticorpo de cerca de 50 mg/mL a cerca de 200 mg/mL.

Os anticorpos de ocorrência natural tipicamente tem duas cadeias pesadas idênticas e duas cadeias leves idênticas, com cada cadeia leve covalentemente ligadas a uma cadeia pesada por uma ligação dissulfeto intercadeia. As ligações dissulfeto múltiplas ainda ligam as duas cadeias

pesadas uma na outra. As cadeias individuais podem dobrar em domínios tendo tamanhos similares (110-125 aminoácidos) e estruturas, mas diferentes funções. A cadeia leve pode compreender um domínio variável (V_L) e/ou um domínio constante (C_L). A cadeia pesada também pode compreender um domínio variável (V_H) e/ou, dependendo da classe ou isotipo de anticorpo, três ou quatro domínios constantes (C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} e C_{H4}). Em humanos, os isotipos são IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM, com IgA e IgG ainda subdivididos em subclasses ou subtipos (IgA₁₋₂ e IgG₁₋₄).

Geralmente, os domínios variáveis mostram uma considerável variabilidade de seqüência de aminoácidos de um anticorpo para o próximo, particularmente no local do sítio de ligação a antígeno. Três regiões, chamadas regiões hipervariável ou de determinação da complementaridade (CDRs), são encontradas em cada um de V_L e V_H , que são suportados em regiões menos variáveis chamadas regiões variáveis de armação.

A porção de um anticorpo consistindo de domínios V_L e V_H é designada Fv (fragmento variável) e constitui o sítio de ligação a antígeno. Fv de cadeia única (scFv) é um fragmento de anticorpo contendo um domínio V_L e um domínio V_H em uma cadeia de polipeptídeo, em que o término N de um domínio e o término C de outro domínio são unidos por um ligador flexível (ver, por exemplo, Pat. U.S. No. 4.946.778 (Ladner et al.); WO 88/09344, (Huston et al.). WO 92/01047 (McCafferty et al.) descreve a exibição dos fragmentos de scFv sobre a superfície de pacotes de exibição genética recombinante solúvel, como bacteriófagos.

Anticorpos de cadeia única faltam alguns ou todos os domínios constantes de anticorpos completos, dos quais eles são derivados. Assim, eles podem superar alguns dos problemas associados com o uso de anticorpos complexo. Por exemplo, anticorpos de cadeia única tendem a ser livres de algumas interações indesejadas entre regiões constantes de cadeia pesada e outras moléculas biológicas. Adicionalmente, anticorpos de cadeia única são

consideravelmente menores do que os anticorpos completos e podem ter uma maior permeabilidade do que anticorpos completos deixando os anticorpos de cadeia única localizar e ligar para o sítio alvo de ligação a抗ígenos mais eficientemente. Além disso, o tamanho relativamente pequeno de anticorpos de cadeia única torna os mesmos menos prováveis de provocar uma resposta imune indesejada em um recipiente do que os anticorpos completos.

Os anticorpos de cadeia única múltiplos, cada cadeia única tendo um domínio V_H e um V_L covalentemente ligado por um primeiro ligador de peptídeo, pode ser covalentemente ligado a pelo menos um ou mais ligadores de peptídeo para formar um anticorpo multivalente de cadeia única, que pode ser monoespecífico ou multiespecífico. Cada cadeia de um anticorpo de cadeia única multivalente inclui um fragmento variável de cadeia leve e um fragmento variável de cadeia pesada, e é ligado por um ligador de peptídeo a pelo menos uma outra cadeia. O ligador de peptídeo é composto de pelo menos quinze resíduos de aminoácido. O número máximo de resíduos de aminoácido é de cerca de uma centena.

Dois anticorpos de cadeia única podem ser combinados para formar um diacorpo, também conhecido como um dímero bivalente. Diacorpos tem duas cadeias e dois sítios de ligação, e pode ser monoespecífico ou biespecífico. Cada cadeia de diacorpo inclui um domínio V_H conectado a um domínio V_L . Os domínios são conectados com ligadores que são curtos o suficiente para evitar os pares entre domínios da mesma cadeia, assim dirigindo a formação de pares entre domínios complementares em diferentes cadeias para criar novamente os dois sítios de ligação a抗ígenos.

Três anticorpos de cadeia única podem ser combinados para formar triacorpos, também conhecidos como trímeros trivalentes. Triacorpos são construídos com o término de aminoácido de um domínio V_L ou V_H diretamente fundido ao término carboxila de um domínio V_L ou V_H , isto é,

sem qualquer seqüência de ligador. O triacorpo têm três cabeças de Fv com os polipeptídeos dispostos em um modo cílico, cabeça –a- causa. Uma possível conformação de triacorpo é planar com os três sítios de ligação localizados em um plano em um ângulo de 120 graus um do outro. Triacorpos podem ser 5 monoespecíficos, biespecíficos ou triespecíficos.

Fab (Fragmento, ligação a antígeno) refere-se aos fragmentos dos anticorpos consistindo de domínios V_L C_L V_H e C_HI . Os gerados após a digestão com papaína simplesmente são referidos como Fab e não retém a região de gancho de cadeia pesada. Após digestão com pepsina, vários Fabs 10 retendo o gancho de cadeia pesada são gerados. Os fragmentos divalentes com as ligações de dissulfeto intercadeias intactas são referidos como $F(ab')_2$, enquanto um Fab' monovalente resulta quando as ligações dissulfeto não são retidas. Os fragmentos $F(ab')_2$ tem uma maior avidez para antígeno que fragmentos Fab monovalentes.

15 Fc (cristalização de fragmento) é a designação para a porção ou fragmento de anticorpo que compreende domínios constantes de pesada cadeia formados em pares. Em um anticorpo IgG, por exemplo, o Fc compreende domínios C_H2 e C_H3 . O Fc de anticorpo IgA ou IgM ainda compreende um domínio C_H4 . O Fc é associado com receptor de ligação Fc, 20 ativação de citotoxicidade mediada por complemento, e citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC). para anticorpos como IgA e IgM, que são complexos de proteínas de tipo IgG múltiplas, formação do complexo requer domínios constantes de Fc.

Finalmente, a região de gancho separa as porções Fab e Fc dos 25 anticorpo, provendo mobilidade de Fabs relativos um a cada outro e relativos a Fc, assim como incluindo ligações múltiplas dissulfeto para ligação covalente das duas cadeias pesadas.

Assim, anticorpos da invenção incluem, mas não são limitados a, anticorpos de ocorrência natural, fragmentos bivalentes como $(Fab')_2$

fragmentos monovalentes como Fab, anticorpos de cadeia única, Fv de cadeia única (scFv), anticorpos de domínio único, anticorpos multivalentes de cadeia única, diacorpos, triacorpos, e semelhantes que ligam especificamente com抗ígenos.

5 Anticorpos, ou fragmentos dos mesmos, da presente invenção, por exemplo, podem ser monoespecíficos ou biespecíficos. Anticorpos biespecíficos (BsAbs) são anticorpos que tem diferentes especificidades ou sítios de ligação a抗ígeno. Onde um anticorpo tem mais do que uma especificidade, os epítopos reconhecidos pode estar associados com um 10抗ígeno único ou com mais do que um抗ígeno. Assim, a presente invenção provê anticorpos biespecíficos, ou fragmentos dos mesmos, que ligam a dois diferentes抗ígenos.

Especificidade de anticorpos, ou fragmentos dos mesmos, pode ser determinada com base em afinidade/avidez. Afinidade, representada 15 pela constante de equilíbrio para a dissociação de um抗ígeno com um anticorpo (K_d), mede a resistência da ligação entre um determinante抗ígenico e um sítio de ligação a anticorpo. Avidez é a medida da resistência da ligação entre um anticorpo com seu抗ígeno. Avidez é relacionada com tanto a afinidade entre um epítopo com sua ligação ao sítio do抗ígeno no 20 anticorpo, e a valência dos anticorpos, que refere-se ao número de sítios de ligação a抗ígeno de um epítopo particular. Anticorpos tipicamente ligam com uma constante de dissociação (K_f) de 10^{-5} to 10^{-11} litros/mol. Qualquer K_f menor do que 10^{-4} litros/mol é geralmente considerado para indicar uma ligação não específico. Quanto menor o índice de K_d , mais forte a resistência 25 da ligação entre um determinante抗ígenico e o sítio de ligação de anticorpo.

Como usado aqui, "anticorpos" e "fragmentos de anticorpo" incluem modificações que retém a especificidade para um抗ígeno específico. Estas modificações incluem, mas não são limitadas a, conjugação a uma molécula de efetor como um agente quimioterapêutico (por exemplo,

5 cisplatina, taxol, doxorubicina) ou citotoxina (por exemplo, um agente quimioterapêutico orgânico de proteína, ou um não proteína). Os anticorpos podem ser modificado por conjugação a porções repórter detectáveis. Também estão incluídos os anticorpos com alterações que afetam as características de não ligação como meia-vida (por exemplo, peguilação).

10 Os agentes de proteínas e não proteína podem ser conjugados aos anticorpos por métodos que são conhecidos na técnica. Os métodos de conjugação incluem ligação direta, ligação via ligadores covalentemente fixados, e membros de pares de ligação específica (por exemplo, avidina-biotina). Estes métodos incluem, por exemplo, os descritos por Greenfield et al., Cancer Research 50, 6600-6607 (1990) para a conjugação de doxorubicina e os descritos por Arnon et al., Adv. Exp. Med. Biol. 303, 79-90 (1991) e por Kiseleva et al., Mol. Biol. (USSR)25, 508-514 (1991) para a conjugação de compostos platina.

15 Anticorpos da presente invenção ainda incluem os em que as características de ligação foram melhoradas por uma mutação direta, métodos de maturação por afinidade, exibição de fagos ou embaralhamento de cadeias. Afinidade e especificidade pode ser modificadas ou melhoradas por mutação de CDRs e triagem para sítios de ligação a antígeno tendo as desejadas características (ver, por exemplo, Yang et al., J. Mol. Biol., 254: 392-403 (1995)). CDRs são mudados em uma variedade de modo. Um modo é tornar aleatórios resíduos individuais ou combinações de resíduos de modo que em uma população de sítios de ligação a antígeno de outra forma idênticos, todos os vinte aminoácidos são encontrados em posições particulares.

20 Alternativamente, mutações são induzidas em uma faixa de resíduos de CDR por métodos PCR passíveis de erro, (ver, por exemplo, Hawkins et al., J. Mol. Biol., 226: 889- 896 (1992)). Por exemplo, vetores de exibição de fagos contendo genes de região variável cadeia pesada e leve podem ser propagados em cepas *mutator* de *E. coli* (ver, por exemplo, Low et al., J. Mol. Biol., 250:

359-368 (1996)). Estes métodos de mutagênese são ilustrativos de muitos métodos conhecidos do versado na técnica.

Cada domínio dos anticorpos desta invenção pode ser um domínio de imunoglobulina completo (por exemplo, um domínio constante ou variável de cadeia pesada ou leve), ou pode ser um equivalente funcional ou um mutante ou derivado de um domínio de ocorrência natural, ou um domínio sintético construído, por exemplo, in vitro usando uma técnica como um descrito em WO 93/11236 (Griffiths et al.). Por exemplo, é possível unir juntos os domínios correspondendo a domínios variáveis de anticorpo, em que estão faltando pelo menos um aminoácido. O aspecto caracterizante importante dos anticorpos é a presença de um sítio de ligação a antígeno. O termos fragmento variável de cadeia pesada e leve não deve ser construído para excluir as variantes que não tem um efeito material sobre a especificidade.

Anticorpos e fragmentos de anticorpos da presente invenção podem ser obtidos, por exemplo, de anticorpos ocorrência natural, ou de bibliotecas de exibição de fagos Fab ou scFv. Deve-se entender que, para fazer um anticorpo de domínio único a partir de um anticorpo compreendendo um domínio V_H e a V_L , algumas substituições de aminoácido fora dos CDRs podem ser desejadas para melhorar a ligação, expressão ou solubilidade. Por exemplo, pode ser desejável modificar os resíduos de aminoácido que seriam de outra forma colocados na interface V_H - V_L .

Além disso, anticorpos e fragmentos de anticorpo da invenção podem ser obtidos por tecnologia de hibridoma padrão (Harlow & Lane, ed., Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 211-213 (1998), que é incorporado por referência aqui) usando camundongos transgênicos (por exemplo, camundongos KM de Medarex, San Jose, Calif.) que produz cadeias leves kappa e cadeias pesadas gama de imunoglobulina gama humana. Em formas de realização preferidas, uma porção substancial do genoma

produzindo anticorpo humano é inserida no genoma do camundongo e é tornada deficiente na produção de anticorpos de murinos endógenos. Estes camundongos podem ser imunizados subcutaneamente (s.c.) com parte ou toda a molécula alvo em adjuvante completo de Freund.

5 A presente invenção também provê um método de tratamento compreendendo a administração de uma formulação reconstituída. A formulações reconstituídas são preparadas por reconstituição de uma formulação liofilizada da presente invenção, por exemplo com 1 mL água. O tempo de reconstituição é preferivelmente menor do que 1 minuto. A
10 formulação reconstituída concentrada permite uma flexibilidade na administração. Por exemplo, a formulação reconstituída pode ser administrada em uma forma diluída intravenosamente, ou pode ser administrada em uma forma mais concentrada por injeção. A formulação reconstituída concentrada da presente invenção pode ser diluída em uma concentração que é adequada
15 sob medida ao indivíduo em particular e/ou a via particular de administração. Assim, a presente invenção provê métodos de tratamento compreendendo a administração de uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo ao mamífero, particularmente um humano, em necessidade do mesmo. O termo administração como usado aqui significa liberar a composição de anticorpo da
20 presente invenção a um mamífero por qualquer método que pode alcançar o resultado procurado. A formulação reconstituída pode ser administrada, por exemplo, intravenosamente ou intramuscularmente. Em uma forma de realização, uma formulação reconstituída concentrada é administrada por injeção.

25 Anticorpos da presente invenção são preferivelmente humanos. Em um forma de realização a composição da presente invenção pode ser usada para tratar doenças neoplásicas, incluindo tumores sólidos e não sólidos e para tratamento de distúrbios hiperproliferativos.

 Uma quantidade terapeuticamente eficaz significa uma

quantidade de anticorpo da presente invenção que, quando administrada a um mamífero, é eficaz para produzir o efeito terapêutico desejado, como redução ou neutralização da atividade de VEGFR, inibição de crescimento de tumor, ou tratamento de uma doença hiperproliferativa não cancerosa. Administração 5 dos anticorpos como descrito acima pode ser combinada com administração de outros anticorpos ou qualquer agente de tratamento convencional, como um agente anti-neoplásico.

Em um forma de realização da invenção, a composição pode ser administrada em combinação com um ou mais agentes anti-neoplásicos. 10 Qualquer agente anti-neoplásico apropriado pode ser usado, como um agente quimioterapêutico, radiação ou combinações dos mesmos. Os agentes anti-neoplásicos podem ser um agente alquilante ou um anti-metabólito. Exemplos de agentes alquilantes incluem, mas não são limitados a, cisplatina, ciclofosfamida, melfalan, e dacarbazina. Exemplos de anti-metabólitos 15 incluem, mas não são limitados a, doxorubicina, daunorubicina, paclitaxel, irinotecan (CPT-11), e topotecan. Quando o agente anti-neoplásico é radiação, a fonte da radiação pode ser ou externa (terapia externa de radiação de feixes - EBRT) ou interna (braquiterapia - BT) ao paciente sendo tratado. A dose de agente anti-neoplásico administrada depende de numerosos fatores, incluindo, 20 por exemplo, o tipo de agente, o tipo e severidade de tumor sendo tratado e a via de administração do agente. Deve ser enfatizado, no entanto, que a presente invenção não é limitada a qualquer dose particular.

Anticorpos da presente invenção podem ser, mas não são limitados a, anticorpos para VEGFR, IGF-IR, EGFR e PDGFR.

25 Em um forma de realização, os anticorpos, ou fragmentos dos mesmos, da presente invenção são específicos para VEGFR. Em outra forma de realização, a presente invenção provê anticorpos biespecíficos, ou fragmentos dos mesmos, que ligam a dois diferentes抗ígenos, com pelo menos uma especificidade para VEGFR. VEGFR refere-se à família de

receptores de VEGF humanos, incluindo VEGFR-1 (FLTI), VEGFR-2 (KDR), VEGFR-3 (FLT4).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é um mediador chave de angiogênese. Em humanos saudáveis, VEGF promove angiogênese no embrião em desenvolvimento, em cicatrização de feridas, e durante os ciclos reprodutivos femininos. No entanto, VEGF media angiogênese em tumores quando é regulado de modo positivo por expressão do oncogene, fatores do crescimento, e hipoxia. Angiogênese é essencial para crescimento do tumor além de um determinado tamanho pela difusão limitada de nutrientes e oxigênio.

Assim, em uma forma de realização, o anticorpo anti-VEGFR liga VEGFR e bloqueia a ligação de um ligando, como VEGF. Este bloqueio pode resultar em inibição de crescimento de tumor, que inclui a inibição de invasão de tumor, metástase, reparo celular, e angiogênese, por interferência com os efeitos da ativação de VEGFR.

Em uma forma de realização, o anticorpo é um anticorpo anti-VEGFR-2 (KDR), IMC-1 121B (IgG1), que é descrito em WO 03/07840 (PCT/US03/06459). A seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos de V_H para IMC-1121B é representada em SEQ ID NOS 1 e 2, respectivamente. A seqüência de nucleotídeos e de aminoácidos de V_L para IMC- 112 IB é representada em SEQ ID NOS 3 e 4, respectivamente.

Equivalentes dos anticorpos, ou fragmentos dos mesmos, da presente invenção também incluem polipeptídeos com seqüência de aminoácidos substancialmente iguais que as seqüências de aminoácidos de regiões variáveis ou hipervariáveis de anticorpo anti- VEGFR de comprimento completo provido aqui. Substancialmente a mesma seqüência de aminoácidos é definida aqui como uma seqüência com pelo menos cerca de 70%, preferivelmente pelo menos cerca de 80%, e mais preferivelmente pelo menos cerca de 90% homologia, como determinado por método de busca

FASTA de acordo com Pearson e Lipman (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444-8 (1988)).

EXEMPLOS

Os seguintes exemplos ainda ilustram a invenção, mas não devem ser construídos para limitar o escopo da invenção de qualquer modo. As descrições detalhadas de métodos convencionais, como os empregados na análise de proteínas podem ser obtidas de várias publicações como Current Protocols in Immunology (publicado por John Wiley & Sons). Todas as referências mencionadas aqui são incorporadas em sua totalidade.

Exemplo 1. Fragmentação de anticorpo anti-VEGFR-2, IMC-1121B.

IMC-1121B a 5 mg/mL em solução salina tamponada com fosfato (PBS) foi incubado a 40°C durante 3 meses. Após esta incubação, SEC-HPLC e sequenciamento N-terminal foram usados para analisar os produtos de degradação. O cromatograma de SEC-HPLC de IMC-112 IB degradado em PBS é mostrado em Figura 1. O produto degradado tem dois picos de agente degradante (frações 2 e 3) além de picos de agregado (fração 1) e monômero. As frações foram coletadas usando um coletor de fração para análise da seqüência N-terminal. A seqüência de cDNA para cadeia pesada de IMC-112 IB é mostrada em Figura 2. Seqüência de sinal, regiões variáveis e regiões constantes são mostradas com texto sublinhado, sublinhado duplo, e simples, respectivamente. A análise do sequenciamento N-terminal da amostra degradada e frações 2 e 3 mostrou dois sítios de fragmentação na cadeia pesada (texto marcado com verde na figura 2). O sítio no 156º resíduo do N-término resulta em dois fragmentos de cadeia pesada detectados em SDS-PAGE reduzido (Figura 3) como bandas de cerca de 40 KD e cerca de 15 KD. O outro sítio de fragmentação na região de gancho no 220º resíduo do N-término resulta em bandas de cerca de 33 KD e cerca de 27 KD em SDS-PAGE reduzido (Figura 3).

Exemplo 2. Otimização de Formulação de Tampão

A formulação secada por congelamento para IMC-1121B foi desenvolvida em dois estágios. No primeiro estágio, o tampão solvente foi otimizado usando um projeto de abordagem de experimento (DOE) com modelagem fracional fatorial, como descrito na Tabela 1. Os fatores triados neste processo de otimização foram tampão, pH, sal, aminoácidos, açúcares tensoativos, e derivados de açúcar. Otimização de solvente foi realizada a uma concentração de 112 IB de 5 mg/mL. A agitação controlada a 300 rpm a temperatura ambiente foi usada para testar estabilidade mecânica. A estabilidade térmica foi testada usando DSC e temperaturas aceleradas. As previsões de DOE foram confirmadas usando metodologia de um fator a cada vez. A análise de regressão linear foi usada para determinar a significância dos resultados.

Tabela 1. Projeto de matriz de experimento (DOE)

Tipo de Tampão	pH	NaCl (%)	Ácido aspártico	ácido lacto-biônico (%)	Tween 80 (%)	Glicina (%)	Arginina (%)	Manitol (%)	Sacarose (%)	Treacleose (%)
Fosfato	8	150	0,5	0,5	0,5	2	2	2	2	2
Fosfato	6	0	0	0,5	0	2	2	0	2	0
Fosfato	6	0	0	0	0,5	0	0	2	0	2
Fosfato	8	150	0,5	0	0	0	0	0	0	0
PBS	7,2	145	0	0	0	0	0	0	0	0
Citrato	6	150	0	0	0,5	2	2	2	0	0
Citrato	4	0	0,5	0	0	2	2	0	0	2
Citrato	0	0	0,5	0,5	0,5	0	0	2	2	2
Citrato	6	150	0	0,5	0	0	0	0	2	2
Citrato	5	75	0,25	0,25	0,25	1	1	1	1	1
Acetato	6	0	0	0,5	0,5	2	0	0	0	0
Acetato	5	75	0,25	0,25	0,25	1	1	1	1	1
Acetato	4	150	0,5	0,5	0	2	0	2	0	2
Acetato	6	0	0	0	0	0	2	2	2	2
Acetato	4	150	0,5	0	0,5	0	2	0	2	0
Histidina	7	75	0,25	0,25	0,25	1	1	1	1	1
Histidina	8	0	0,5	0	0,5	2	0	0	2	2
Histidina	5	150	0	0,5	0,5	0	2	0	0	2
Histidina	6	150	0	0	0	2	0	2	2	0
Histidina	8	0	0,5	0,5	0	0	2	2	0	0
Fosfato	7	75	0,25	0,25	0,25	1	1	1	1	1

Estudo de calorimetria de varredura diferencial (DSC): A temperatura de fusão, ou transição, (Tm) foi medida usando um MicroCal VP-DSC. A concentração da proteína foi fixada a 5 mg/mL e a rampa de

subida de temperatura foi de 5°C a 95°C em uma taxa de varredura de 1,5°C/min. As curvas de fusão térmica de IMC-1121 B em várias formulações (Tabela 1) foram coletadas. As temperaturas de fusão correspondendo ao pico de transição principal (50% das moléculas são desnaturadas) foram configuradas em um modelo de regressão linear para estimar o efeito de variáveis testadas em Tm. O modelo foi estatisticamente significante com um p=0,0006. Os fatores significantes (p<0,05) foram pH e tipo de tampão. O gráfico de regressão para a variação Tm com tipo de tampão e pH é mostrado em Figura 4. O pH ótimo foi de aproximadamente 6,0 para os tampões histidina, citrato e acetato, que foram superiores a tampão fosfato a pH 6,0. Outras variáveis não tem um efeito estatisticamente significante em Tm.

Estudo de agitação: Soluções de anticorpo foram agitadas em um agitador de plataforma a 300 rpm a temperatura ambiente. Cinco mL de IMC-1121B a 5 mg/mL em um frasco de vidro de 20 mL foram agitados em várias formulações (Tabela 1) durante até 84 horas. Turvação da solução, porcentagem de monômero, porcentagem de agregado, e porcentagem de agente degradante foram determinados como a seguir. Turvação das soluções foi medida por absorbância a 350 nm usando espectrofotômetro biospec Shimatzu 1601. Porcentagem de monômero, porcentagem de agregado, e porcentagem de agente degradante foram medidas usando SEC-HPLC realizado em um Agilent 1100 Série LC usando coluna Tosoh Biosep TSK 3000 com fosfato de sódio 10 mM, 0,5M CsCl, a pH 7,0 como a fase móvel. O efeito de variáveis testadas em turvação, porcentagens de monômero, agregado e agente degradante foram estimadas por configuração de um modelo de regressão linear usando programa JMP (SAS Institute, NC). O índice p para gráfico real por previsto <0,002. Os efeitos das variáveis significantes pH, Tween 80, NaCl e tempo em turvação, porcentagens de monômero, agregado e agente degradante são mostrados em Figura 5.

Estabilidade em temperatura acelerada e tempo real, a 40°C: O

DV1C-1121B a 5 mg/mL em várias formulações (Tabela 1) foi incubado a 40°C durante até 14 dias. A turvação da solução, porcentagens de monômero, agregado e agente degradante foram determinados como descrito acima. O efeito de variáveis testadas em turvação, porcentagens de monômero, agregado e agente degradante foi estimado por configuração de um modelo de regressão linear usando software JMP. O índice p para Gráficos real por previsto foram <0,001. O efeito de variáveis significantes em turvação, porcentagens de monômero, agregado e agente degradante são mostrados em Figura 6. O tampão ótimo é histidina a pH 6,0. Sal reduziu o monômero e aumentou a agregação. Mas não afetou a degradação. Glicina não teve efeito em monômero, agregado ou agente degradante.

Estabilidade em temperatura de congelamento em tempo real a -20°C: O anticorpo IMC- 112 IB a 5 mg/mL em várias formulações (Tabela 1) foi incubado a -20°C durante até 16 dias. A turvação da solução, porcentagens de monômero, agregado e agente degradante foram estimados como descrito acima. O efeito de variáveis testadas em turvação, porcentagens de monômero, agregado e agente degradante foram determinados por configuração em modelo de regressão linear usando software JMP. O índice p para gráfico real por previsto foi <0,001. O efeito de variáveis significantes em turvação, porcentagens de monômero, agregado e agente degradante são mostrados em Figura 7. O pH ótimo foi 6,0. Ácido aspártico aumentou monômero e diminuiu agregação com o efeito negligenciável na degradação. NaCl e glicina teve um efeito negligenciável em turvação, monômero, agregado e agente degradante.

Exemplo 3. Comparação de Estabilidade de IMC-1121B em Formulações de PBS e Tampão histidina 10 mM (pH 6,0).

Os estudos de triagem de DOE previram que o anticorpo IMC-1121B tinha uma estabilidade显著mente melhor em uma formulação de 10 mM tampão histidina (pH 6,0) do que em PBS. Neste estudo, a

estabilidade de IMC-1121B a concentração de 5 mg/mL em histidina 10 mM pH 6,0 e PBS foi examinada por várias técnicas para confirmar a previsão de DOE.

5 Estudo de calorimetria de varredura diferencial (DSC): A estabilidade térmica de formulações IMC-112 IB em PBS e 10 mM tampão histidina (pH 6,0) foi examinada de acordo com o procedimento descrito em Métodos. As temperaturas de fusão para a transição principal foram 70,0 e 76,6°C para IMC-1121B em PBS e 10 mM tampão histidina (pH 6,0), respectivamente.

10 Estabilidade em temperatura acelerada em tempo real a 40°C e temperatura ambiente: O IMC-1121B a 5 mg/mL foi incubado a 40°C e temperatura ambiente (RT) durante até 150 dias em formulações de PBS e 10 mM tampão histidina (pH 6,0). Após incubação, as amostras foram analisadas por SEC-HPLC, IEC-HPLC, SDS-PAGE e IEF como descrito abaixo.

15 Análise de SEC-HPLC: A análise de SEC-HPLC de IMC-1121B em PBS ou 10 mM tampão histidina (pH 6,0) após 150 dias de incubação a 40°C e temperatura ambiente foi realizada de acordo com o procedimento descrito acima. Os cromatogramas de HPLC são mostrados em Figura 8. A porcentagem total de agregado em amostras de controle, RT e 20 40°C foi 0,90, 1,49 e 3,90 para PBS e 0,80, 0,82 e 0,75 para 10 mM tampão histidina (pH 6,0), respectivamente. A porcentagem total de agente degradante em amostras de controle, RT e 40°C foi 1,32, 2,56 e 12,54 respectivamente, para formulações de PBS e 1,23, 2,09 e 9,00 para 10 mM tampão histidina pH 6,0, respectivamente. As mudanças em porcentagem de 25 monômero, porcentagem de agregado, e porcentagem de agente degradante como uma função de tempo de incubações são mostradas em Figuras 9, 10 e 11, respectivamente. Porcentagem de monômero diminuiu e porcentagem de agregado e porcentagem de agente degradante aumentaram em uma taxa mais rápida em formulação PBS do que em histidina 10 mM (pH 6,0). O 10 mM

tampão histidina (pH 6,0) provê um meio superior para manutenção do anticorpo IMC-1121B.

Análise IEC-HPLC: Cromatografia de troca iônica de IMC-1121B após 30 e 150 dias de incubação a 40°C e temperatura ambiente foi realizada em um Agilent 1100 Série LC usando uma coluna analítica Dionex ProPac WCX-10. As amostras foram eluídas com um gradiente linear de fosfato 10 mM (pH 7,0), 20 mM NaCl a Fosfato 10 mM (pH 7,0), 100 mM NaCl em 32 minutos. Os cromatogramas IEC-HPLC são mostrados em Figura 12. Incubação a temperatura ambiente e 40°C, levou os picos a se deslocarem para um tempo de retenção menor (isto é para pH ácido) em ambas as formulações. No entanto, os deslocamentos foram consideravelmente maiores na formulação PBS do que em formulação de 10 mM tampão histidina (pH 6,0).

Análise SDS-PAGE: O anticorpo IMC-1121 B (a 5 mg/mL) em PBS ou 10 mM tampão histidina (pH 6,0) foi incubado a temperatura ambiente ou 40°C durante 150 dias antes da análise por SDS-PAGE redutor e não redutor (4-20% gel gradiente tris-glicina) de acordo com os protocolos padrões. As amostras incubadas em PBS tinham maiores quantidades de produtos de degradação do que as amostras incubadas em histidina 10 mM (pH 6,0) como medido pela intensidade das bandas (Figura 13).

Análise de focalização isoelétrica (IEF): IMC-1121B a 5 mg/mL em formulações PBS e histidina 10 mM (pH 6,0) após 150 dias de incubação a RT e 40°C foi analisado por IEF (faixa de pH 6,0-10,5). A análise de focalização isoelétrica foi realizada em placas IsoGel® Agarose IEF com uma faixa de pH de 6,0 a 10,5. As bandas resultantes migraram para o pH ácido em ambas as formulações PBS e histidina. No entanto, o deslocamento foi maior para a formulação PBS do que para formulação de histidina 10 mM (pH 6,0) (Figura 14).

Exemplo 4. Triagem da formulação de secagem por congelamento.

No segundo estágio de otimização, agentes de volume e crio-e
lio-protetores foram otimizados a uma concentração de anticorpo fixa de 20
mg/mL em 10 mM tampão histidina (pH 6,0). Os aditivos testados foram
manitol, glicina, sacarose e trealose como mostrados no projeto da matriz do
5 experimento (Tabela 2). Como controles, anticorpo IMC-112 IB na
concentração de 5 mg/mL em formulações de solução (sem secagem por
congelamento) com tampão PBS (pH 6,0) ou 10 mM tampão histidina (pH
6,0) foi analisado.

Tabela 2: Matriz DOE para triagem de formulação secada por congelamento

IMC-1121B (mg/mL)	Sacarose (%)	Trealose (%)	Glicina (%)	Manitol (%)
20	4	0	0	0
20	0	4	0	0
20	0	0	4	0
20	0	0	0	4
20	2	0	2	0
20	2	0	0	2
20	0	2	2	0
20	0	20	0	2

10 Processo de secagem por congelamento: Os produtos foram
liofilizados usando um secador por congelamento Liostar II. A bandeja de
liofilização foi carregada com amostra a temperatura ambiente. Produtos
foram embebidos a -50°C durante 2 horas. A secagem primária foi realizada a
-30°C durante 10 horas seguido por uma secagem secundária a 20°C durante
15 mais 10 horas. As taxas de resfriamento e de aquecimento foram 0,5°C/min.
A pressão na câmara durante a secagem primária e secundária foi 50 mT.
Uma vez completada a liofilização, a câmara de amostra foi retro-carregada
com N₂ e tampada. O processo de liofilização foi completado em cerca de 24
horas. A temperatura fixada na prateleira e temperatura dos produtos como
uma função de tempo de ciclo é mostrada em Figura 15. O processo de
20 liofilização foi considerado completado quando a temperatura do produto
alcançou (ou cruzou) a temperatura fixada na prateleira.

Estabilidade em temperatura acelerada: As formulações

liofilizadas de anticorpos foram incubadas durante 100 dias ou a 40°C ou 50°C. Após o período de incubação, produtos foram reconstituídos em 5 mg/mL com 10 mM tampão histidina (pH 6,0). O tempo de reconstituição foi menor do que 1 min. A porcentagem de monômeros permanecendo após 5 incubação é mostrada na Figura 16. As formulações secadas por congelamento com 4% sacarose ou 4% trealose retiveram a maior percentagem de monômero após as incubações de 100 dias a 40°C e 50°C.

Comparação da estabilidade em temperatura acelerada entre formulações secadas por congelamento e em solução: As formulações secadas por congelamento: (1) 20 mg/mL IMC-1121B₅ 4% sacarose, 10 mM tampão histidina (pH 6,0), e (2) 20 mg/mL IMC-1121B, 4% trealose, 10 mM tampão histidina (pH 6,0), foram comparadas com formulações em solução (1) 5 mg/mL IMC-1121B em PBS (pH 7,2) e (2) 5 mg/mL IMC-1121B em 10 mM tampão histidina (pH 6,0). As amostras foram incubadas a 40°C ou 50°C 10 durante até 100 dias. Após o período de incubação, os produtos liofilizados foram reconstituídos em 5 mg/mL com 10 mM tampão histidina (pH 6,0). As 15 amostras liofilizadas reconstituídas e amostras de solução foram analisadas por SEC-HPLC. A variação de porcentagens de monômero, agregado e agente degradante como uma função de tempo de incubação a 40°C ou 50°C é dada 20 em Figuras 17 através 23. Porcentagens de degradação aumentaram com tempo tanto nas formulações em solução mas permaneceram inalteradas em formulações liofilizadas (Figuras 19 e 22).

Exemplo 5. Formulação de secagem por congelamento para anticorpo de concentração elevada

25 Os resultados anteriores demonstraram que dentre os compostos testado, 4% sacarose ou 4% trealose proveram a maior estabilidade para formulações secadas por congelamento de anticorpo JLMC-1121B a concentrações de 20 mg/mL. Neste estudo, os requerentes elevaram concentração de IMC- 112 IB de 20 mg/mL a 50 mg/mL e alteraram a

concentração de sacarose de 4% a 8% com o objetivo de formular um IMC-112 IB a uma concentração de 50 mg/mL. Como um controle, EMC-1121 B a 20 mg/mL na presença de 4% sacarose foi também liofilizado. Os produtos liofilizados e formulação de solução de controle foram incubados a temperatura ambiente, 40°C e 50°C durante até 3 meses. A formulação de solução de controle consistia da presente formulação de solução recomendada otimizada, para o anticorpo HMC-112 IB (5 mg/mL em histidina10 mM, Glicina133 mM, NaCl75 mM, 0,01% Tween 80). Após o período de incubação, produtos liofilizados foram reconstituídos em 5 mg/mL com 10 mM tampão histidina (pH 6,0) e então analisados por SEC-HPLC, IEC-HPLC, e SDS-PAGE redutor e não redutor.

Análise SEC-HPLC de IMC- 1121B liofilizado e formulado em solução após incubação a 50°C: SEC-HPLC foi realizado em amostras antes e após liofilização e após incubações de um mês e 3 meses a 50°C. Após a incubação, os produtos liofilizados foram reconstituídos com histidina 10 mM (pH 6,0). Variação nas porcentagens de monômero, agregado e agente degradante é mostrada em Figuras 23, 24 e 25, respectivamente. A porcentagem de monômeros foi a maior e de agregado foi a menor para amostra a 8% sacarose. Amostras liofilizadas continham significantemente menos agentes degradantes do que as amostras formuladas em solução.

Análise SEC-HPLC e IEC-HPLC de IMC-1121B liofilizado e formulado em solução após incubação a temperatura ambiente e a 40°C: SEC-HPLC e IEC-HPLC foram realizados nas amostras antes e após liofilização e após incubações de um mês e 3 meses a temperatura ambiente e 40°C. Após a incubação, os produtos liofilizados foram reconstituídos com 10 mM tampão histidina (pH 6,0). Variação de porcentagens de monômero, agregado e agente degradante é mostrada em Figuras 26, 27 e 28, respectivamente, para amostras incubadas a 40°C, e em Figuras 30, 31 e 32, respectivamente, para amostras incubadas a temperatura ambiente. Amostras liofilizadas continham

significantemente menos agentes degradantes do que as amostras formuladas em solução. Cromatogramas de SEC-HPLC de IMC-112 IB incubado 3 meses em solução, ou secado por congelamento contendo 8% sacarose são mostrados em Figura 29 (incubações a 40°C) e Figura 33 (incubações a temperatura ambiente). A amostra IMC-1121B de referência foi incluída para comparação. O cromatograma da amostra secada por congelamento é similar ao de BVIC-1121B de referência, mas o cromatograma para IMC-112 IB formulado em solução foi deslocado para pH ácido.

Análise SDS-PAGE de IMC-1121B liofilizado e formulado em solução após a 3 meses incubação: Os produtos liofilizados foram reconstituídos em 10 mM tampão histidina (pH 6,0). Amostras de IMC-1121B mantido em solução, e IMC-112 IB secado por congelamento reconstituído em 10 mM tampão histidina (pH 6,0) foram analisadas com um SDS-PAGE redutor a 4-20% (Figuras 34) e a 4-20% SDS-PAGE não redutor (Figura 35) após uma incubação de três meses. As formulações liofilizadas, 20 mg/ml anticorpo com 4% sacarose e 50 mg/ml anticorpo com 8% sacarose, exibiram uma degradação de cadeia pesada significantemente reduzida em comparação com a formulação não liofilizada.

REIVINDICAÇÕES

1. Formulação estável, caracterizada pelo fato de compreender um anticorpo e um tampão em que a fragmentação não enzimática do anticorpo é substancialmente reduzida.

5 2. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-VEGFR.

3. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-VEGFR2.

10 4. Formulação de acordo com a reivindicação 3, caracterizada pelo fato de que o anticorpo VEGFR2 é IMC-1121B.

5. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que a concentração de anticorpo é cerca de 50 a cerca de 200 mg/ml.

15 6. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tampão compreende um tampão histidina.

7. Formulação de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que a concentração de tampão histidina é cerca de 5 mM a cerca de 50 mM.

20 8. Formulação de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que a concentração de tampão histidina é cerca de 10 mM.

9. Formulação de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão histidina é cerca de 5,5 a cerca de 6,5.

10. Formulação de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão histidina é cerca de 6,0.

25 11. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tampão compreende um tampão citrato.

12. Formulação de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão citrato é cerca de 5,5 a cerca de 6,5.

13. Formulação de acordo com a reivindicação 11, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão citrato é cerca de 6,0.

14. Formulação de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o tampão compreende um tampão acetato.

5 15. Formulação de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão acetato é cerca de 5,5 a cerca de 6,5.

16. Formulação de acordo com a reivindicação 14, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão acetato é cerca de 6,0.

10 17. Formulação liofilizada estável, caracterizada pelo fato de compreender:

um anticorpo,

um tampão, e

um lioprotetor,

15 em que a fragmentação não enzimática do anticorpo é substancialmente reduzida.

18. Formulação de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-VEGFR.

19. Formulação de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo anti-VEGFR2.

20 20. Formulação de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que o anticorpo VEGFR2 é IMC-1121B.

21. Formulação de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que a concentração de anticorpo é cerca de 50 a cerca de 200 mg/ml.

22. Formulação de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que o tampão compreende um tampão histidina.

23. Formulação de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a concentração de tampão histidina é cerca de 5

mM a cerca de 50 mM.

24. Formulação de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que a concentração de tampão histidina é cerca de 10 mM.

5 25. Formulação de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão histidina é cerca de 5,5 a cerca de 6,5.

26. Formulação de acordo com a reivindicação 22, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão histidina é cerca de 6,0.

10 27. Formulação de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que o tampão compreende um tampão citrato.

28. Formulação de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão citrato é cerca de 5,5 a cerca de 6,5.

15 29. Formulação de acordo com a reivindicação 27, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão citrato é cerca de 6,0.

30. Formulação de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que o tampão compreende um tampão acetato.

20 31. Formulação de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão acetato é cerca de 5,5 a cerca de 6,5.

32. Formulação de acordo com a reivindicação 30, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão acetato é cerca de 6,0.

25 33. Formulação de acordo com a reivindicação 17, caracterizada pelo fato de que o lioprotetor é um açúcar.

34. Formulação de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que o lioprotetor é sacarose.

35. Formulação de acordo com a reivindicação 33, caracterizada pelo fato de que o lioprotetor é trealose.

36. Formulação de acordo com a reivindicação 17,
caracterizada pelo fato de ainda compreender um tensoativo.

37. Formulação de acordo com a reivindicação 36,
caracterizada pelo fato de que o tensoativo é Tween 80.

5 38. Formulação de acordo com a reivindicação 17,
caracterizada pelo fato de ainda compreender um agente estabilizante.

39. Formulação de acordo com a reivindicação 38,
caracterizada pelo fato de que o agente estabilizante é ácido aspártico.

10 40. Formulação liofilizada, caracterizada pelo fato de
compreender:

um anticorpo anti-VEGFR,

um tampão, e

um lioprotetor.

15 41. Formulação de acordo com a reivindicação 40,
caracterizada pelo fato de que o anticorpo é um anticorpo VEGFR2.

42. Formulação de acordo com a reivindicação 41,
caracterizada pelo fato de que o anticorpo VEGFR2 é IMC-1121B.

20 43. Formulação de acordo com a reivindicação 42,
caracterizada pelo fato de que a concentração de anticorpo é cerca de 5 a
cerca de 50 mg/ml.

44. Formulação de acordo com a reivindicação 40,
caracterizada pelo fato de que o tampão compreende um tampão histidina.

25 45. Formulação de acordo com a reivindicação 44,
caracterizada pelo fato de que a concentração do tampão histidina é cerca de 5
mM a cerca de 50 mM.

46. Formulação de acordo com a reivindicação 44,
caracterizada pelo fato de que a concentração de tampão histidina é cerca de
10 mM.

47. Formulação de acordo com a reivindicação 44,

caracterizada pelo fato de que o pH do tampão histidina é cerca de 5,5 a cerca de 6,5.

48. Formulação de acordo com a reivindicação 44, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão histidina é cerca de 6,0.

5 49. Formulação de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que o tampão compreende um tampão citrato.

50. Formulação de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que o tampão compreende um tampão acetato.

10 51. Formulação de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de que o lioprotetor é um açúcar.

52. Formulação de acordo com a reivindicação 51, caracterizada pelo fato de que o lioprotetor é sacarose.

53. Formulação de acordo com a reivindicação 51, caracterizada pelo fato de que o lioprotetor é trealose.

15 54. Formulação de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de ainda compreender um tensoativo.

55. Formulação de acordo com a reivindicação 54, caracterizada pelo fato de que o tensoativo é Tween 80.

20 56. Formulação de acordo com a reivindicação 40, caracterizada pelo fato de ainda compreender um agente estabilizante.

57. Formulação de acordo com a reivindicação 56, caracterizada pelo fato de que o agente estabilizante é ácido aspártico.

58. Formulação liofilizada, caracterizada pelo fato de compreender:

25 um anticorpo anti-VEGFR2,
um tampão histidina, e
um açúcar lioprotetor.

59. Formulação de acordo com a reivindicação 58, caracterizada pelo fato de que o anticorpo VEGFR2 é IMC-1121B.

60. Formulação de acordo com a reivindicação 58, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão histidina é cerca de 5,5 a cerca de 6,5.

5 61. Formulação de acordo com a reivindicação 58, caracterizada pelo fato de que o pH do tampão histidina é cerca de 6,0.

62. Formulação de acordo com a reivindicação 58, caracterizada pelo fato de que o lioprotetor é sacarose.

63. Formulação de acordo com a reivindicação 58, caracterizada pelo fato de que o lioprotetor é trealose.

10 64. Formulação de acordo com a reivindicação 58, caracterizada pelo fato de ainda compreender um tensoativo.

65. Formulação de acordo com a reivindicação 64, caracterizada pelo fato de que o tensoativo é Tween 80.

15 66. Formulação de acordo com a reivindicação 58, caracterizada pelo fato de ainda compreender um agente estabilizante.

67. Formulação de acordo com a reivindicação 66, caracterizada pelo fato de que o agente estabilizante é ácido aspártico.

20 68. Método de tratamento, caracterizado pelo fato de compreender a administração de uma formulação reconstituída, compreendendo:

um anticorpo anti-VEGFR,

um tampão,

e um lioprotetor.

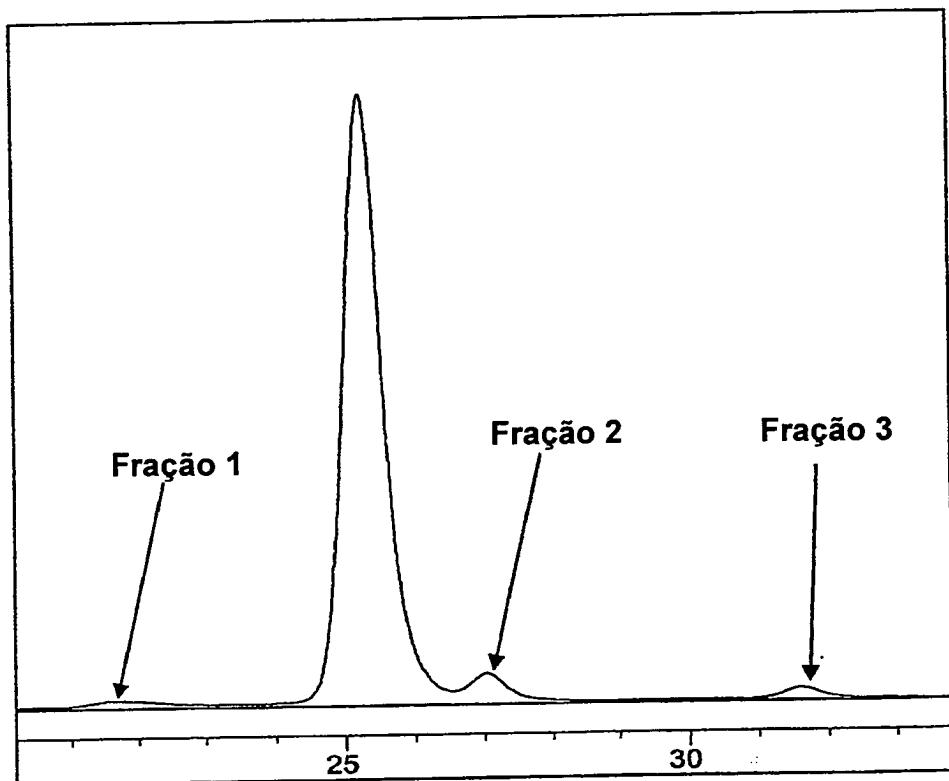


Fig. 1

MGWSCIILFLIVATATGVHSEVQLVQSGGGLVKPGGSLIRLSCAAASGFTFSYSMNNWVROAP	60
<hr/>	
GKGLEWVSSSISSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNNSIRAEDTAVYYCARVTD	120
<hr/>	
AFDIWGQGTMVTVSSASTKGPSVFPAPSSKSTS[G]TAALGCLVKDYFPEPVTSWNNSGA	180
<hr/>	
LTSGVHTFPAVLQSSGGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDK	240
<hr/>	
HTCPPCPAPELIGGPSVFLFPKPKDTLMSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKENWYVDGV	300
<hr/>	
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ	360
<hr/>	
PREPQVYTLPSPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDG	420
<hr/>	
SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSPGK	465

Fig. 2

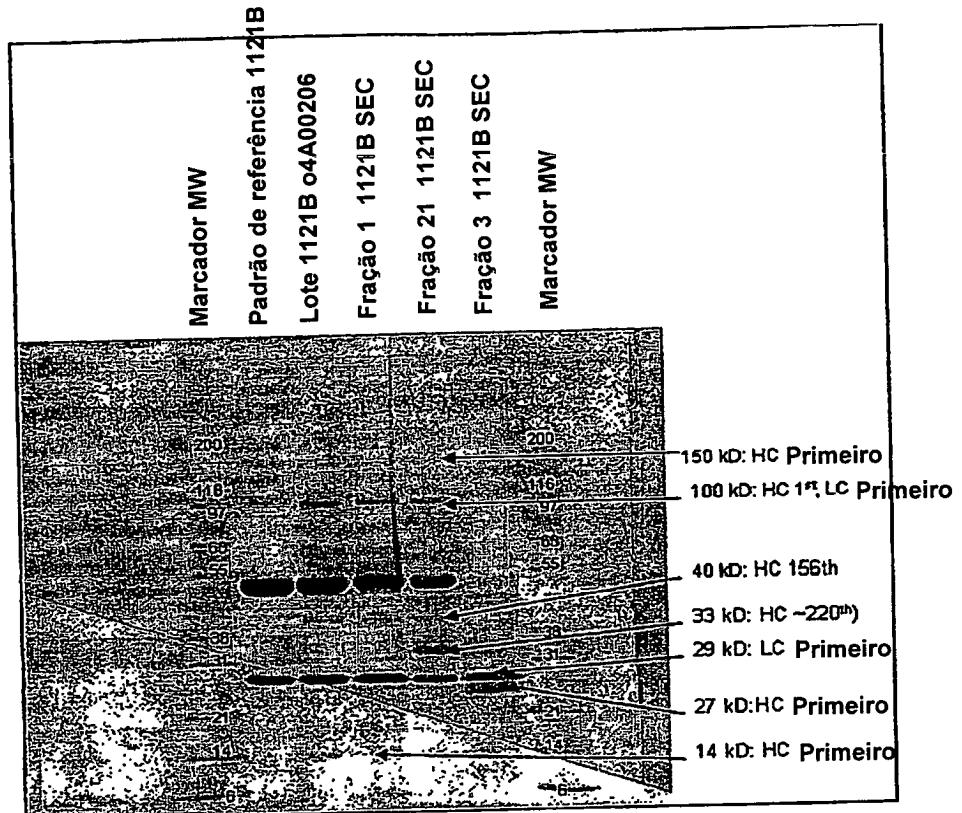


Fig. 3

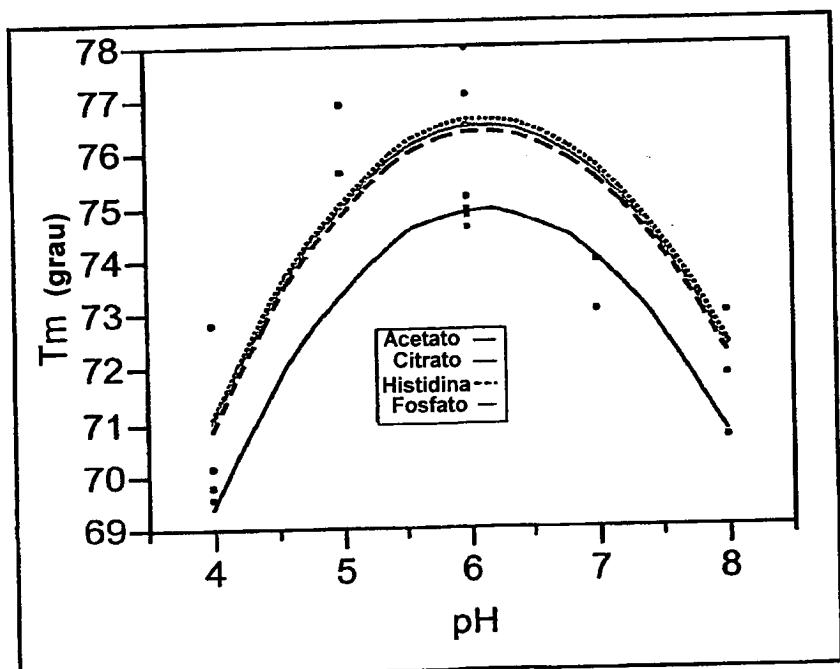


Fig. 4

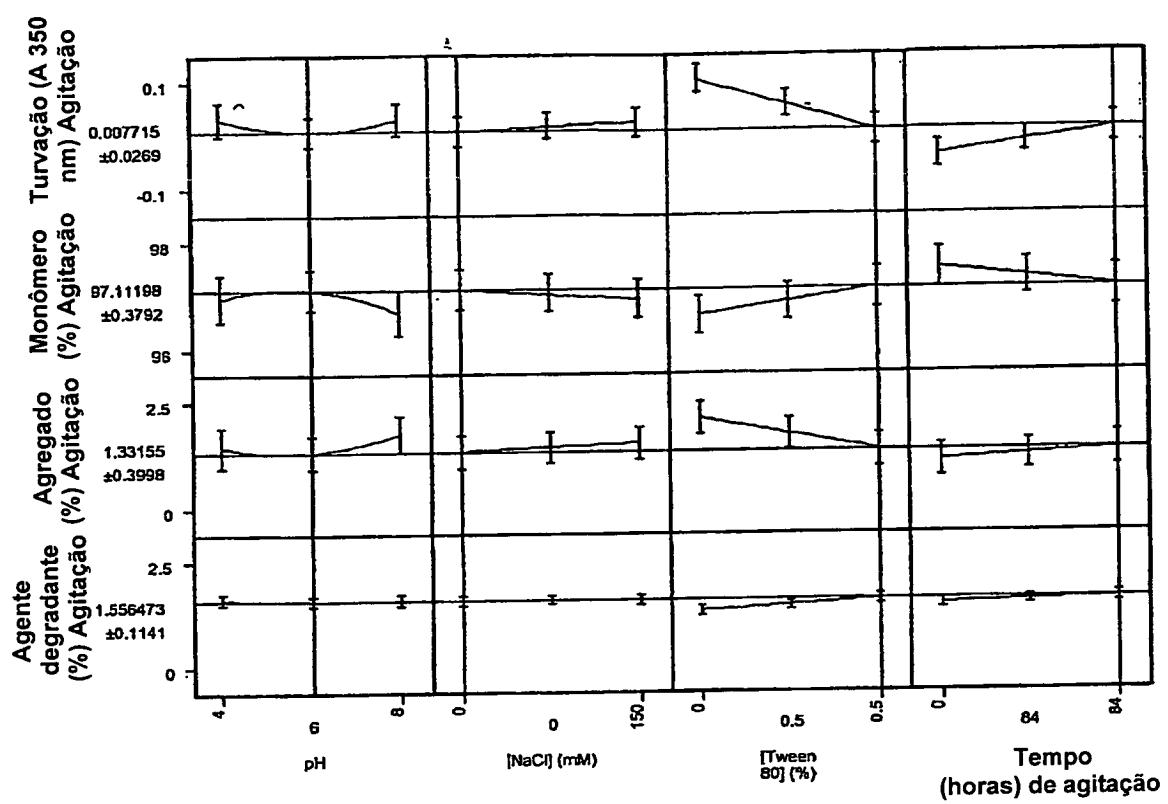


Fig. 5

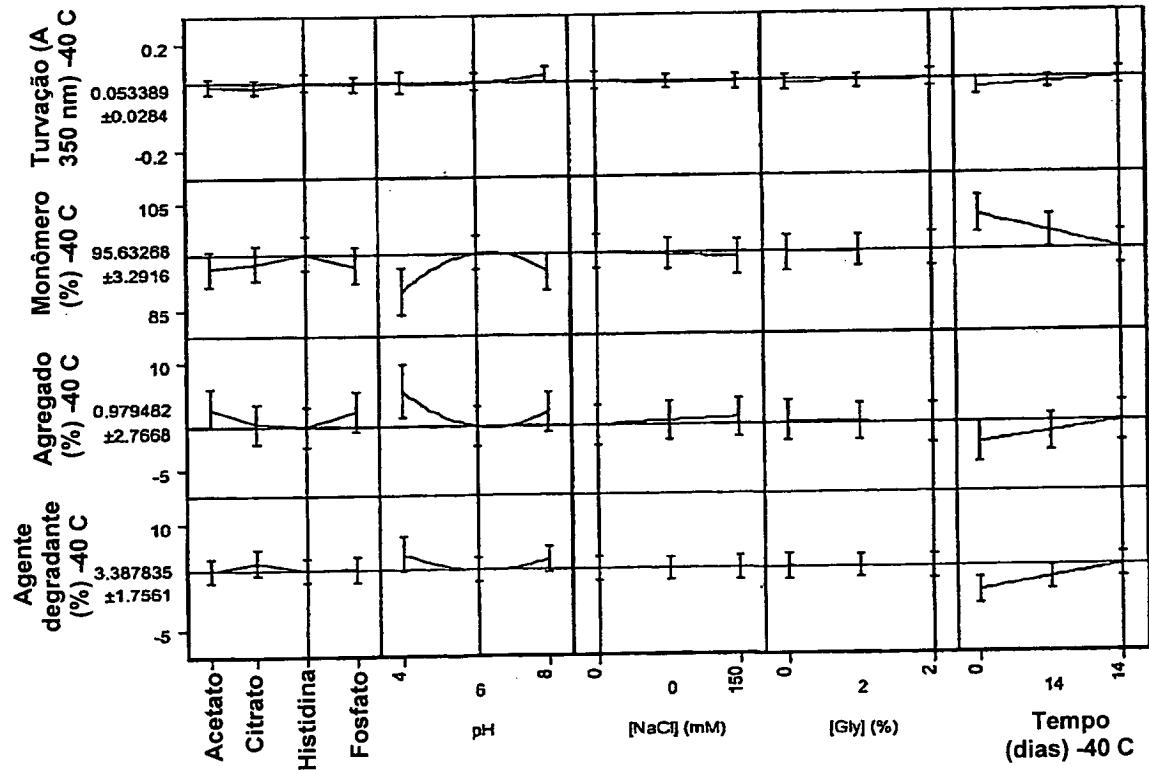


Fig. 6

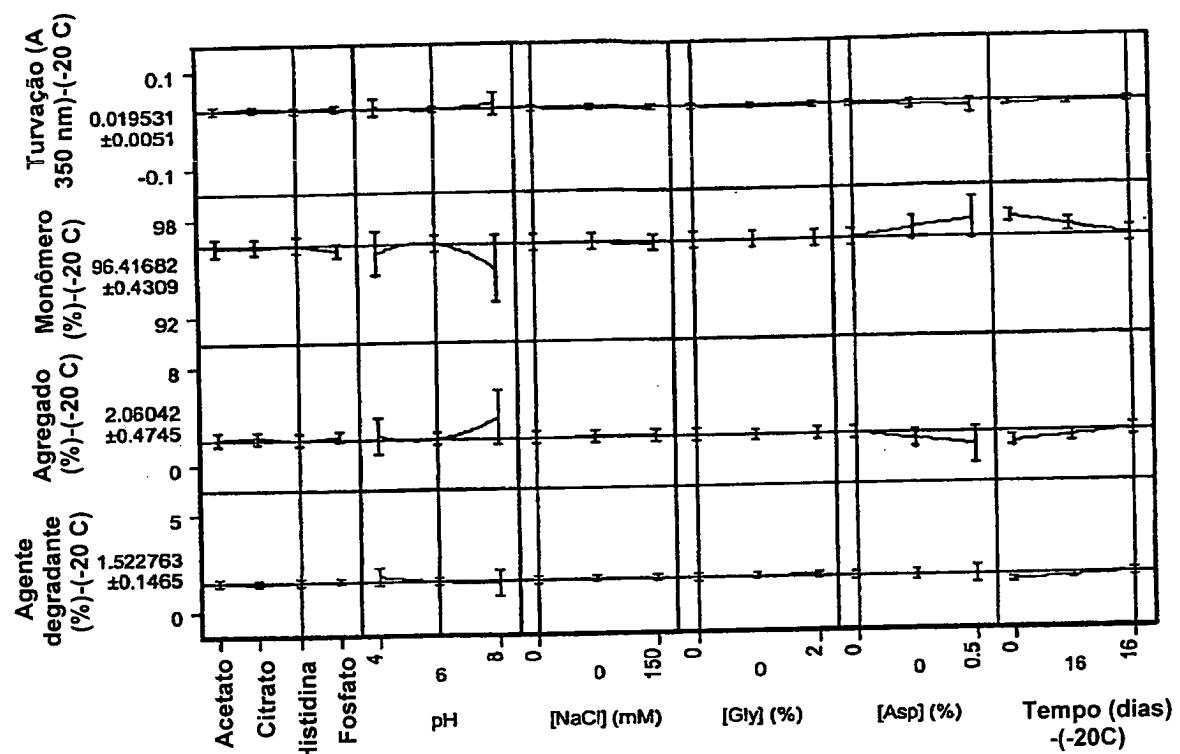


Fig. 7

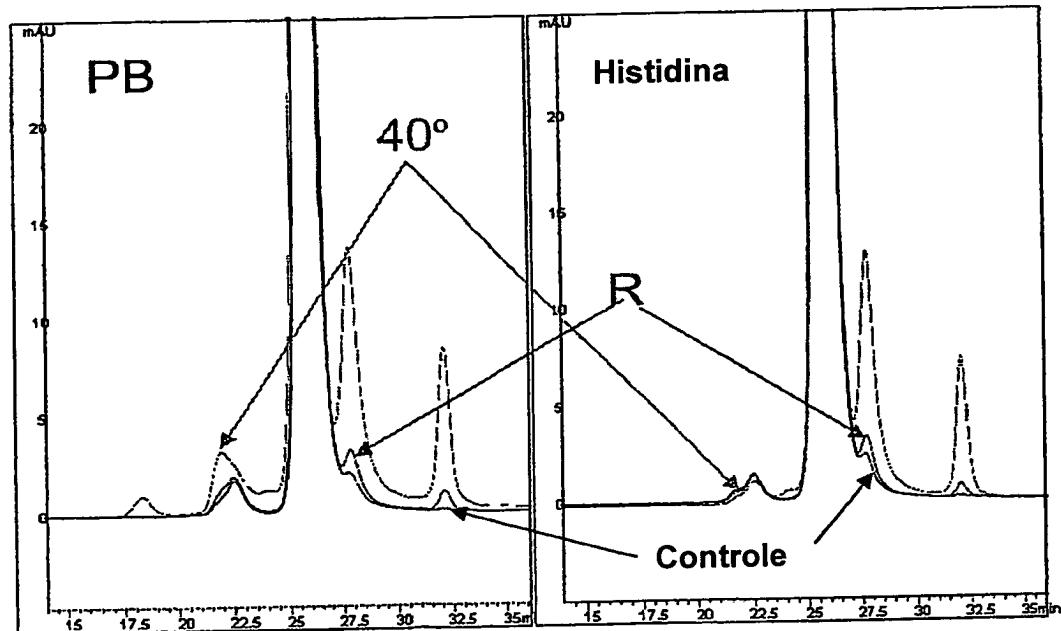


Fig. 8

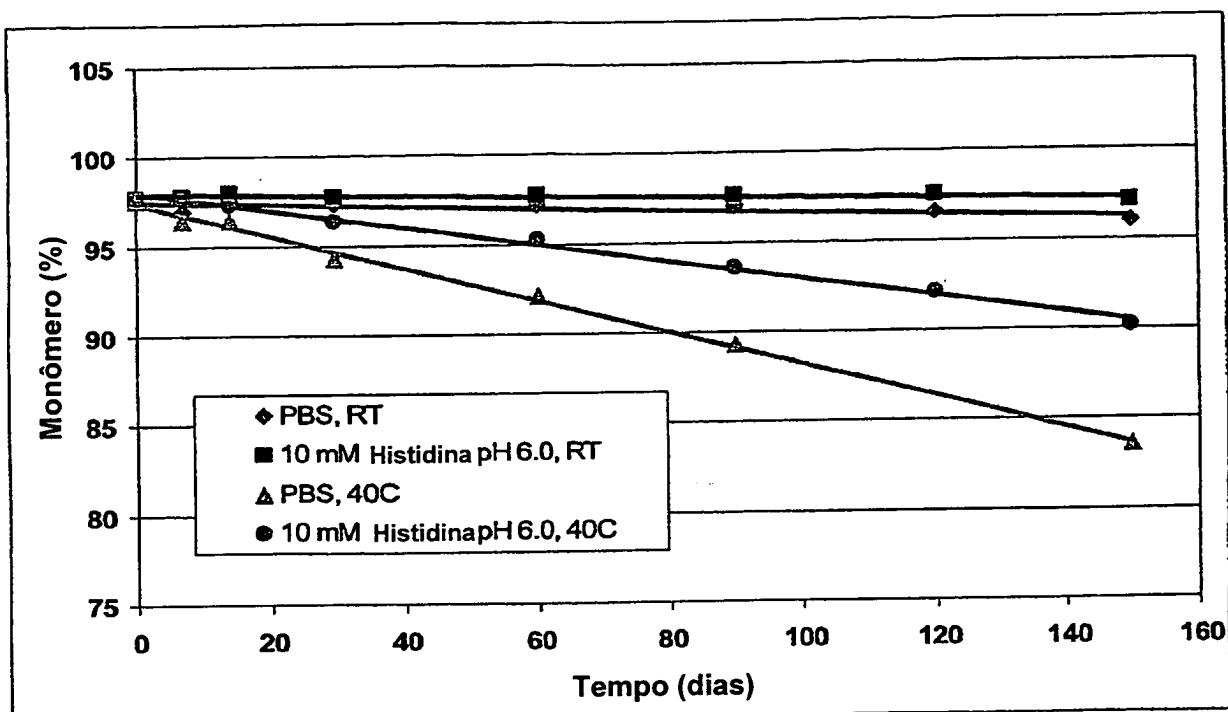


Fig. 9

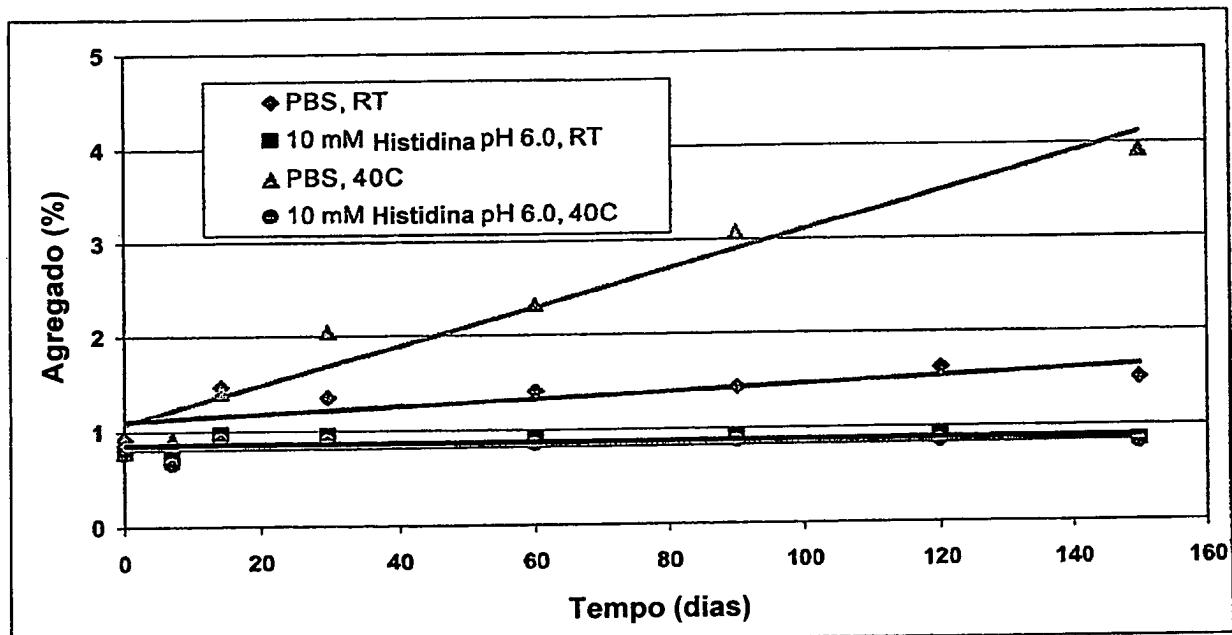


Fig. 10

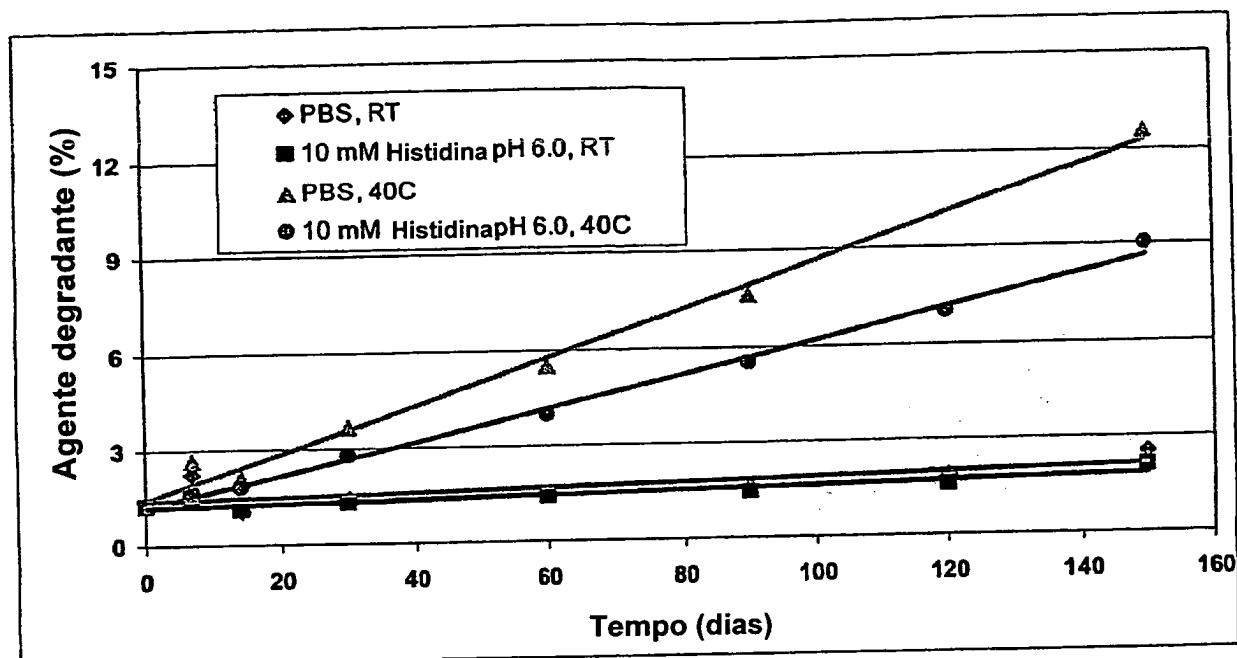


Fig. 11

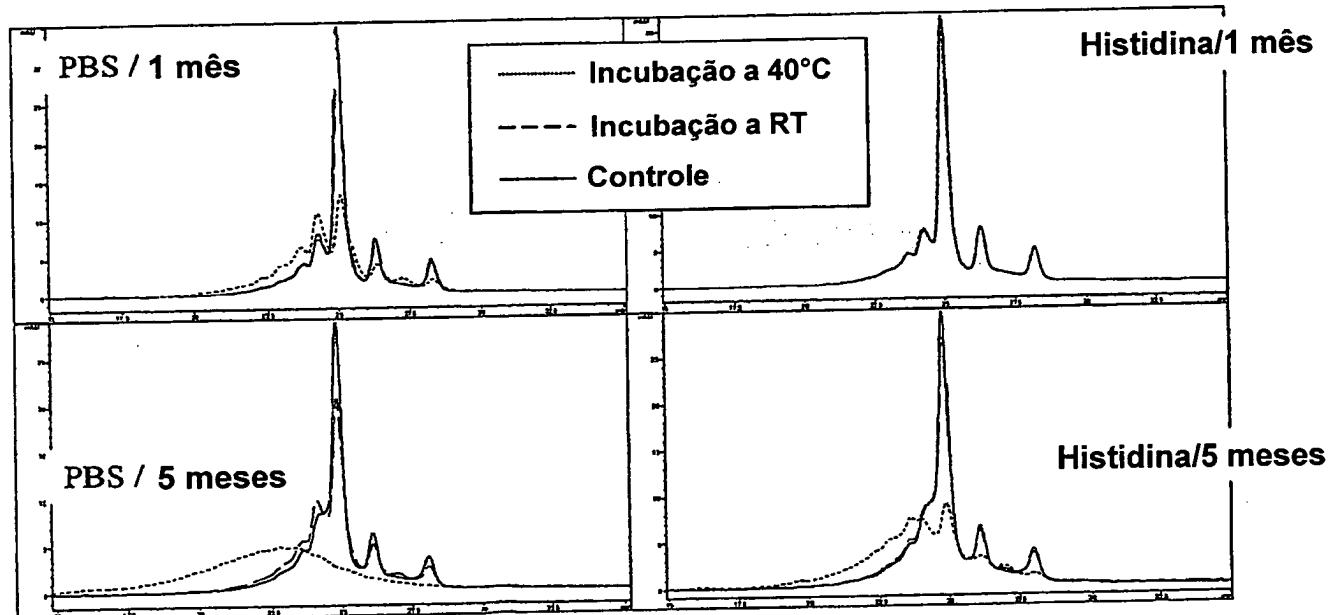


Fig. 12

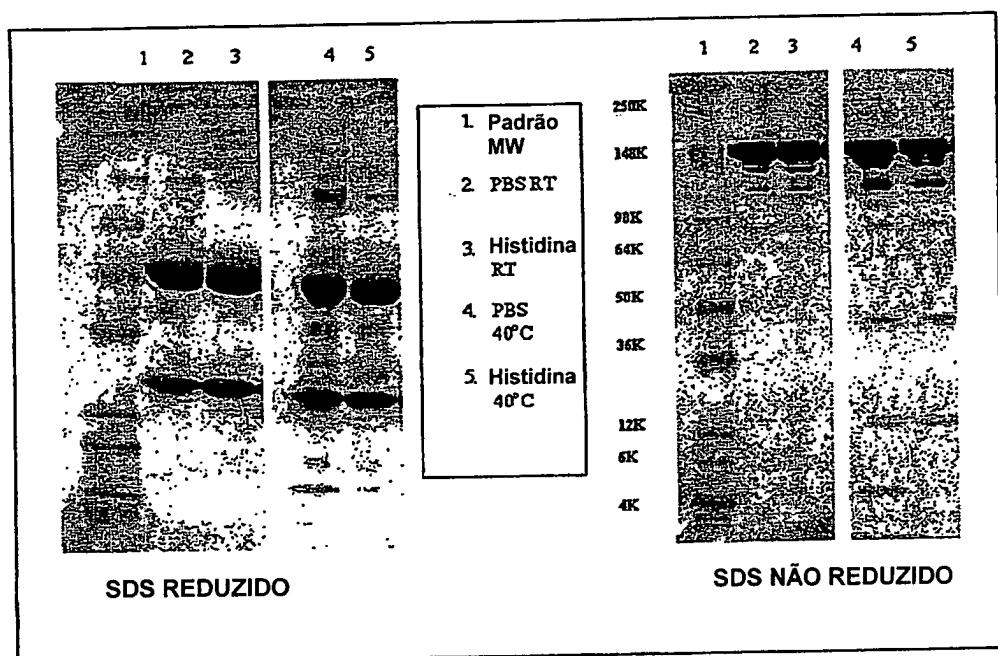


Fig. 13

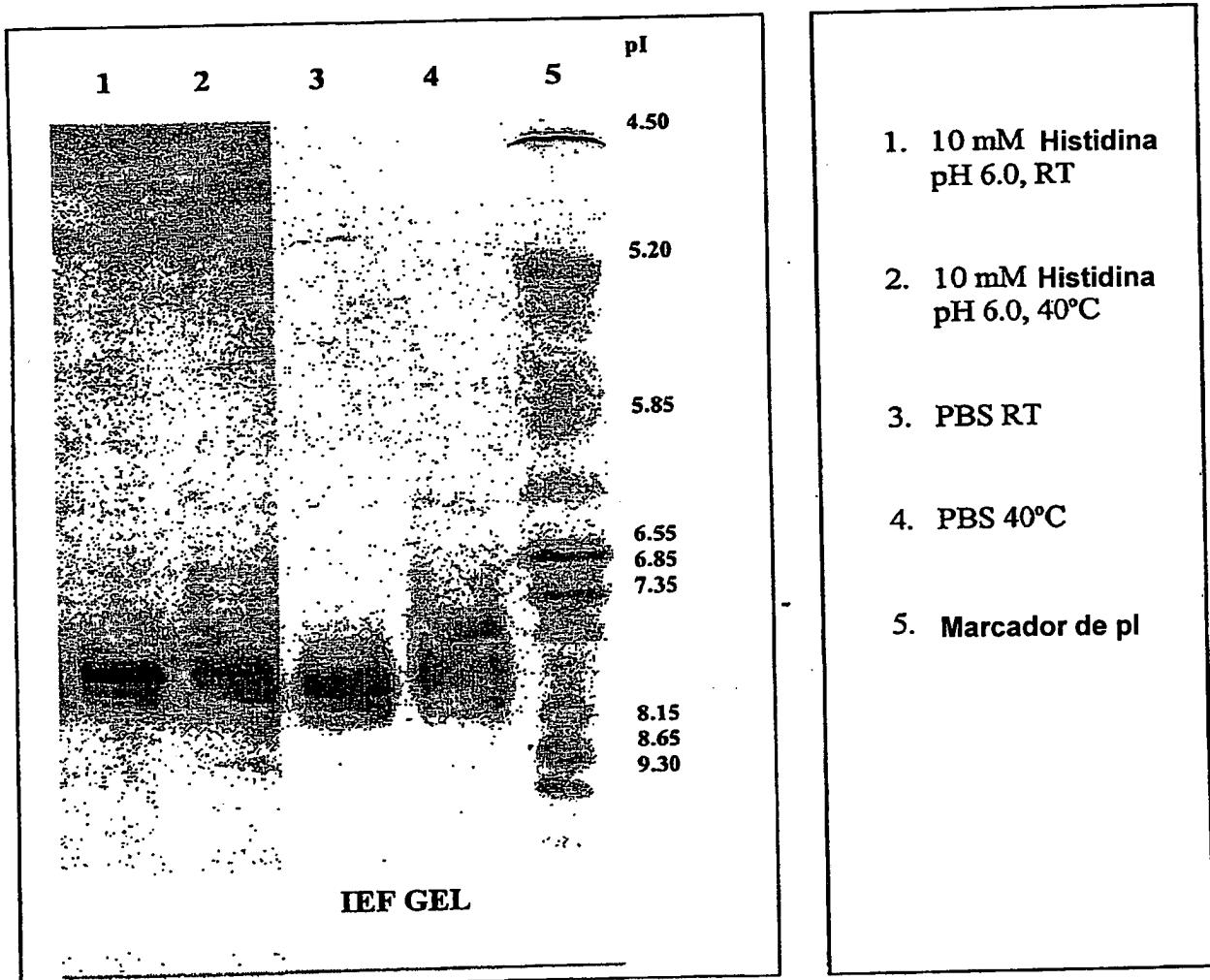


Fig. 14

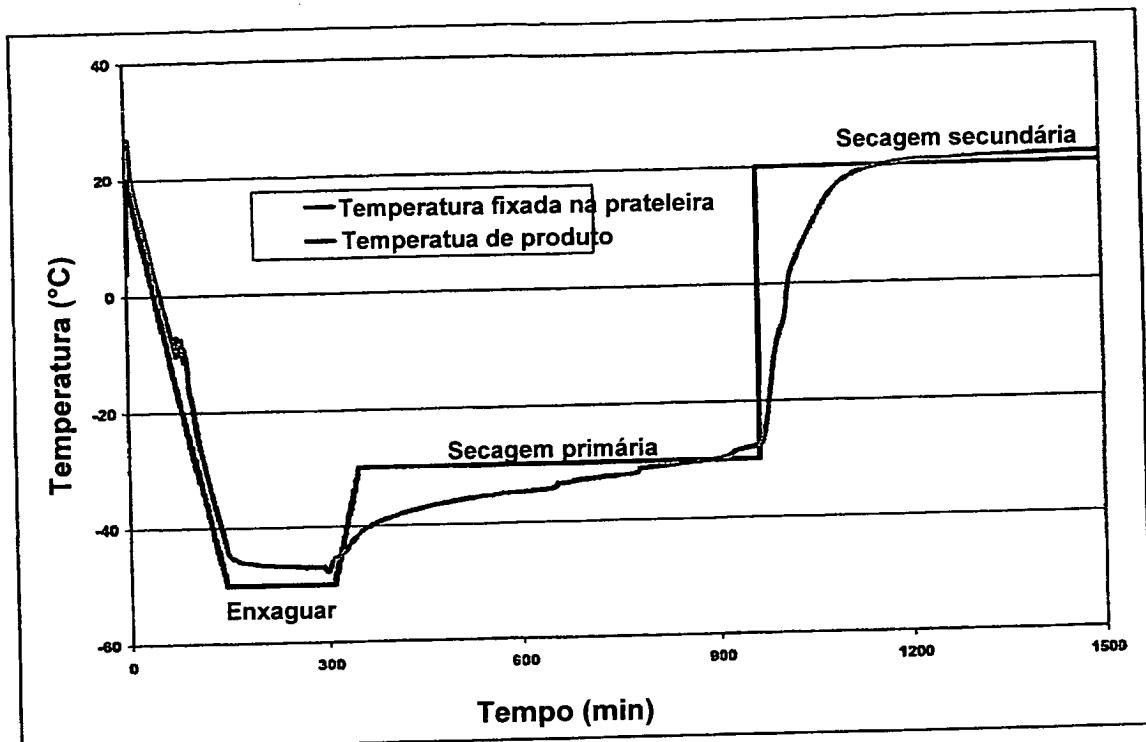


Fig. 15

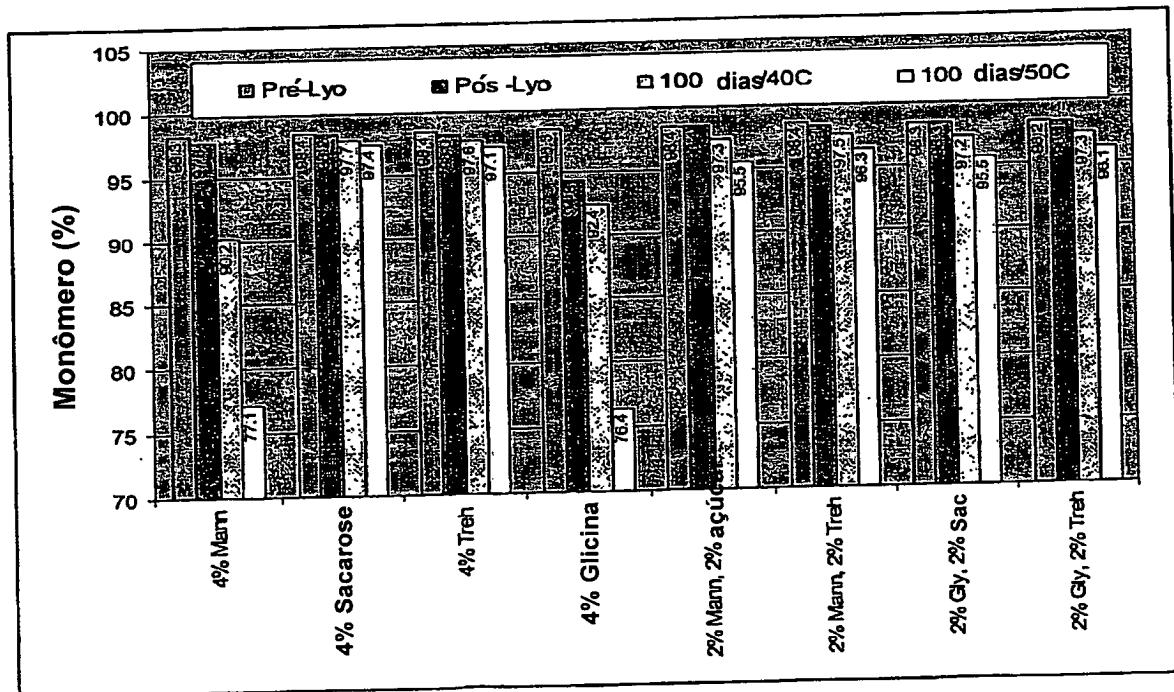


Fig. 16

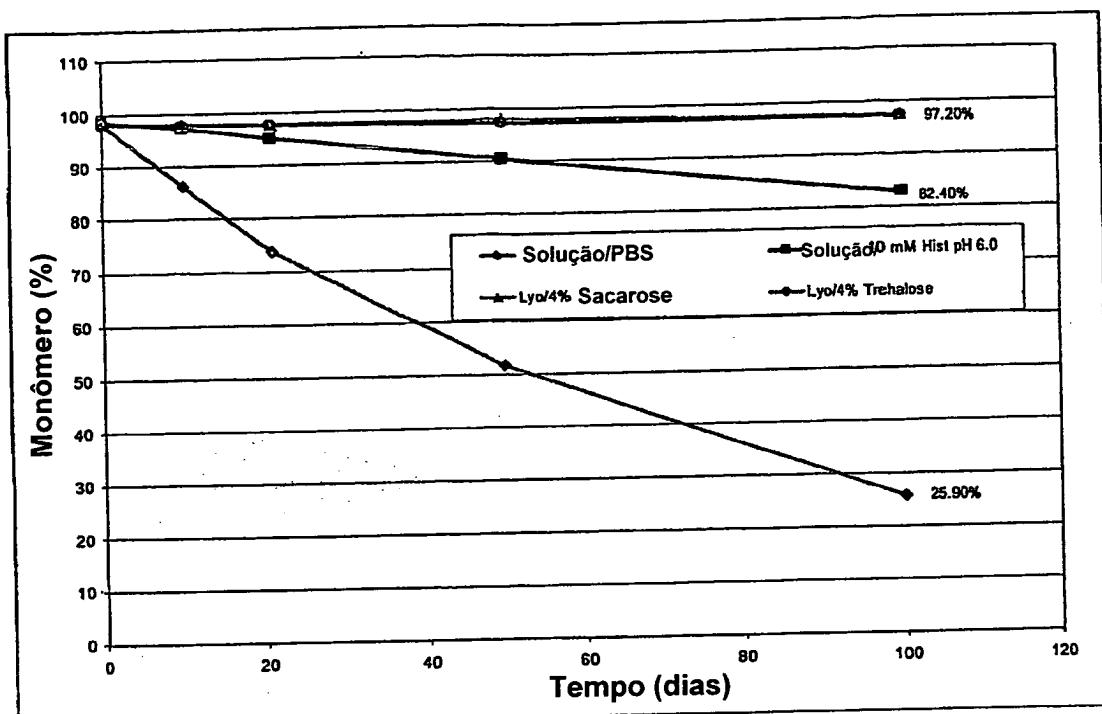


Fig. 17

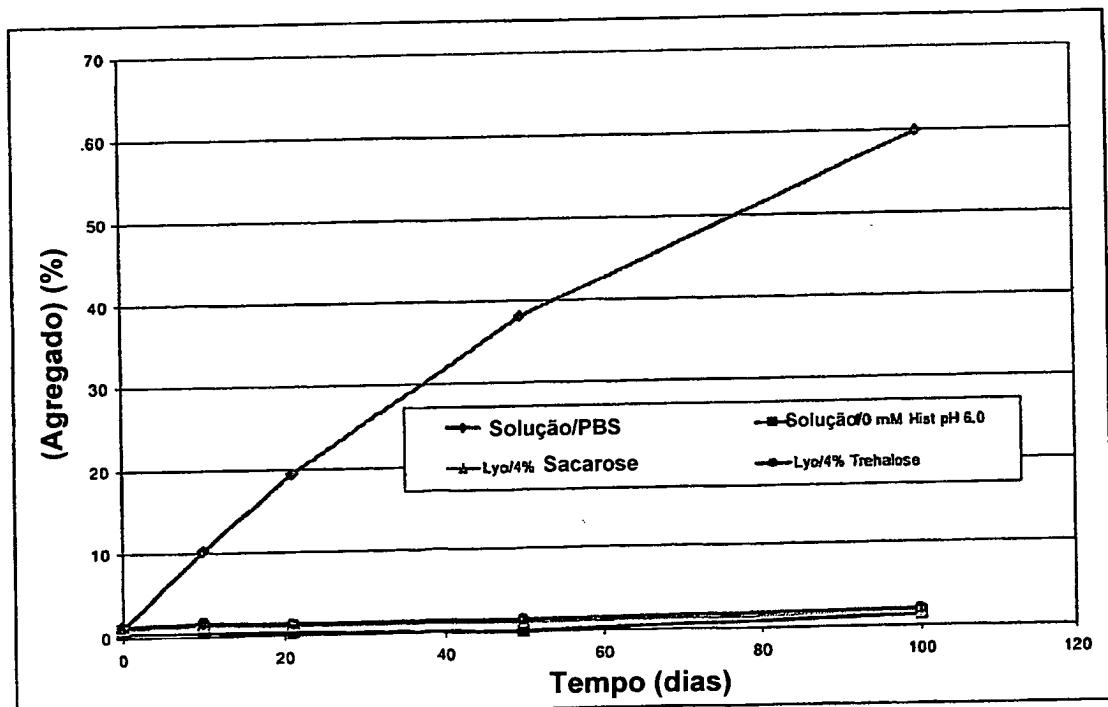


Fig. 18

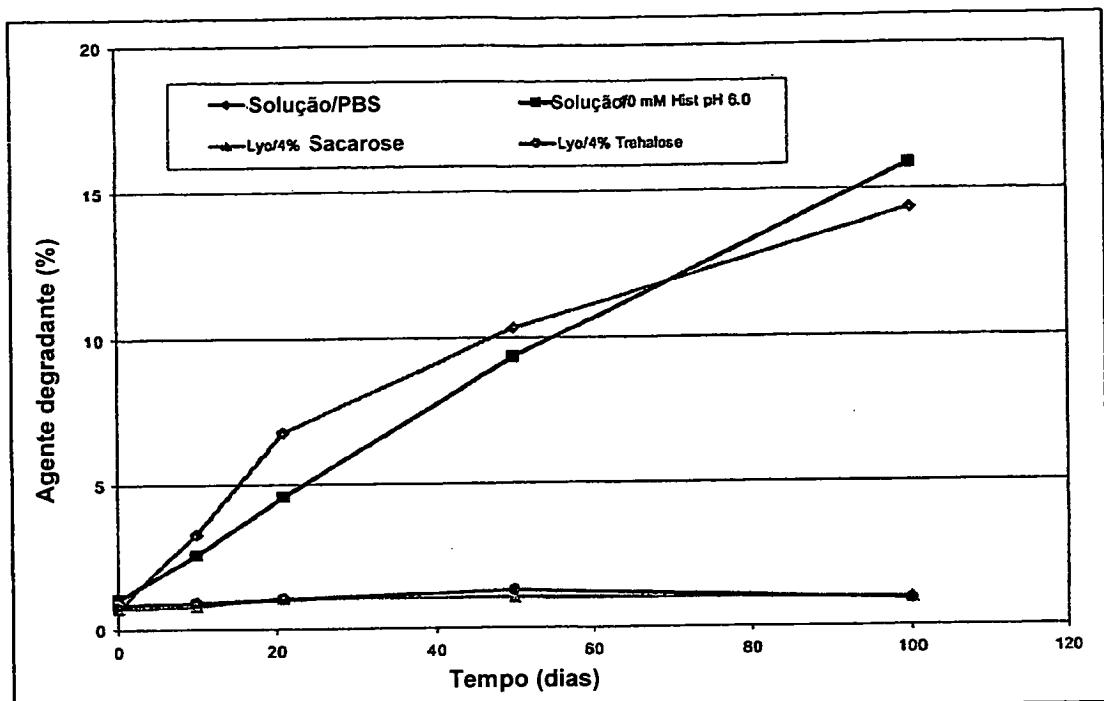


Fig. 19

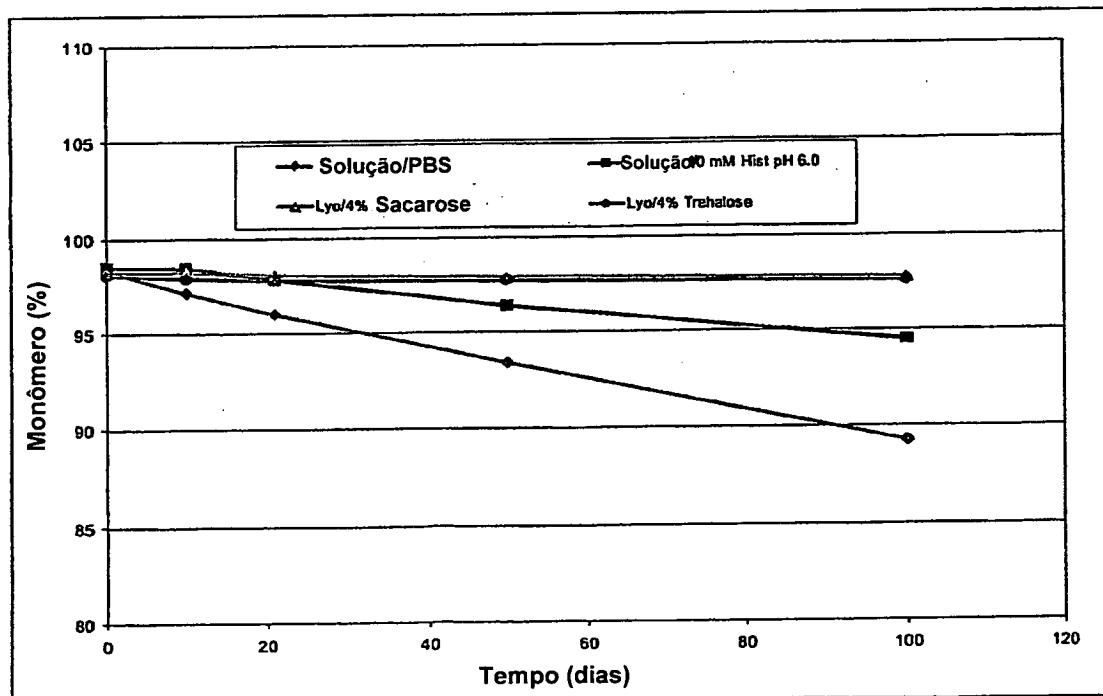


Fig. 20

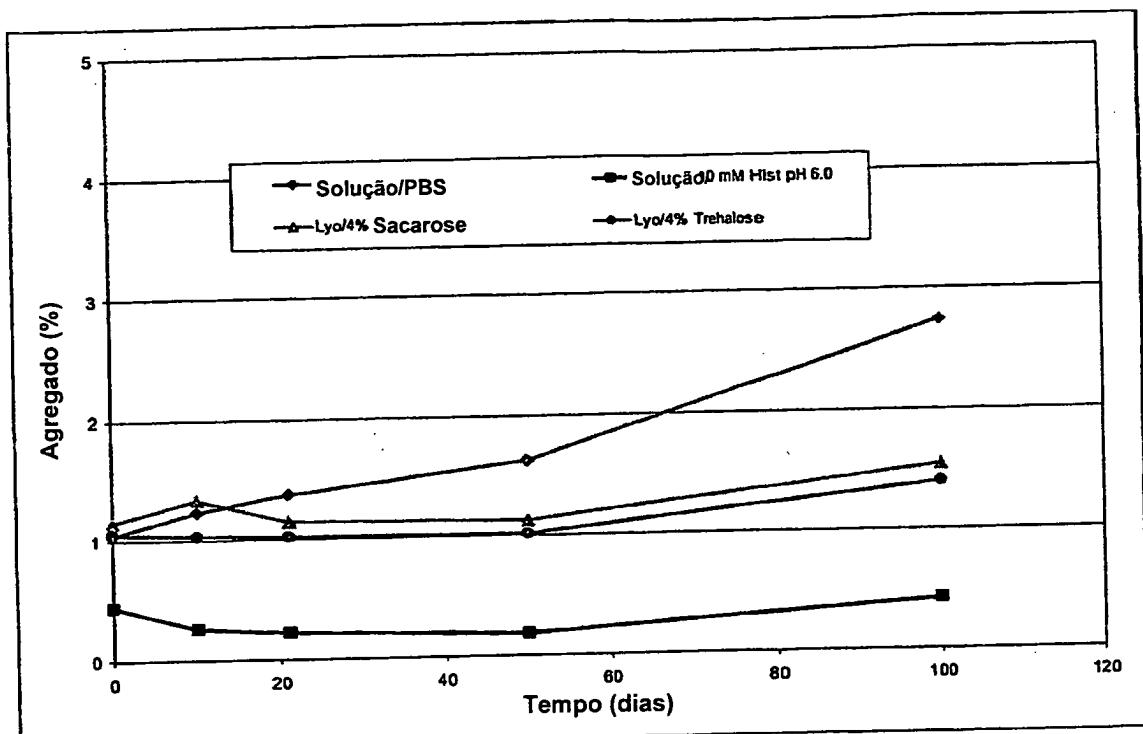


Fig. 21

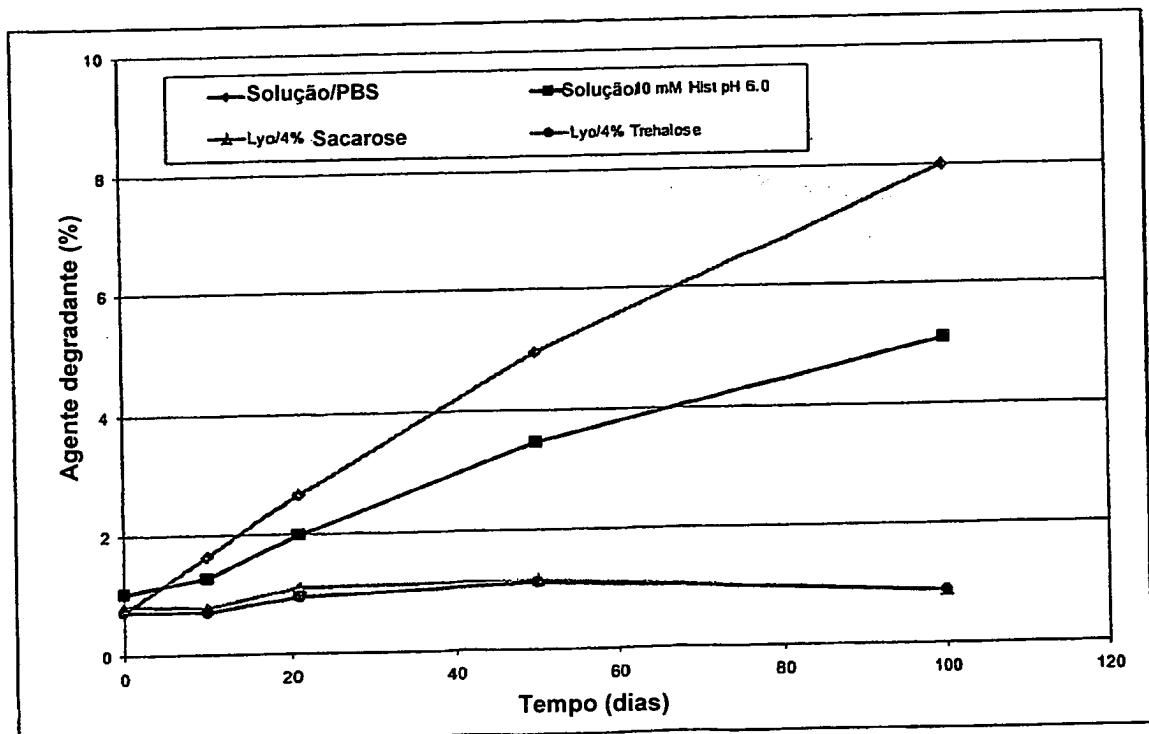


Fig. 22

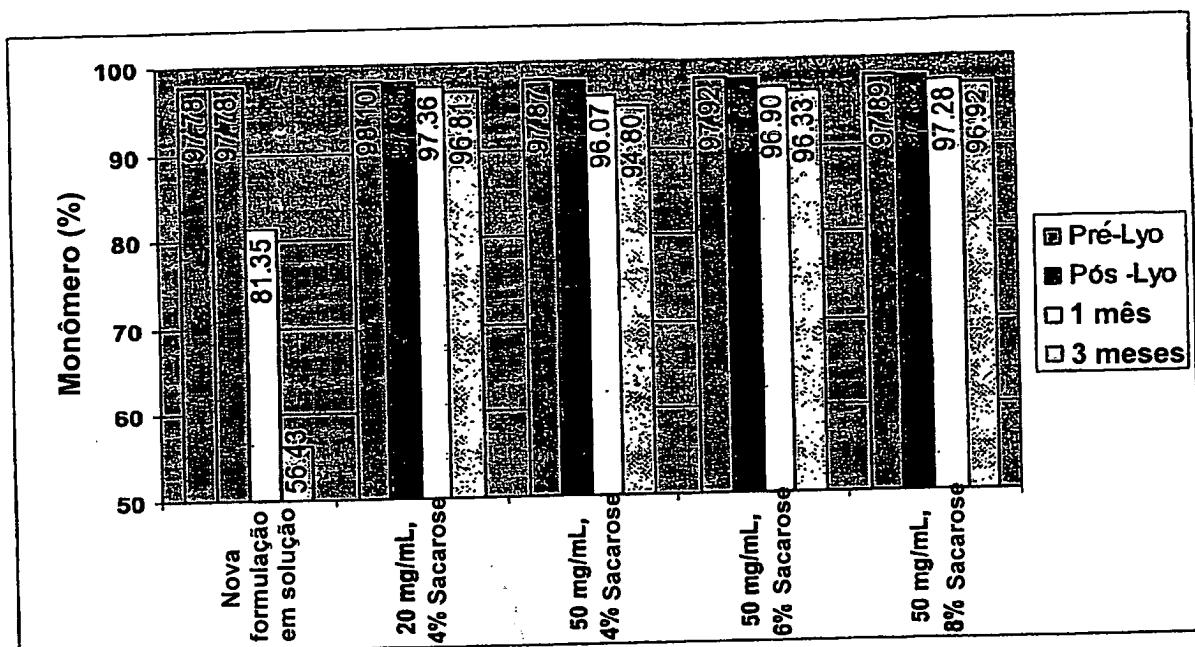


Fig. 23

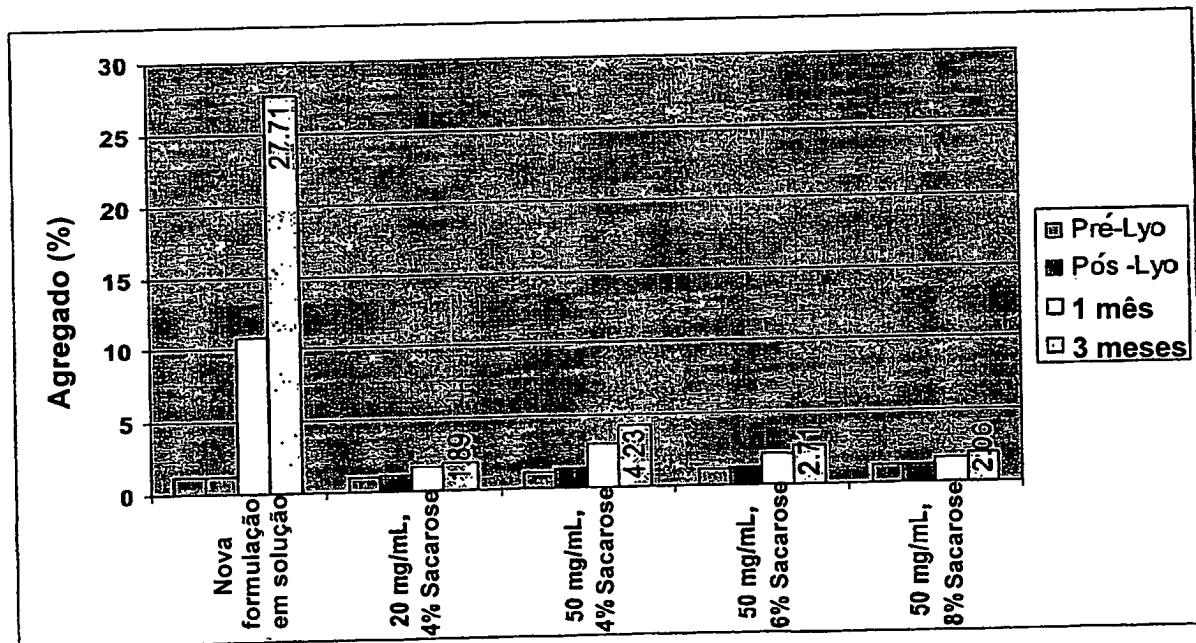


Fig. 24

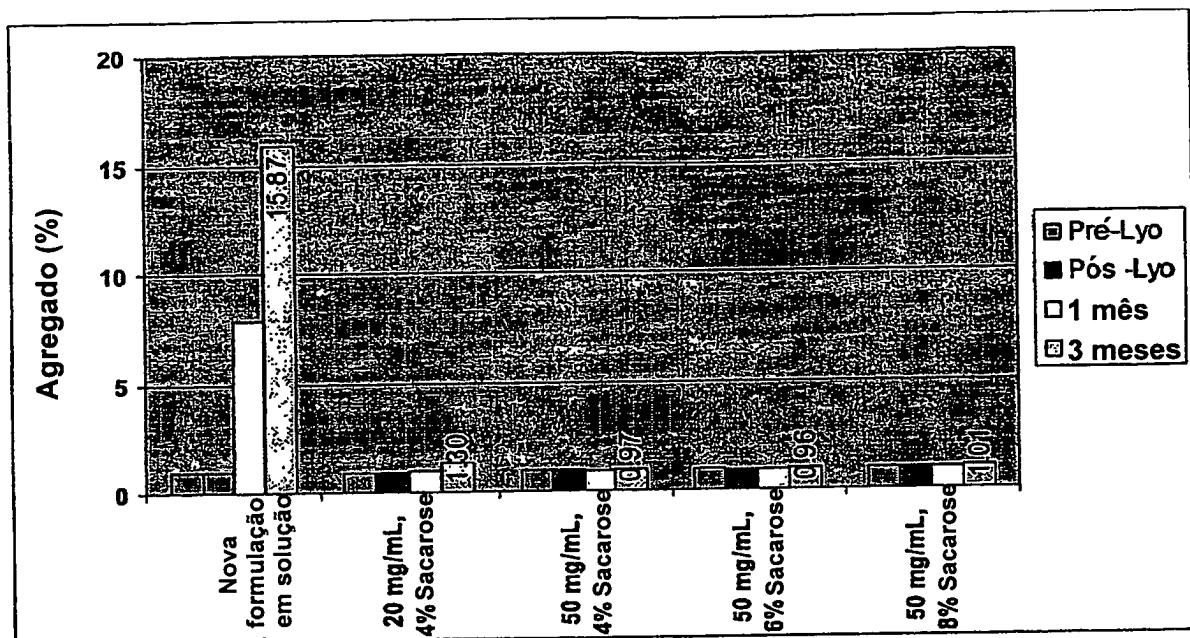


Fig. 25

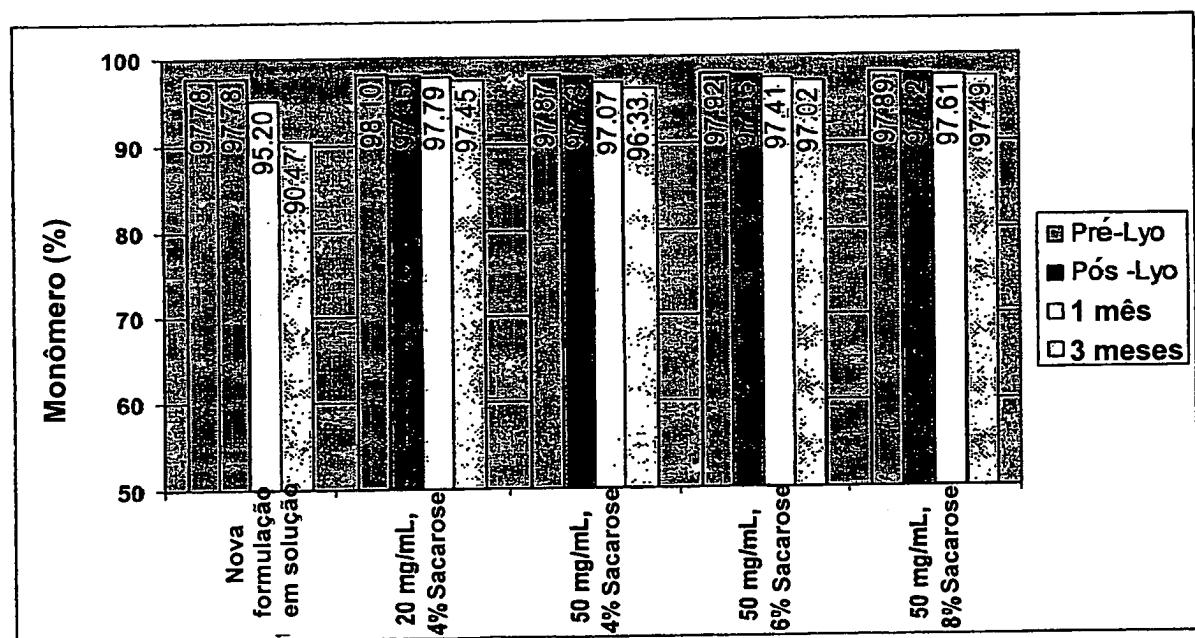


Fig. 26

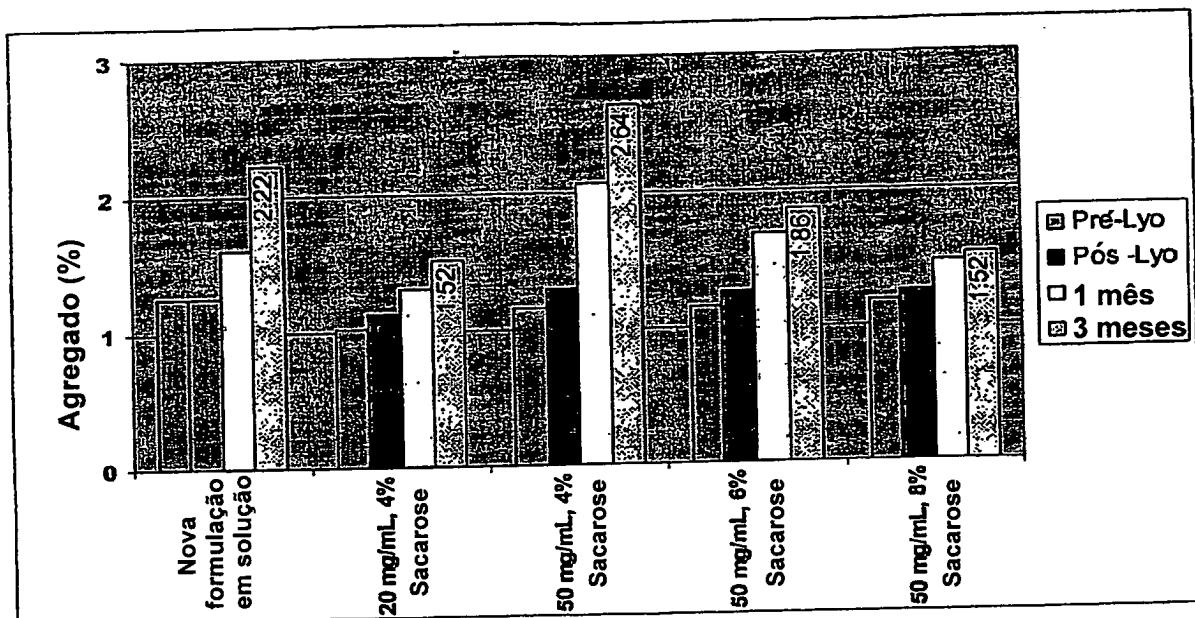


Fig. 27

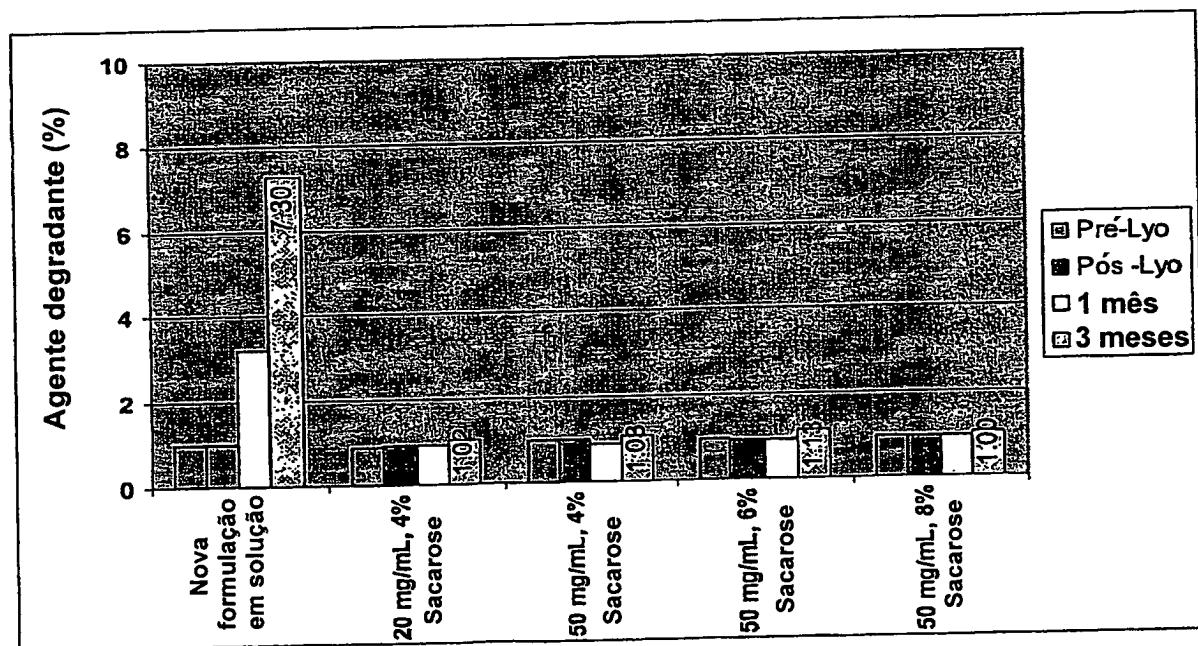


Fig. 28

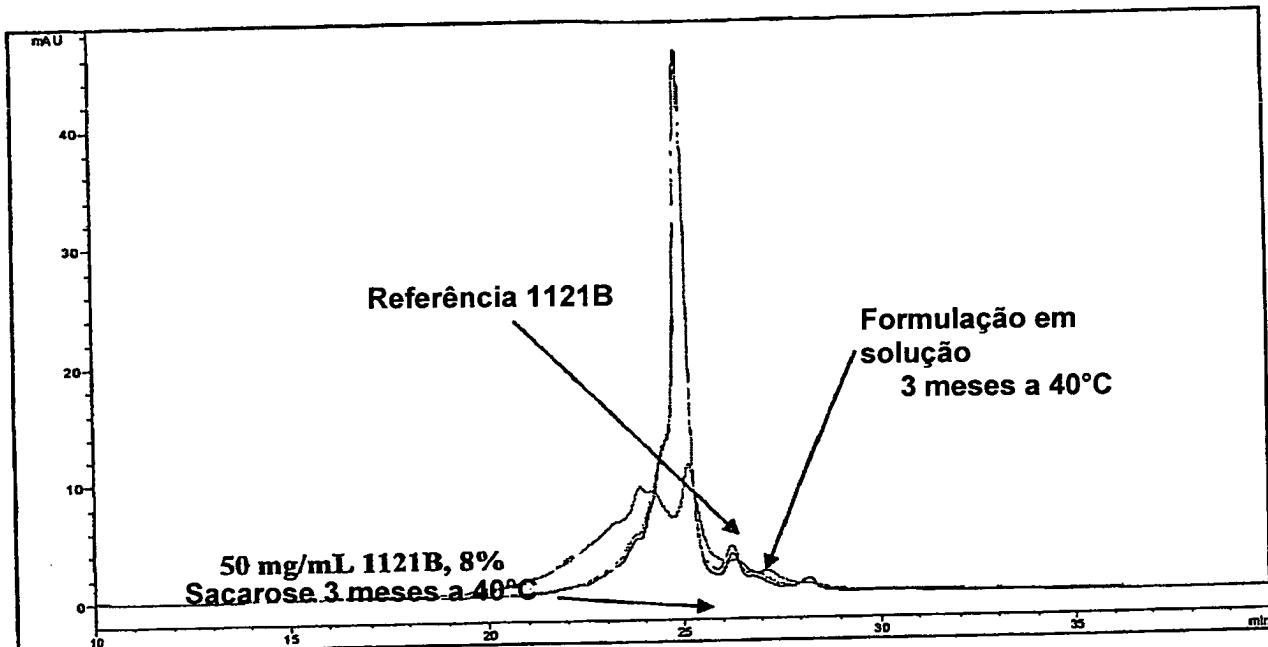


Fig. 29

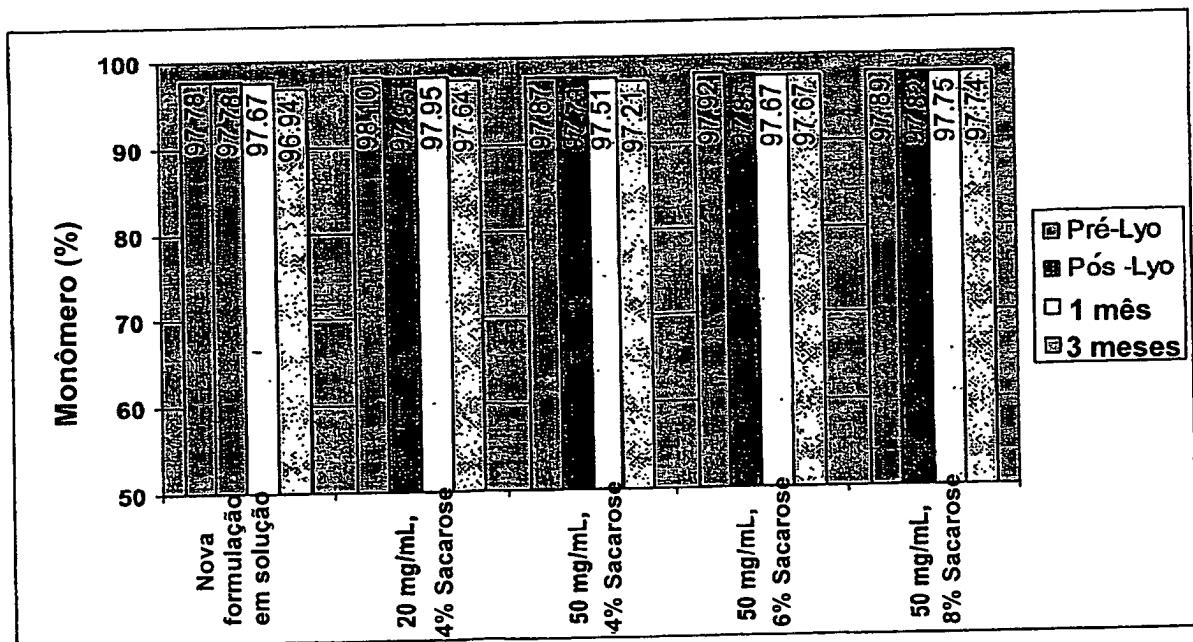


Fig. 30

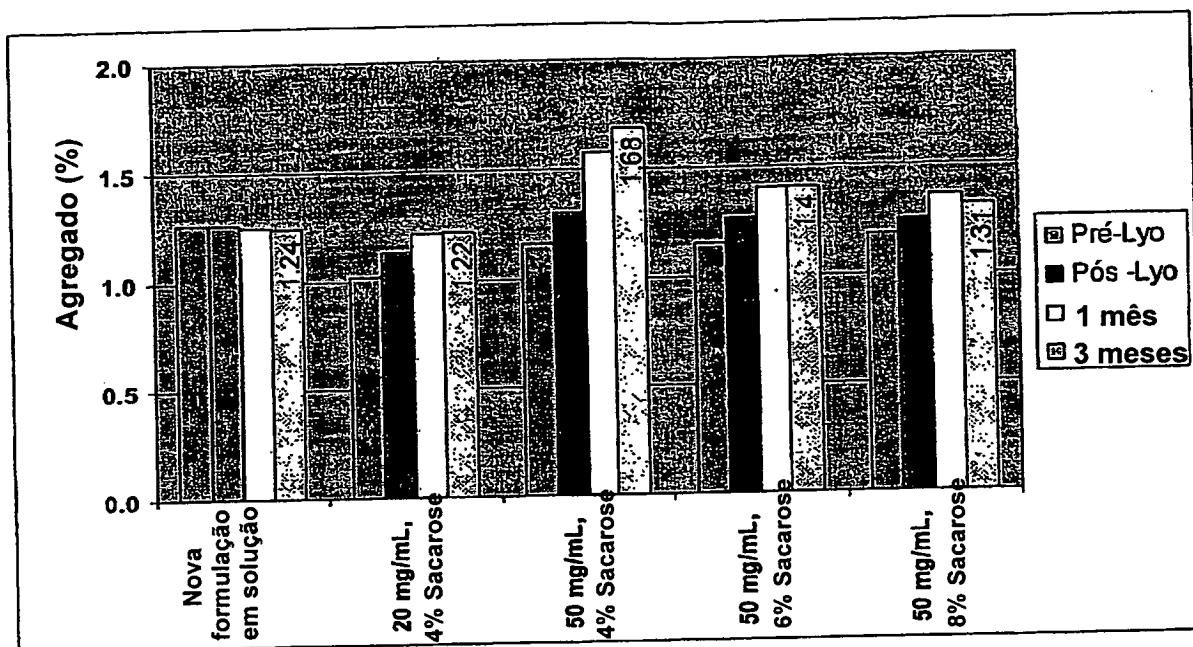


Fig. 31

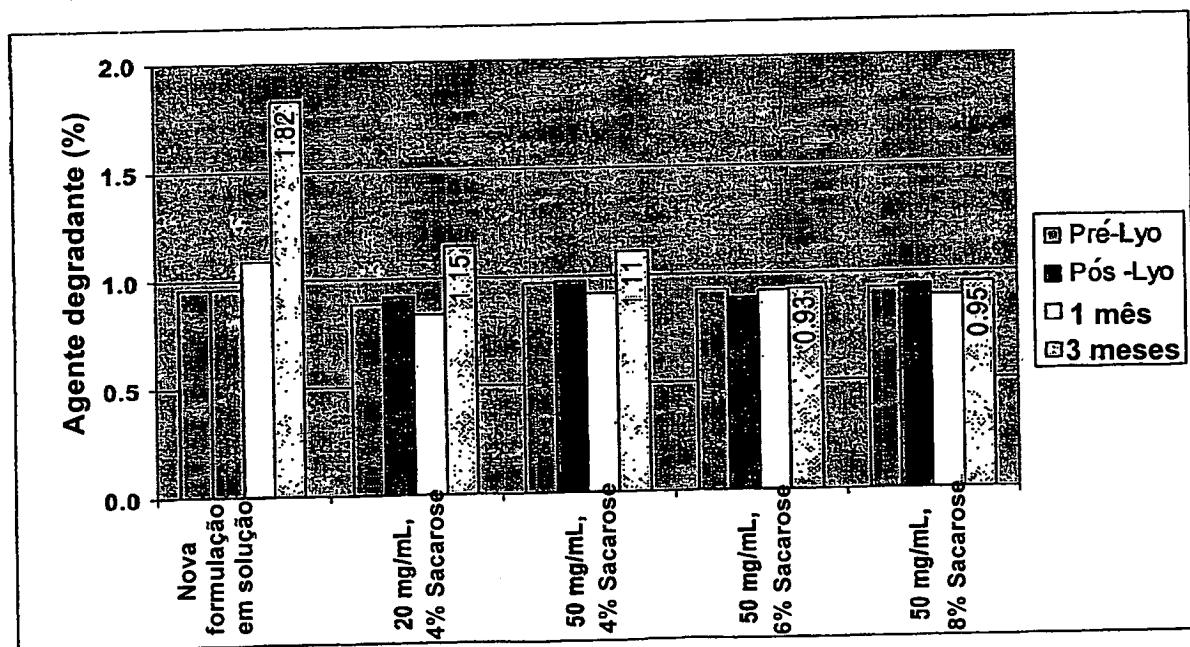


Fig. 32

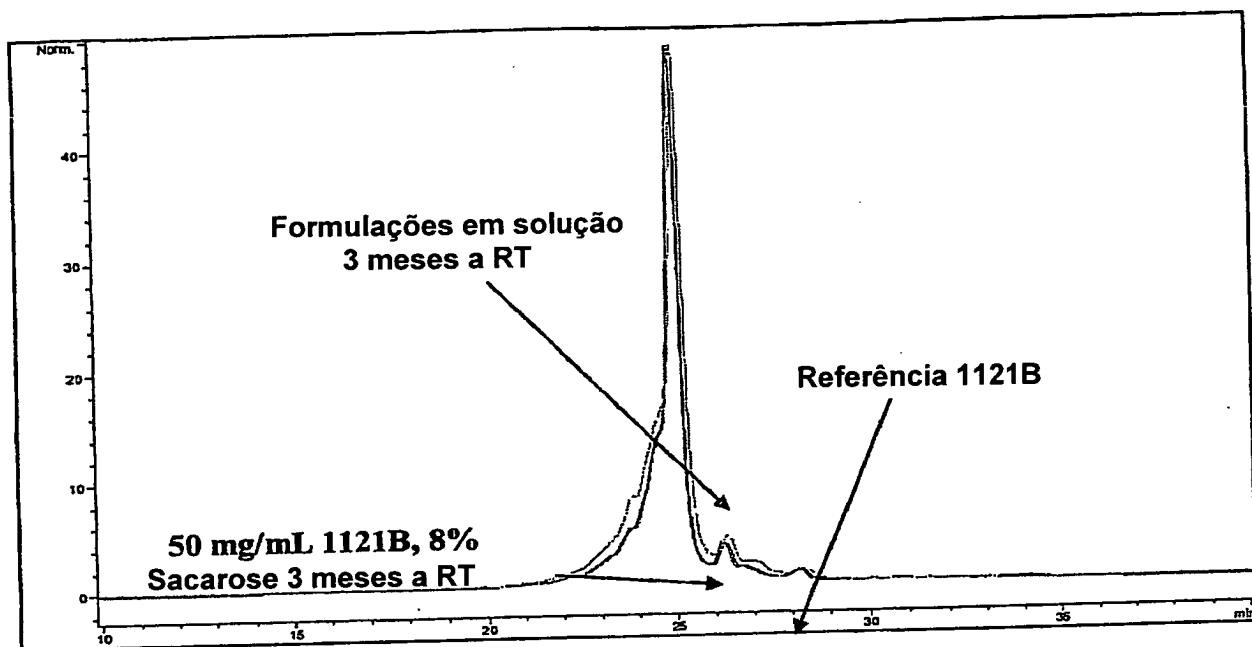


Fig. 33

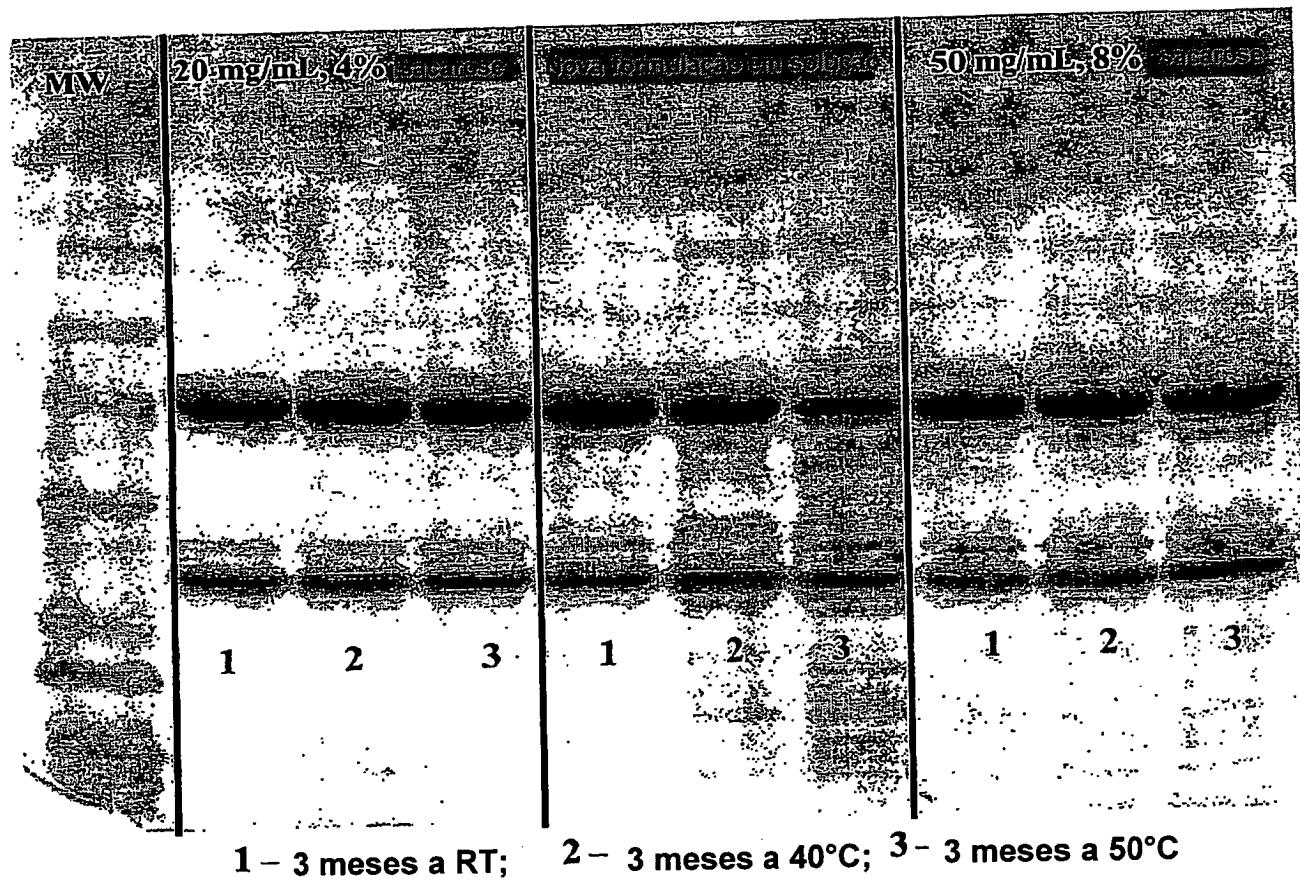


Fig. 34

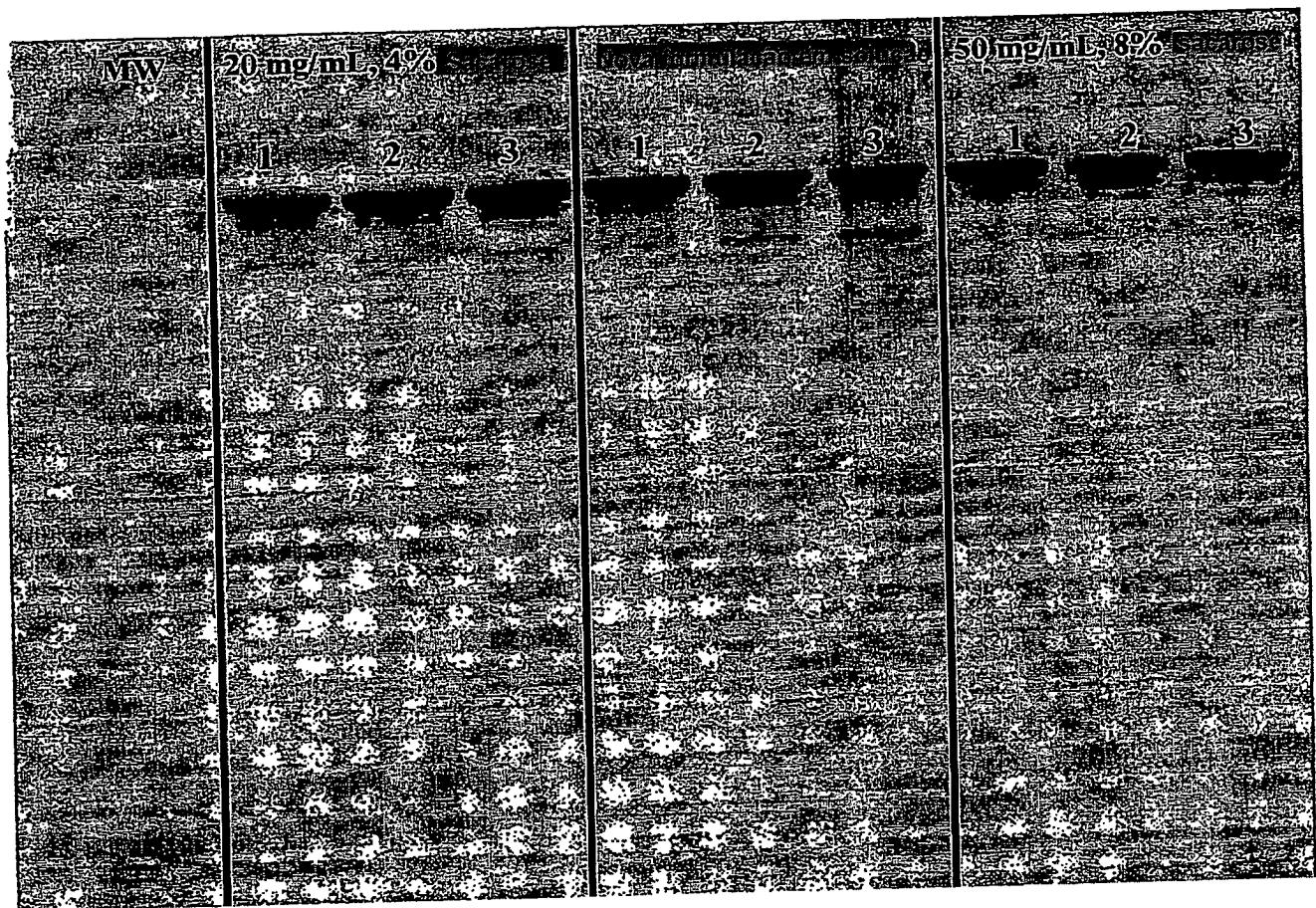


Fig. 35

RESUMO**“FORMULAÇÃO, E, MÉTODO DE TRATAMENTO”**

A presente invenção provê formulações e métodos para a estabilização de anticorpos. Em uma forma de realização, a invenção provê a formulação estável de anticorpos que são propensos à fragmentação não enzimática na região da articulação. Em uma outra forma de realização, a invenção provê métodos de estabilização de anticorpos compreendendo a liofilização de uma formulação aquosa de um anticorpo. As formulações podem ser liofilizadas para estabilizar os anticorpos durante o processamento e armazenamento, e então as formulações podem ser reconstituídas para administração farmacêutica. Em uma forma de realização, a presente invenção provê métodos de estabilização de anticorpos anti-VEGFR compreendendo a liofilização de uma formulação aquosa de um anticorpo anti-VEGFR. As formulações podem ser liofilizadas para estabilizar os anticorpos anti-VEGFR durante o processamento e armazenamento, e então as formulações podem ser reconstituídas para administração farmacêutica.