

CAVELIER

ABOGADOS

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTÁ 8, COLOMBIA

Teléfono: (57-1) 347 3611
Telefax: (57-1) 211 8650
(57-1) 700 4814
Fax in U.S.A.: (1-305) 675 7743

Señor Director

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES

Superintendencia de Industria y Comercio

E. S. D.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-050507- -00007-0000

Fecha: 2012-04-19 16:34:56 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 96

Trámite : 011

Evento : 378

Actuación : 444

Referencia : Expediente No. 06.050.507
Asunto : Solicitud de Patente para:
FORMAS SÓLIDAS DE ANTICUERPOS ANTI-EGFR
Solicitante : **MERCK PATENT GMBH**
Fecha de Solicitud : 25 de Mayo de 2006

1. Yo, Luz Clemencia de PAEZ, obrando como apoderada del solicitante en el asunto antes identificado, me refiero al Oficio No. 19418 notificado por fijación en lista del 15 de Diciembre de 2011.

2. Mediante memorial radicado el día 07 de Marzo de 2012 solicité plazo de treinta (30) días para atender el oficio No. 19418.

3. Mediante el Oficio No. 19418 se puso en conocimiento del solicitante el informe del examen de fondo que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente.

4. Novedad

Para la evaluación de este requisito, el Examinador ha citado la anterioridad D5 correspondiente al documento US 6 217 866: "*Monoclonal antibodies specific to human epidermal growth factor receptor and therapeutic methods employing same*", y determina que este afecta la novedad de la presente solicitud, puesto que ya eran conocidas las características esenciales del procedimiento reclamado en la presente solicitud.

5. Nivel Inventivo

De acuerdo con el Examinador, el procedimiento para la preparación de un cristal de anticuerpo anti-EGFR, resulta evidente para el técnico medio en la materia, partiendo de los anticuerpos y obtención de los mismos de acuerdo a D5, y el proceso de purificación enseñado en D4 (Amersham Biosciences: "*Antibody purification handbook*"); razón por la cual no se puede atribuir altura inventiva a la presente solicitud.

6. Respuesta a las objeciones

De este modo y con el objeto de atender las objeciones arriba mencionadas, se pone de presente al Despacho las siguientes modificaciones, aclaraciones y argumentos:

6.1. Modificación a una Solicitud en Trámite

De conformidad con lo establecido en los artículos 34 y 36 de la Decisión 486, que permite al solicitante en cualquier momento del trámite efectuar modificaciones y divisiones sin ampliar el objeto de la invención inicialmente solicitada, me permito presentar un nuevo capítulo reivindicatorio, que comprende 4 reivindicaciones.

De esta manera, la nueva reivindicación 1 limita la presente solicitud al proceso de preparación de un cristal de Mab C225 (Cetuximab), caracterizado porque al anticuerpo disuelto o suspendido en un medio acuoso, se añade un reactivo de precipitación, en la presencia de un búfer adecuado. Dicho reactivo de precipitación se selecciona entre etanol y citrato de sodio, y sulfato de amonio y fosfato de potasio. Posteriormente, el producto de precipitación se separa del mismo. Sustento de la anterior modificación puede encontrarse en los ejemplos 2 y 3 de la memoria descriptiva.

Adicionalmente, las nuevas reivindicaciones 2 a 4 definen la composición farmacéutica que comprende un cristal del anticuerpo activado biológicamente, caracterizado porque el anticuerpo puede estar presente a una concentración entre 10-200 mg/ml, y preferiblemente, entre 50 y 150 mg/ml.

Por otro lado, se desea poner de presente que junto con el presente memorial, se presenta una solicitud divisional, la cual reivindica el procedimiento de preparación de un cristal de anticuerpos anti-EGFR, caracterizado porque comprende las etapas de: disolver o suspender la proteína del anticuerpo anti-EGFR (cetuximab ó EMD 72000) en un medio acuoso; añadir un reactivo de precipitación en presencia de un búfer apropiado, a un pH entre 4 y 10, y a una temperatura entre -10°C y 40°C; y separar el producto de precipitación del mismo.

Con base en lo anterior, el título de la solicitud inicial y de la solicitud divisional permanece como: **“FORMAS SÓLIDAS DE ANTICUERPOS ANTI-EGFR”**, ya que este refleja la naturaleza de la materia reclamada en ambas solicitudes.

Por lo tanto, solicitamos atentamente tener en cuenta el nuevo capítulo reivindicatorio que se presenta, el cual cumple con las disposiciones de la Decisión 486.

6.2. Argumentos a favor de la patentabilidad de la invención

Siguiendo los lineamientos de los artículos 16 y 18 de la Decisión 486 se tiene que:

- una invención será considerada novedosa si provee por lo menos una diferencia técnica con respecto al estado del arte más cercano; y
- una invención posee nivel inventivo si no puede ser derivada de manera obvia a partir del arte previo y/o si provee mejoras o un efecto inesperado sobre dicho arte previo.

Ahora bien, el Examinador ha citado el documento D5 y manifiesta que dicho documento afecta la novedad de la presente solicitud, ya que dicho documento revela la forma de purificación del anticuerpo de Cetuximab por precipitación con sulfato de amonio, a una temperatura de 4°C y pH de 7.5.

No obstante, se le aclara a su Despacho que el documento citado D5 (US 6 217 866) no revela específica **un cristal de Cetuximab** (forma sólida), el cual se mantiene como una proteína biológicamente activa, cuando se disuelve o se suspende en un medio acuoso. De igual manera, el documento citado falla en enseñar el proceso de preparación del cristal antes mencionado, y mucho menos, las condiciones para la preparación especificadas en la presente solicitud.

Por otro lado, el Examinador considera que la presente solicitud carece de nivel inventivo a la luz de las enseñanzas de los documentos D4 y D5. A este respecto manifestamos nuestro desacuerdo con el análisis llevado a cabo y con las conclusiones derivadas del mismo y solicitamos la reconsideración de la objeción, con base en los siguientes argumentos:

Inicialmente, se llama la atención del Señor Examinador al hecho que el objetivo de la presente invención es el de proporcionar cristales de Cetuximab para aplicaciones farmacéuticas, que conducen a la proteína de anticuerpos biológicamente activos, a través de su disolución o suspensión en un medio acuoso; así como también proporcionar un procedimiento para la preparación de tales cristales de Cetuximab que conducen a un alto rendimiento y pureza del producto, lo que representa una disminución en el consumo de tiempo, y reducción de costos

asociados con la producción en comparación con los procedimientos descritos en el estado de la técnica anterior.

Particularmente, el objetivo de la presente invención es el de proporcionar un procedimiento para la preparación de cristales de Cetuximab que conducen a anticuerpos proteicos biológicamente activos a través de la disolución o suspensión en un medio acuoso, sin la adición obligatoria de agentes farmacológicamente no aceptables, tales como CHES, imidazol, TRIS, cloruro de magnesio (II), cloruro de zinc (II), sulfato de cobre (II), 2-propanol, 2-metil-2,4-pentanodiol, HEPES, sulfato de litio, etoxietanol o detergentes, tales como polisorbato 80 o 20, como era usado antes de la presente invención.

La solución al objetivo arriba mencionado la proporciona la invención bajo estudio, en la cual el proceso de preparación de los cristales se caracteriza porque al anticuerpo proteico disuelto o suspendido en un medio acuoso:

(i) se añade una precipitación de reactivos en la presencia de un regulador adecuado, dicha precipitación de reactivos es seleccionada de un grupo consistente en sulfato de amonio, acetato de sodio, citrato de sodio, fosfato de potasio, PEG, etanol y mezclas de los mismos,

(ii) de allí el anticuerpo proteico se precipita, y

(iii) el producto de precipitación se separa, formando un cristal de Mab C225 (Cetuximab).

De esta manera, los cristales obtenidos pueden ser usados directamente para aplicaciones farmacéuticas, especialmente, en formulaciones altamente concentradas.

Ahora bien, aun cuando el documento citado D4 enseña diversas técnicas de purificación de anticuerpos, no se proporciona indicio alguno de cómo y bajo qué condiciones se debe cristalizar el Cetuximab, de forma que, a pesar de encontrarse en estado sólido, se mantengan los anticuerpos biológicamente activos; o que las técnicas de purificación enseñadas resulten exitosas para separación específica de los cristales, sin alterar la actividad de los mismos.

En este sentido, respetuosamente solicitamos al Señor Examinador tener en cuenta que cada anticuerpo requiere de condiciones de cristalización específicas determinadas mediante procedimientos experimentales extensos, puesto que los anticuerpos son proteínas grandes, complejas y tridimensionales, que difieren entre sí con respecto a su estructura molecular, peso, glicosilación y flexibilidad segmental estructural, y por tanto, con respecto a sus condiciones de cristalización.

Adicionalmente, se debe recordar que el objetivo de la cristalización de un anticuerpo terapéutico es el de obtener anticuerpos que son innatos, por ejemplo, de efectos terapéuticos. Con base en lo anterior, y aunque el documento D5 enseña las líneas celulares de hibridomas que producen anticuerpos monoclonales específicos al receptor del factor de crecimiento epidermal, dicho

documento no contiene enseñanzas para la formación de cristales a partir de los mismos (etapa de cristalización exitosa del anticuerpo), o que dichos cristales resulten biológicamente activos.

Como sustento de los anteriores argumentos, se llama la atención de su Despacho al ejemplo 8 de la presente solicitud, el cual muestra que al aplicar métodos de cristalización diseñados para otros anticuerpos los resultados finales resultaron insatisfactorios.

En contraste, el ejemplo 7 de la presente solicitud demuestra la formación de los cristales según el procedimiento de la invención bajo estudio. A partir de los datos obtenidos con el método FTIR (*Fourier transform infrared spectra*), fue posible observar que la integridad estructural del anticuerpo antes y después de la cristalización permaneció constante, así como su eficacia y actividad biológica (ver también las páginas 42 y 43).

De esta manera, queda demostrado que todos y cada uno de los anticuerpos terapéuticos requieren de un protocolo de cristalización específico, por lo que resulta claro que D4 falla en describir las condiciones específicas para la preparación de cristales de Cetuximab. Además, D4 simplemente describe la precipitación de anticuerpos protéicos, pero no la cristalización estos, que permanecen en un estado biológicamente activo cuando se disuelven o suspenden en un medio acuoso.

En vista de lo anterior, se puede concluir que en el momento de la invención, no resultaba obvio modificar las enseñanzas de D4 y D5 para que una persona versada en la materia logre alcanzar el resultado reclamado en la presente solicitud y así solucionar el problema técnico en cuestión, puesto que ninguno de los documentos citados enseña la forma de cristalización y separación específica para la obtención de cristales de Cetuximab.

Por lo tanto, consideramos que los documentos D4 y D5 no son anterioridades válidas capaces de afectar los requerimientos de patentabilidad de la presente solicitud, toda vez que la materia reclamada es diferente a lo descritos en el estado del arte, y una persona medianamente versada en la materia tuvo que emplear habilidad inventiva para llegar a la solución técnica reivindicada.

7. Conclusiones

Finalmente, puesto que se han atendido a cabalidad las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente, respetuosamente solicito se continúe con su tramitación. Sin embargo, en el evento que el Despacho considere que una modificación adicional es necesaria, respetuosamente le solicito hacer uso de la facultad que le otorga el artículo 45 inciso 2 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina a efecto de requerir nuevamente de nuestra parte cualquier complementación o aclaración.

8. Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio correspondiente a la solicitud inicial, conformado por cuatro (4) reivindicaciones.
- Capitulo descriptivo correspondiente a la solicitud divisional.
- Nuevo pliego reivindicatorio correspondiente a la solicitud divisional, conformado por seis (6) reivindicaciones.
- Formulario para modificaciones.
- Formulario de división de la solicitud de patente.
- Comprobantes de pago por concepto de presentación de nueva solicitud.
- Copia autenticada del poder otorgado por MERCK PATENT GMBH al Doctor Emilio Ferrero.
- Copia autenticada de la sustitución del poder otorgado por la Sociedad Solicitante realizada por el Doctor EMILIO FERRERO a mi favor, y para lo cual solicito me sea reconocida personería para continuar con el trámite del asunto de la referencia.

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PAÉZ

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

COLO-09266-841-014-2

COLO-09266-841-031-6

LLG\LLG\ID-215098WPCL9266

No. M-2012-215098\LLG



Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO UNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES

1

SOLICITUD DE:
☐ Corrección de Error Material ☒ Modificación a una solicitud

2

SOLICITANTE

Nombre: MERCK PATENT GMBH
Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Alemania.

Dirección: Frankfurter Strasse 250,
Darmstadt 64293
Alemania

Domicilio: Darmstadt 64293
Alemania

Teléfono: 347 36 11 Fax: 211 86 50
E-mail: clientes@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Número: _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: Luz Clemencia de PAEZ

Dirección: Carrera 4ª No. 72-35

Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11
E-mail: cavelier@cavelier.com

IDENTIFICACION

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Número: 35.456.344 TP 23.555

4

Número de expediente: 06.050.507

5

Descripción de la corrección o modificación solicitada:

Presento nuevo capítulo reivindicatorio compuesto por 4 reivindicaciones con el fin de superar las objeciones hechas por Su Despacho a la presente solicitud de patente y pido respetuosamente que el examen de patentabilidad sea realizado sobre estas nuevas reivindicaciones presentadas.

6

Comprobante de pago No. _____ Fecha: _____

7

Anexos

☐ Comprobante de pago de la tasa por \$120.000.oo, por concepto de modificaciones.
☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por.
☐ Poderes, si fuere el caso
☐ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.
☐ Copia auténtica de la sustitución que del poder otorgado por la Sociedad Solicitante hizo el Doctor EMILIO FERRERO a mi favor, y para lo cual solicito me sea reconocida personería para continuar con el trámite del asunto de la referencia.

8	NOMBRE:	LUZ CLEMENCIA DE PAEZ	FIRMA:	<u>Luz Clemencia De Paez</u>
				C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P.A. 23.555
LLG				

en



Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO ÚNICO DE CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1 SOLICITUD DE: ☐ Conversión. ☒ División ☐ Fusión ☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Registro de Diseño Industrial ☐ Esquemas de Trazado para Circuitos Integrados		
2 SOLICITANTE (71)	Nombre: MERCK PATENT GMBH Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Alemania. Dirección: Frankfurter Strasse 250, Darmstadt 64293 Alemania Domicilio: Darmstadt 64293 Alemania Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70 E-mail: clientes@cavelier.com	IDENTIFICACIÓN C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número _____
3 REPRESENTANTE O APODERADO	Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35 Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11 E-mail: cavelier@cavelier.com	IDENTIFICACIÓN C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Cual _____ Número 35.456.344 T.P 23.555
4 CONVERSIÓN Expediente No: _____ De: _____ A: _____	5 DIVISIÓN Expediente No: 06.050.507 No. de Divisionales: 1	6 FUSIÓN Expediente No: _____ Expediente No: _____
7 Comprobante de pago No.: 12-0032563 Fecha: 02 de abril de 2012		
8 Anexos ☒ Comprobante de pago de la tasa por \$590.000.00 ☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por. ☒ Poderes, si fuere el caso ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas. ☒ Copia de la Solicitud Divisional.		
9 NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ FIRMA : C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555		

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 06.050.507. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. 19418 notificado por fijación en lista del 15 de diciembre de 2011. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 25 de mayo de 2006 y la prioridad que allí se reivindica del 29 de noviembre de 2003.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 06.050.507

REIVINDICACIONES

1. Un proceso para la preparación de un cristal de Mab C225 (cetuximab) el cual resulta en una proteína de anticuerpo biológicamente activa por disolución o suspensión en medio acuoso, caracterizado en que al anticuerpo Mab C225 (cetuximab) o Mab h425 (EMD 72000) disuelto o suspendido en un medio acuoso, se añade un reactivo de precipitación, en la presencia de un búfer adecuado, siendo que dicho reactivo de precipitación es seleccionado a partir del grupo que consiste:
 - a. etanol y citrato de sodio, y
 - b. sulfato de amonio y fosfato de potasio,y el producto de precipitación es separado del mismo.
2. Una composición farmacéutica que comprende por lo menos un cristal obtenido mediante un proceso según la reivindicación 1, y los excipientes y/o adyuvantes.
3. La composición farmacéutica según la reivindicación 2, caracterizada en que la concentración de anticuerpo es de 10 - 200 mg/ml.
4. La composición farmacéutica según la reivindicación 3, caracterizada en que la concentración de anticuerpo es 50 - 150 mg/ml.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO ÚNICO DE CONVERSIÓN, DIVISIÓN Y FUSIÓN DE SOLICITUDES

1

SOLICITUD DE:
☐ Conversión. ☒ División ☐ Fusión

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad
☐ Registro de Diseño Industrial ☐ Esquemas de Trazado para Circuitos Integrados

2

SOLICITANTE
(71)

Nombre: MERCK PATENT GMBH
Sociedad constituida y existente bajo las leyes de Alemania.

Dirección: Frankfurter Strasse 250,
Darmstadt 64293
Alemania

Domicilio: Darmstadt 64293
Alemania

Teléfono: 546 09 70 Fax: 249 40 70
E-mail: clientes@cavelier.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número _____

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 36 11 Fax: 217 92 11
E-mail: cavelier@cavelier.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Cual _____
Número 35.456.344 T.P. 23.555

4

CONVERSIÓN

Expediente No: _____
De: _____
A: _____

5

DIVISIÓN

Expediente No: 06.050.507
No. de Divisionales: 1

6

FUSIÓN

Expediente No: _____
Expediente No: _____

7

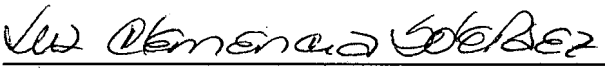
Comprobante de pago No.: 12-0032563 Fecha: 02 de abril de 2012

8

Anexos
☒ Comprobante de pago de la tasa por \$590.000.00
☐ Comprobante de pago por reivindicaciones adicionales después de la décima reivindicación por.
☒ Poderes, si fuere el caso
☒ Documento que acredita la existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.
☒ Copia de la Solicitud Divisional.

9

NOMBRE: LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

FIRMA : 

C.C. 35.456.344 de Usaquén T.P. 23.555

LLG

NOTA: Esta es una solicitud de división de la materia contenida originalmente en la solicitud de patente No. 06.050.507. La solicitud de división de la materia se hace como consecuencia de las observaciones hechas por ese Despacho y que fueron dadas a conocer al solicitante por medio del oficio No. 19418 notificado por fijación en lista del 15 de diciembre de 2011. Por lo tanto pido que esta solicitud de división de materia sea tratada con el beneficio de presentación de la solicitud original, esto es 25 de mayo de 2006 y la prioridad que allí se reivindica del 29 de noviembre de 2003.

Nota: La copia básica original se encuentra en el expediente No. 06.050.507

Representación y Poder con autenticación notarial y Apostille para patentes, modelos de utilidad, diseños industriales, marcas de fábrica, nombres comerciales, enseññas, nombres de dominio, lemas comerciales, licencias. 005

Representation and Power-of- Attorney with notarial authentication and Apostille for patents, utility models, industrial designs, trademarks, commercial names, trade emblems, domain names, slogans, licenses.

REPRESENTACION Y PODER

REPRESENTATION AND POWER- OF- ATTORNEY

Yo (nosotros), abajo firmado (s)/I (we), the undersigned

MERCK PATENT GMBH

domiciliado (s) en/of Frankfurter Strasse 250, 64293

Darmstadt, República Federal de Alemania

Hereby ratify the patent applications numbers 05.099.907 and 05.105.366 filed by Emilio Ferrero on October 3 and 14, 2005, respectively, and

por el presente nombramos a EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciliados en la Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, en obediencia a lo dispuesto en el parágrafo 1o del Artículo 543 del Código de Comercio, el primero como principal y los demás como suplentes, en su orden, como mis (nuestros) representantes en todos los asuntos de propiedad industrial con facultad para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales. El primer representante suplente reemplazará al principal en caso de ausencia o impedimento temporal o definitivo de aquél. La misma regla se aplicará cuando el segundo representante suplente haya de reemplazar al primero, o el tercero al segundo. En tales casos, el representante principal, o el primero, o segundo suplente, en su caso, o ambos, declararán su intención de no ejercer la representación mediante declaración autenticada por Notario Público en Colombia, o por Notario u otro Funcionario Público, o Cónsul de Colombia, en el extranjero; y si se tratare de impedimento, con el certificado respectivo. Si alguno de los nombrados faltare definitivamente, el siguiente tomará su lugar. Cuando cesare la ausencia o impedimento del representante principal, o de su primero o segundo suplentes, en su caso, podrán ejercer la representación, en su orden, uno u otros según el caso, asumiéndola por el solo hecho de ejercerla, cesando en ese momento el ejercicio de la representación por el primero, segundo o tercer suplente en su caso.

Además, confiero (conferimos) poder a los abogados arriba nombrados, para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial y contra la competencia desleal, a cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante cualesquiera entidades o personas, ejerzan o no jurisdicción, especialmente ante las del orden administrativo, contencioso administrativo y judicial, así como los tribunales de arbitramento, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, y diseños industriales; el registro de marcas de fábrica, colectivas, defensivas, de servicio, lemas comerciales, nombres comerciales, enseññas, nombres de dominio, variedades vegetales y denominaciones de origen; su renovación, traspaso, cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria; y el registro de licencias de uso de esos derechos; b) Las acciones de competencia desleal, protección del consumidor, oposiciones u observaciones, cancelación administrativa y judicial, nulidad, medidas cautelares, concesión de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso administrativos relacionados con

in due compliance with the terms of paragraph 1st. of article 543 of the Commercial Code, do hereby appoint EMILIO FERRERO, tpa. 31929; GONZALO PERDOMO, tpa. 831; LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa. 23555 and GERMAN CAVELIER, tpa. 832, domiciled at Carrera 4ª N° 72-35, Bogotá, Colombia, the first as principal and the others as alternates, in the order of their appointment, as our representatives for all industrial property matters with faculty to receive notifications and to appoint attorneys in and out of Court. The first alternate shall replace the principal in case of his absence or of temporal or definitive impediment. The same rule will apply when the second alternate representative is to replace the first one, or when the third is to replace the first or second alternates in their turn, or both of them, second. In such cases, the principal representative, or the first or second alternates in their turn, or both of them, shall state their intention not to act as representatives through a declaration given before a Notary Public in Colombia, or before a Notary or another Public Official or a Colombian Consul abroad; and in case of impediment, the appropriate certificate shall suffice. If any of the appointees were to be definitely absent, the following alternate shall take his place. When the absence or impediment of the principal representative, or of the first or second alternate in their turn ceases, the representation can be taken again in their sequence, by the principal, the first or second alternate depending on case, and the mere fact or its exercise will suffice. The exercise of the representation by the first, second or third alternates in their turn shall end at such time.

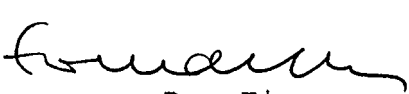
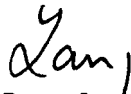
In addition, we grant a Power of Attorney in favor of the above named attorneys at law so that they may obtain the protection of my (our) industrial property and against the unfair competition, for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before any authorities or persons, with or without jurisdiction, specially those administrative, administrative contentious and judicial, as well as before Arbitration Court, in all matters concerning the following: a) Obtainment of patents, utility models and industrial designs; the registration of trademarks, collective, defensive and service marks, slogans, commercial names, trade emblems, domain names, vegetal varieties and denominations of origin; its renewal, assignment, change of name or domicile, voluntary cancellation; and the registration of licenses of use of the above rights; b) Actions of unfair competition, protection to the consumer, oppositions or observations, administrative or Court cancellation, nullity, infringement, granting of licenses, the action for writ of mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal and administrative suits relating to those rights; actions and suit instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matter

estos derechos, acciones y procesos que promovamos o se nos promuevan. Y para que en todos los asuntos arriba determinados, puedan sustituir este mandato, transigir, conciliar, admitir los hechos del proceso, desistir, cancelar, recibir, renunciar, y ratificar los actos de agentes oficiosos.

they may substitute this Power of Attorney, compromise, conciliate, admit the facts of the case, desist, cancel, receive, resign, and ratify acts done by representatives without a power of attorney.

Dado y firmado hoy/Given and signed this _____
en/in _____
por/by _____

Firma	Signature
Merck Patent GmbH	
i.V.	i.V.

	
Dr. Eiermann	Dr. Lang

CERTIFICACION NOTARIAL (SOCIEDAD)

El infrascrito Notario Certifica: Que la firma que antecede de Dr. Volker Eiermann y Dr. Ulrich Lang es auténtica; que el signatario desempeña actualmente el cargo de Representantes de la compa a MERCK PATENT GMBH

sociedad que actualmente existe y está organizada de acuerdo a las leyes de la República Federal de Alemania

que la dirección de dicha compa a es Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt, República Federal de Alemania

y que el signatario tiene facultad para otorgar este documento.

Todos los hechos anteriores le constan por haber examinado los documentos respectivos y de todo ello da fe.

Dado y firmado en Darmstadt

El 14 noviembre 2005

NOTARIAL CERTIFICATION (COMPANY)

The undersigned Notary certifies: That the preceding signature of Dr. Volker Eiermann and Dr. Ulrich Lang is authentic, that the signatory currently acts in the position of Representatives of the company MERCK PATENT GMBH

a company currently existing and organized under the laws of Germany

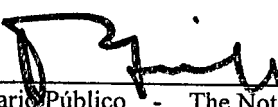
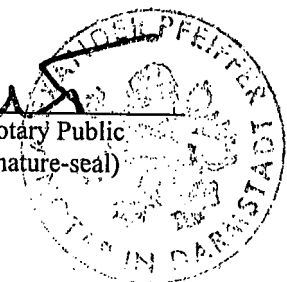
that the address is Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt, Germany

and that the signatory has the power to grant this document.

The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.

Given and signed in Darmstadt

On 14 NOV. 2005


El Notario Público (Firma-sello) The Notary Public (Signature-seal)


APOSTILLE
(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country:
This public document

2. has been signed by

3. acting in the capacity of

4. bears the seal/stamp of

Certified

5. at 6. the

7. by

8. No.

9. Seal/stamp 10. Signature

.....

nulidad, medidas cautelares, conces n de licencias, la tutela, la protección de secretos industriales, y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso-administrativos relacionados con mandamus, the protection of trade secrets, and in general the civil, penal, and administrative suits relating to those rights; actions and suits instituted by me (us) or against me (us). And that in all the above matters

File No. 580/2005

I hereby certify, that the above are the true signatures, subscribed today at
Frankfurter Straße 250 in Darmstadt in my presence, of

1) Mr. Dr. Volker Eiermann

2) Mr. Dr. Ulrich Lang

business address: D-64293 Darmstadt, Frankfurter Straße 250,
both identified by German identity card.

The notary public asked the appeared whether he or any member of his
firm hat acted in the matter which is the subject of this instrument, except in
a notarial matter. The appeared denied.

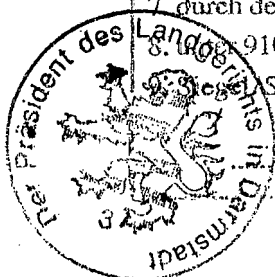
Darmstadt, the 14th day of November 2005

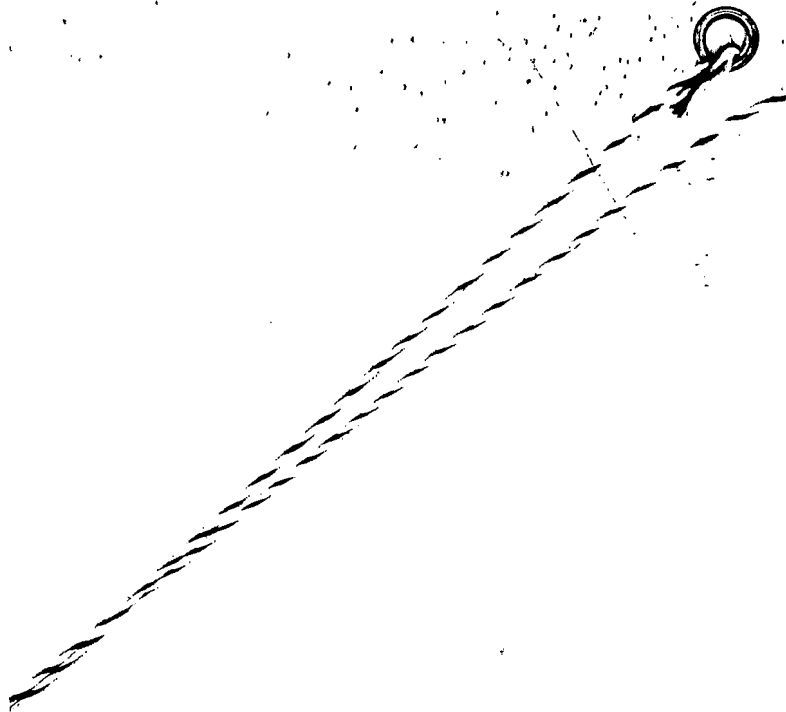


[Signature]
Pfeiffer -

notary Public

APOSTILLE (Convention de La Haye du 5 octobre 1961)	
1. Land: Bundesrepublik Deutschland Diese öffentliche Urkunde	
2. ist unterschrieben von <u>Alexander Pfeiffer</u>	
3. in seiner Eigenschaft als ... Notar	
4. sie ist versehen mit dem Stempel Stempel des Notars <u>Alexander Pfeiffer in Darmstadt</u>	
Bestätigt	
5. in Darmstadt	6. am <u>16. Nov. 2005</u>
7. durch den Präsidenten des Landgerichts	
8. <u>910 E 2/1 - 1930/05</u>	
9. <u>Stempel</u>	
10. Unterschrift	
In Vertretung	
<u>[Signature]</u>	
Schichor	





18

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 03.12/05 preparada por María Elvira Martelo, traductora oficial aprobada por el Ministerio de Justicia mediante resolución 2879 de 1999 y reconocida por el Ministerio de Relaciones Exteriores.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de Representación y Poder escrito en inglés y español, por el cual **MERCK PATENT GMBH**, domiciliada en Frankfurter Strasse 250, 64293, Darmstadt, República Federal de Alemania, ratifica las solicitudes de patente números 05.099.907 y 05.105.366 presentadas por Emilio FERRERO los días 3 y 14 de octubre, respectivamente, de 2005, y otorga poder a **EMILIO FERRERO, GONZALO PERDOMO, LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ y GERMÁN CAVELIER**.

Merck Patent GmbH

i.V.
(Firma ilegible)
Dr. Eiermann

i.V
(Firma ilegible)
Dr. Lang

CERTIFICACIÓN NOTARIAL (SOCIEDAD) otorgada en inglés y español con respecto a autenticidad de las firmas del Dr. Volker Eiermann y del Dr. Ulrich Lang y la existencia legal de MERCK PATENT GMBH.

Dado en Darmstadt el 14 de noviembre de 2005

Expediente No. 580/2005

Por el presente certifico que las anteriores son las firmas genuinas, otorgadas hoy en Frankfurter Strasse 250, Darmstadt, en presencia por

1. Sr. Dr. Volker Eiermann
2. Sr. Dr. Ulrich Lang

Dirección comercial: D-64293 Darmstadt, Frankfurter Strasse 250, ambos identificados con tarjeta de identidad de Alemania.

19

El notario público preguntó a cada uno de los comparecientes si él o algún miembro de su firma había actuado en el asunto objeto de este instrumento de alguna forma diferente a un asunto notarial. Los comparecientes respondieron que no.

Darmstadt, 14 de noviembre de 2005

(Firma ilegible)

(Sello del Sr. ALEXANDER PFEIFFER, Pfeiffer

NOTARIO DE DARMSTADT

Notario público

Apostilla otorgada en la República Federal de Alemania el 16 de noviembre de 2005 bajo el No. 910 E 2/1 – 1930/05.

Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 09266-841-011-8

WPCL 9266 - ID 405

DIC 07/05

Maria E. Martelo
TRADUCCION No.: 03
MARIA ELVIRA MARTELO
Traductora e Interprete Oficial
Inglés - Español - Inglés
Res. No. 2879 Min. Justicia

RECEIVED
2005 NOV 16 PM 10:00
DARMSTADT
NOTARIAT

21 E 2/1

RECEIVED
2005 NOV 16 PM 10:00
DARMSTADT
NOTARIAT

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCUITO DE SANTAFE DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE

María Elvira Martelo

CANCIÓN DE LA FIRMA REGISTRADA POR
LA(S) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA

12 DIC 2005

COPIA FIDEL

PAOLO MENDEZ
BARAJAS

Notario Sexto Bogotá

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 DIC 12 P R 45

W
JEFE DE LEGALIZACIONES,
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

396375

María Elvira Martelo
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

TRADUCCION OFICIAL No. 11059

de un documento escrito en Alemán, efectuada por Luz Arriaga de Herber, resolución del Ministerio de Justicia 599 del 6 de marzo 1978.-

Traducción de la legalización y apostilla en alemán que se encuentran a continuación de un documento de ratificación, representación y poder, escrito en español e inglés, por medio del cual MERCK PATENT GMBH, domiciliada en Frankfurter Strasse 250, 64293, Darmstad, República Federal de Alemania, ratifica las solicitudes de patentes No. 05.099.907 y 05.105.366 presentadas por Emilio Ferrero el 3 y 14 de octubre 2005, respectivamente, y nombra como sus representantes a EMILIO FERRERO tpa 31929, GONZALO PERDOMO tpa 831, LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, tpa 23555 y GERMAN CAVELIER, tpa 832, domiciliados en la Carrera 4. No. 72-35, Bogotá. Dado y firmado por los señores Dr. Eiermann y Dr. Lang, representantes legales de dicha firma. Hay dos firmas ilegible de los mencionados señores.

Sigue certificación notarial en español e inglés de las firmas de los señores Dr. Eiermann y Dr. Lang, como representantes legales de MERCK PATENT GMBH, domiciliada en Frankfurter Strasse 250, 64293, Darmstad, y de la existencia de la sociedad, por el notario de Darmstadt, Alexander Pfeiffer, el 14 de noviembre de 2005.- Fdo.: firma ilegible.- (sello redondo en tinta) Alexander Pfeiffer – notario de Darmstadt.

Sigue certificación solamente en inglés de las firmas de los señores Dr. Eiermann y Dr. Lang, como representantes legales de MERCK PATENT GMBH, por el notario de Darmstadt, Alexander Pfeiffer, el 14 de noviembre de 2005.- Fdo.: firma ilegible.- (sello redondo en tinta) Alexander Pfeiffer – notario de Darmstadt, bajo el No. 580/2005, del 14 de noviembre de 2005.

LUZ ARRIAGA DE HERBER
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL

Resolución No 599 Minjusticia

APOSTILLE
(Convention de La Haya du 5 octobre 1961)

1. País: República Federal de Alemania

Este documento público

2. Ha sido firmado por Alexander Pfeiffer

3. Actuando en calidad de notario

4. Lleva el sello oficial del notario de Darmstadt, Alexander Pfeiffer

Certificado

5. en Darmstadt

6. el 16 de noviembre de 2005

7. por el Presidente del Tribunal Regional

8. bajo el No 910 E 2/1 1930/05

9. Sello

(sello redondo No.3, en tinta –

El Presidente del Tribunal Regional

de Darmstadt)

10. Firma

Fdo.: ilegible

Schichor

Vicepresidente

ES TRADUCCION FIEL Y COMPLETA, de la cual se deja copia en los archivos de estas oficinas para su confrontación.

Bogotá, 9 de diciembre de 2005

C. 2013

LUZ ARRIAGA DE HERBER
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
Resolución No. 599 Mijusticia

COMO NOTARIO PUBLICO DEL ESTADO DE
BOGOTA, DAGO CON FECHA Y LUGAR DE

*Ruiz Arriaga de
Herber*

CON FECHA Y LUGAR DEL ESTADO DE
BOGOTA, DAGO CON FECHA Y LUGAR DE
13 DIC 2005

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 DEC 13 P 2:00

[Signature]
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFÉ DE BOGOTÁ D.C.

[Large handwritten mark]

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

32063:

[Signature]
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DE SEMEJANZA
LAS FIRMAS QUE SE ENVIAN

22

CAVELIER

ABOGADOS

WEB SITE: www.cavelier.com
E-MAIL: cavelier@cavelier.com

EDIFICIO SISKI
CARRERA 4 No. 72 - 35
BOGOTA 8, COLOMBIA

TELEFONO: (57) (1) 347-3611
TELEFAX: (57) (1) 217-9211 (57) (1) 310-4995

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

E. S. D.

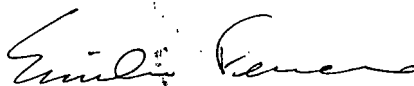
Poderdante : **MERCK PATENT GMBH**

Poder conferido el : 14/11/2005

Yo, EMILIO FERRERO, obrando como apoderado principal del poderdante arriba mencionado, mediante el presente escrito sustituyo el poder a mi otorgado a la doctora LUZ CLEMENCIA DE PAEZ, identificada con cédula de ciudadanía No. 35.456.344 y Tarjeta Profesional N°23.555, con todas las facultades que me fueron conferidas.

Hago la anterior sustitución conforme al artículo 66 del Código de Procedimiento Civil.

Señora Jefe,

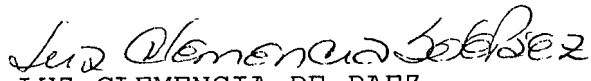


EMILIO FERRERO

T.P.A. N° 31.929

C.C. N° 438.019 de Usaquén

Acepto:



LUZ CLEMENCIA DE PAEZ

T.P.A. N° 23.555

C.C. No. 35.456.344 de Usaquén

NOTARIA SEXTA DE BOGOTÁ
RECONOCIMIENTO Y PRESENTACION PERSONAL
 Bogotá, D.C. **22 OCT 2009**
 Ante mí AMPARO QUINTERO ARTURO,
 NOTARIA SEXTA DEL CÍRCULO DE
 BOGOTÁ, D.C.
 Comparecieron: Emilio Penoso
Williamson
Luz Clemencia Suarez
de paz
 Quien(es) exhibió(aron) la(s) C.C.
CCF 438.019.78731929
CCF 35.456.24478723595
 Y declaró(aron) que la(s) firma(e) que se acompaña(n)
 en el presente documento es(son) la(s) suya(s) y
 que el contenido del mismo es cierto.
 En constancia se firma esta diligencia.

Emilio Penoso
Luz Clemencia Suarez



FORMAS SÓLIDAS DE ANTICUERPOS ANTI-EGFR

Antecedentes de la invención

La invención se refiere a formas sólidas de anticuerpos contra el receptor EGF (EGFR), en particular precipitados y
5 cristales de anticuerpos monoclonales contra el receptor EGF, con particular preferencia de Mab C225 (cetuximab) y Mab h425 (EMD 72000), que dan por resultado anticuerpos proteicos biológicamente activos por disolución o suspensión en medio acuoso o no acuoso, que se obtienen por precipitación
10 del anticuerpo y/o de una de sus variantes y/o fragmentos disueltos o suspendidos en medio acuoso mediante un reactivo de precipitación. Además, la invención se refiere a preparaciones farmacéuticas que comprenden al menos una forma sólida de los anticuerpos antes mencionados en forma de precipi-
15 tado no cristalino, precipitado cristalino o en forma disuelta o suspendida, y opcionalmente excipientes y/o coadyuvantes y/u otros ingredientes farmacéuticos activos, y a un proceso para la preparación de formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención.

20 Los adelantos en el área de la biotecnología en los últimos 10 años han permitido preparar diversas proteínas para la aplicación farmacéutica mediante técnicas con ADN recombinante. Por ejemplo, se usan medicamentos proteicos, tales como anticuerpos monoclonales, por ejemplo en la terapia de
25 tumores, por ejemplo para inmunoterapia específica o vacunas

contra tumores. Las proteínas terapéuticas son más grandes y más complejas que los ingredientes activos orgánicos e inorgánicos convencionales, y tienen complejas estructuras tridimensionales y numerosos grupos funcionales que intervienen en la actividad biológica de la proteína o, como alternativa, pueden causar efectos no deseados. Durante la preparación, el almacenamiento y el transporte, los medicamentos proteicos están expuestos a numerosas influencias externas que pueden tener acción reductora de la estabilidad sobre los ingredientes activos proteicos. En consecuencia, es necesario estudiar con exactitud las causas y los mecanismos de las reacciones específicas de degradación, a fin de poder estabilizar la proteína, por ejemplo mediante la adición de ciertos coadyuvantes estabilizantes (véase, por ejemplo, Manning M. C., Patel K., & Borchardt R. T. (1989) Stability of protein pharmaceuticals. Pharm. Res. 6, 903-918).

La bibliografía describe numerosas formulaciones de proteínas terapéuticas. No obstante, los requerimientos de la composición de una preparación farmacéutica de ingredientes activos proteicos puede ser muy diferente, y en general no es posible aplicar formulaciones proteicas ya establecidas a ingredientes activos proteicos nuevos, debido a las propiedades fisicoquímicas específicas y las reacciones de degradación de las distintas proteínas. En consecuencia, aún representa un desafío importante hallar formulaciones farma-

céuticas adecuadas y estables de estos nuevos ingredientes activos.

Las inestabilidades químicas se distinguen por las modificaciones covalentes de las proteínas. La estructura primaria de la proteína cambia por ruptura, neoformación o re-
5 formación de enlaces químicos. Por lo general, la sustancia recién formada es completamente diferente en la actividad biológica de la proteína nativa original. Las inestabilidades físicas modifican la disposición espacial de la molécula
10 (estructura secundaria, terciaria y cuaternaria), sin destruir los enlaces covalentes. Se pueden clasificar en desnaturalización, asociación, agregación, precipitación o adsorción. Las inestabilidades físicas son un fenómeno frecuente, en particular en el caso de proteínas relativamente grandes.
15 Los precipitados son el equivalente macroscópicamente visible de los agregados y están formados, en términos mecánicos, por cúmulos de agregados o asociaciones. Al exceder el límite de solubilidad y debido a la precipitación, los copos se hacen visibles desde un diámetro de aproximadamente 10 μm
20 a través de un microscopio óptico y desde aproximadamente 50 μm a simple vista. La agregación proteica puede ser un proceso reversible o irreversible (véase, por ejemplo, Cleland J. L., Powell M. F. & Shire S. J. (1993), The development of stable protein formulations. A close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation Crit. Rev. Ther. Drug Ca-
25

rier Syst 10, 307-377).

Si bien la bibliografía anterior describe la precipitación de proteínas con sales, polímeros y solventes orgánicos como método estándar para la purificación de las proteínas (Scopes R. K. (1997) Separation by Precipitation. En: Protein Purification Principles and Practice (ed Scopes R. K.), 2ª ed. págs. 41-71 Springer Verlag, Nueva York), el uso de este método por lo general da por resultado, en particular en el caso de las inmunoglobulinas, la desnaturalización, una reducción asociada de la actividad y bajos rendimientos cuantitativos, particularmente con el uso de sales y solventes orgánicos (Phillips A. P., Martin K. L. & Horton W. H. (1984) The choice of methods for immunoglobulin IgG purification: Yield and purity of antibody activity. Journal of Immunological Methods 74, 385-393). Por el contrario, con el uso de polietilenglicol (PEG) se obtienen mejores resultados (A. Polson, G. M. Potgieter, J. F. Largier y G. E. F. Joubert, F. J. Mears. The Fractionation of Protein Mixtures by linear Polymers of High Molecular Weight. Biochem. Biophys. Acta 82: 463-475, 1964).

Se conocen los cristales proteicos por los procesos de purificación (procesamiento corriente abajo), preferentemente de enzimas, y por la dilucidación de la estructura terciaria de las proteínas por medio del análisis estructural por rayos X (R. K. Scopes Analysis for purity: Crystalliza-

tion. En: Protein Purification: Principles and Practice, editado por R. K. Scopes, Nueva York. Springer Verlag, 1997, p. 284-301). Aquí tiene lugar la formación de nuevos contactos en términos moleculares ordenados entre proteínas. Es un
5 proceso lento, con movilidad reducida. En el proceso se reduce la concentración de la proteína en solución.

Aunque la bibliografía describe la cristalización de las proteínas con sales, polímeros y solventes orgánicos como método estándar para dilucidar la estructura de las inmunoglobulinas (Harris L. J., Skaletsky E. & McPherson A. (1995) Crystallization of Intact Monoclonal Antibodies. Proteins: Structure, Function, and Genetics 23, 285-289, Harris L. J., Skaletsky E., & McPherson A. (1998) Crystallographic Structure of an Intact IgG1 Monoclonal Antibody. Journal of
10 Molecular Biology 275, 861-872; Edmundson A. B., Guddat L. W., & Andersen K. N. (1993) Crystal Structures of intact IgG antibodies. ImmunoMethods 3, 197-210), la cristalización de anticuerpos intactos, por ejemplo glucosilados, es, sin embargo, extremadamente difícil, dado que el tamaño de la proteína, el diferente patrón de glucosilación de cada molécula de anticuerpo, las microheterogeneidades asociadas, además de la flexibilidad estructural de la inmunoglobulina hacen más difícil la incorporación ordenada en un retículo cristalino, o incluso lo impiden (McPherson A. (1999) Crystalliza-
20 tion of Biological Macromolecules, 1ª ed. Cold Spring Harbor
25

Laboratory Press, Nueva York). Además, las moléculas de anticuerpo exhiben una tendencia a la agregación, que también causa grandes dificultades en la cristalización (McPherson A. (1999) *Crystallization of Biological Macromolecules*, 1ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York). Además, el riesgo de desnaturalización de los anticuerpos durante el proceso de cristalización torna poco atractiva la cristalización de anticuerpos terapéuticos para la persona experta en el arte. Así, hasta el momento sólo se han cristalizado pocos anticuerpos intactos para su dilucidación estructural y hasta el momento sólo se cristalizaron tres anticuerpos en escala preparativa. En consecuencia, las inmunoglobulinas enumeradas en la Biological Macromolecule Crystallisation Database [base de datos de cristalización de macromoléculas biológicas] (Gilliland, G. L., Tung, M., Blakeslee, D. M. y Ladner, J. 1994. *The Biological Macromolecule Crystallization Database, Versión 3.0: New Features. Data, and the NASA Archive for Protein Crystal Growth Data*. *Acta Crystallogr. D* 50 408-413) que ya se cristalizaron son principalmente fragmentos Fab y Fc.

El documento WO 02/072636 describe cristales de anticuerpo que, sin embargo, se preparan en un proceso complejo con inoculación y el uso de detergentes, que se deberían evitar en lo posible en formulaciones farmacéuticas, y coadyuvantes, algunos de los cuales son toxicológicamente in-

aceptables. Además, en el proceso descrito no se puede controlar el tamaño de las partículas. En un experimento control (véase el Ejemplo 8), se pudo demostrar que los cristales con forma de aguja descritos se obtienen de la solución de proteína y del control negativo (sin proteína) mediante el proceso descrito en el documento WO 02/072636. De todo esto es obvio que presumiblemente son las mejores inclusiones proteicas en cristales del reactivo de precipitación.

Por las razones antes mencionadas, es obvio que la cristalización de los anticuerpos es extremadamente difícil para la persona experta en el arte y los procesos de cristalización descritos en la bibliografía no se pueden aplicar a todos los anticuerpos conocidos, debido a la considerable heterogeneidad de los distintos anticuerpos conocidos con respecto a estructura primaria, secundaria y terciaria, glucosilación y flexibilidad estructural. De modo similar, por las razones antes mencionadas no resultaba atractivo para el experto en el arte preparar precipitados de anticuerpos terapéuticos, dado que, en particular, cabía esperar la desnaturalización irreversible.

En consecuencia, el objeto de la presente invención era hallar formas estables, por ejemplo precipitados o cristales, de proteínas terapéuticas, en particular anticuerpos, para retener su eficacia durante la preparación, el almacenamiento, el transporte y la aplicación. Dado que, como se

30

mencionó antes, por lo general no se pueden aplicar formulaciones proteicas ya establecidas a nuevos ingredientes proteicos activos, otro objeto de la presente invención era hallar nuevas formulaciones estables de anticuerpos monoclonales contra el receptor EGF, por ejemplo Mab C225 (cetuximab) y Mab h425 (EMD 72000). Aunque las formulaciones que comprenden Mab C225 (cetuximab) o Mab h425 (EMD 72000) se describen en los documentos WO 03/053465 y WO 03/007988, sin embargo, las formulaciones descritas en el documento WO 03/053465 tienen una concentración proteica relativamente baja y no son estables por largo tiempo a temperatura ambiente, y de modo similar, las formulaciones descritas en el documento WO 03/007988 tienen una concentración proteica relativamente baja y se debe reconstituir la preparación (liofilizado) antes de su uso. En consecuencia, otro objeto de la presente invención consistía en hallar una preparación farmacéutica estable que tuviera alta concentración de los anticuerpos antes mencionados.

El proceso de liofilización para la estabilización de formulaciones proteicas se describe, por ejemplo, en los documentos WO 93/00807 y WO 98/22136, pero las significativas desventajas de las preparaciones liofilizadas consisten en que el usuario debe reconstituir el liofilizado antes de su uso, lo cual representa una considerable fuente de error en la preparación antes del uso. Dado que se agrega otro proce-

so de preparación, en comparación con formulaciones líquidas, el proceso es desfavorable con respecto al trabajo adicional para el desarrollo del proceso (para asegurar la estabilidad durante la liofilización), la preparación (costos y duración de la preparación) y, p.ej., la convalidación.

En consecuencia, el objeto de la presente invención consiste en buscar formas sólidas y formulaciones de los anticuerpos antes mencionados que tengan mayor estabilidad ante condiciones de estrés, tales como alta temperatura, humedad atmosférica y/o fuerzas de cizallamiento, y que no comprendan coadyuvantes toxicológicamente inaceptables.

Síntesis de la invención

Sorprendentemente, se halló que se pueden preparar las formas sólidas de los anticuerpos antes mencionados y que estas formas sólidas y formulaciones preparadas a partir de ellas no tienen las desventajas mencionadas en el arte previo. Se distinguieron las formas sólidas de los anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención descritas más adelante y/o las formulaciones preparadas a partir de ellas, sorprendentemente, por una o más de las ventajas seleccionadas de: gran estabilidad, tamaño de partículas controlable, proteínas nativas y biológicamente activas tras la redisolución o la resuspensión, gran pureza, ausencia de agentes farmacéuticamente inaceptables y, en consecuencia, gran seguridad, buena tolerancia y la posibilidad del uso directo, baja ten-

dencia de agregación y así la posibilidad de la preparación de formulaciones muy concentradas y baja viscosidad en la formulación como suspensión proteica, comparada con una solución. El proceso de preparación de acuerdo con la invención descrita más adelante se distingue, sorprendentemente, por una o más de las ventajas seleccionadas de: simplicidad, ahorro de tiempo y costos, uso de agentes farmacéuticamente aceptables, alto rendimiento. El proceso de acuerdo con la invención se puede llevar a cabo en forma significativamente más simple, con ahorro de tiempo y en forma costo-efectiva, respecto de las técnicas descritas en la bibliografía, dado que sólo es necesaria la adición de un único reactivo de precipitación.

Además, el reactivo de precipitación se agrega a una solución del anticuerpo en un sistema buffer adecuado, es decir, que no es necesaria la estabilización de las soluciones de reacción mediante otros coadyuvantes tales como, p. ej., detergentes. Por lo general, se debe evitar o minimizar el uso de detergentes en preparaciones para la administración parenteral, dado que causan un potencial tóxico e inmunogénico no despreciable (Sweetana S. & Akers M. J. (1996) Solubility principles and practices for parenteral drug dosage form development PDA J. Pharm. Sci. Technol. 50, 330-342) y también pueden causar cambios en la estructura secundaria de las proteínas (Vermeer A. W. P. & Norde W.

(2000) The influence of the binding of low molecular weight surfactants on the thermal stability and secondary structure of IgG, Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 161, 139-150). En consecuencia, las formas sólidas obtenidas de anticuerpos anti-EGFR se pueden usar directamente en medicamentos, y no es necesaria la purificación ulterior para la eliminación de agentes farmacológicamente inaceptables. En contraste, los cristales obtenidos en el documento WO 02/072636 se deben liberar de agentes farmacológicamente inaceptables, p.ej. CHES, imidazol, TRIS, cloruro de manganeso (II), cloruro de cinc (II), sulfato de cobre (II), 2-propanol, 2-metil-2,4-pentanodiol, HEPES, sulfato de litio, etoxietanol o detergentes, tales como polisorbato 80 o 20, en un proceso complejo, o incluso es imposible eliminar por completo los agentes inaceptables antes mencionados.

Sorprendentemente, se halló que las formas sólidas preferentemente estables se obtienen si los anticuerpos contra el receptor EGF (anticuerpos anti-EGFR), preferentemente anticuerpos monoclonales anti-EGFR, con particular preferencia Mab C225 (cetuximab) o Mab h425 (EMD 72000), se incuban a pH adecuado y a temperatura adecuada en presencia de un buffer adecuado, con la ayuda de ciertos reactivos de precipitación seleccionados de polímeros, preferentemente polietilenglicol (PEG), sales, preferentemente sulfato de amonio, o solventes

orgánicos, preferentemente etanol, o las correspondientes mezclas.

Sorprendentemente, se halló que las formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR, preferentemente de anticuerpos anti-EGFR monoclonales, con particular preferencia de Mab C225 (cetuximab) o Mab h425 (EMD 72000), y/o variantes o sus fragmentos, obtenidos por el proceso de acuerdo con la invención, son preferentemente nativos después de la redisolución y se obtienen preferentemente en un alto rendimiento.

En consecuencia, la invención se refiere a formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR y/o sus variantes o fragmentos, que dan por resultado una proteína de anticuerpo biológicamente activa por disolución o suspensión en medio acuoso, que se obtienen por precipitación del anticuerpo y/o una de sus variantes y/o fragmentos disueltos o suspendidos en medio acuoso mediante un reactivo de precipitación seleccionado de polímeros, preferentemente polietilenglicol (PEG), sales, preferentemente sulfato de amonio, o solventes orgánicos, preferentemente etanol, o sus mezclas, en presencia de un buffer adecuado, pH y temperatura adecuados.

Formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR:

Por "formas sólidas de un anticuerpo anti-EGFR de acuerdo con la invención" se entienden preferentemente precipitados o cristales que resultan en un anticuerpo biológicamente activo mediante la disolución o suspensión en un me-

35
dio acuoso o no acuoso.

Se obtienen las formas sólidas de acuerdo con la invención por precipitación del anticuerpo disuelto o suspendido en un medio acuoso según el proceso descrito más adelante.

5 Las formas sólidas de acuerdo con la invención pueden estar en el rango de μm y nm .

Precipitados:

A los fines de la presente invención, se entiende por precipitados las formas sólidas en una estructura no cristalina amorfa o estados de agregación y asociación.

Cristales:

A los fines de la presente invención, se entiende por cristales las formas sólidas en una estructura cristalina.

Las estructuras cristalinas se pueden detectar mediante los siguientes procesos de precipitación.

Precipitado:

A los fines de la presente invención, se entiende por precipitado las formas sólidas de acuerdo con la invención en forma precipitada, es decir, en forma de un precipitado o cristal, según las condiciones del proceso.

Precipitado cristalino:

A los fines de la presente invención, se entiende por precipitado cristalino o cristalino las formas sólidas de acuerdo con la invención en una estructura cristalina ordenada.

Precipitado no cristalino:

A los fines de la presente invención, se entiende por precipitado no cristalino las formas sólidas de acuerdo con la invención en estructuras amorfas no cristalinas o estados
5 de agregación y asociación.

Disuelta:

A los fines de la presente invención, se entiende por forma disuelta las formas sólidas de acuerdo con la invención que se disuelven o redisuelven en una solución de
10 acuerdo con la invención.

Suspendida:

Por suspendida se entienden las formas sólidas de acuerdo con la invención que se suspenden o resuspenden en una solución de acuerdo con la invención.

15 A los fines de la invención, se entiende por "medio acuoso" agua o mezclas de agua con solventes inertes adecuados y otros agentes mencionados en el Ejemplo 1, tales como, por ejemplo, buffers, estabilizantes o coadyuvantes, con la propiedad de que el medio acuoso de acuerdo con la invención
20 no causa por sí mismo la precipitación o cristalización del anticuerpo, pues la precipitación o la cristalización sólo tienen lugar por adición de reactivos de precipitación de acuerdo con la invención.

A los fines de la invención, se entienden por "medio no
25 acuoso" aceites o mezclas de aceites con agua u otros sol-

ventes inertes adecuados y otros agentes mencionados en el Ejemplo 1, tales como, por ejemplo, estabilizantes o coadyuvantes, con la propiedad de que los medios no acuosos de acuerdo con la invención no sólo no causan la precipitación o cristalización del anticuerpo, sino en cambio, la precipitación o la cristalización sólo tiene lugar por adición de reactivos de precipitación de acuerdo con la invención.

Respecto de los anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención y a los fines de la presente invención, se entienden por "biológicamente activos", "nativos" y "efectivos" los anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención capaces de ejercer sus efectos biológicos aún después de la conversión en formas sólidas de acuerdo con la invención y la posterior redisolución o resuspensión, en particular la unión a EGFR, inhibición de la unión de ligandos, en particular EGF a EGFR, modulación, en particular la inhibición de la transducción de señales mediada por EGFR y la prevención o la terapia de enfermedades mediadas por EGFR.

En particular, no se esperaba en consecuencia la preparación directa de cristales de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención, dado que los anticuerpos por lo general tienen una fuerte tendencia a la agregación, que dificulta o incluso impide la incorporación ordenada en un retículo cristalino (McPherson A. (1999) Crystallization of Biological Macromolecules, 1ª ed. Cold Spring Harbor Labora-

tory Press. Nueva York). A pesar de las dificultades previstas por el experto en el arte para la cristalización de anticuerpos de acuerdo con la invención, debido a la falta de homogeneidad antes mencionada con respecto a la estructura proteica, la glucosilación y la flexibilidad segmentaria estructural, incluso dentro de una especie de anticuerpo, sorprendentemente se obtienen resultados excelentes mediante el proceso de acuerdo con la invención.

La elevada estabilidad de los cristales de anticuerpos obtenidos de acuerdo con la invención también se caracterizan por no presentar cambios en el aspecto de la forma o el tamaño de las partículas, que se deberían considerar esenciales respecto de los efectos secundarios inmunogénicos, ni cambios en las estructuras primaria o secundaria de la proteína. En consecuencia, el proceso de acuerdo con la invención ofrece la ventaja de que el tamaño de las partículas es preferentemente controlable y de preferencia se obtienen cristales tridimensionales estables. El tamaño de los cristales puede estar en el rango de μm y nm .

20 Anticuerpos anti-EGFR:

De preferencia, los anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención son monoclonales y de origen murino o humano; con particular preferencia son de origen murino y son quiméricos o humanizados. El anticuerpo dirigido contra el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGFR) es con

particular preferencia Mab C225 (cetuximab) o Mab h425 (EMD 72000) y/o variantes o fragmentos de ellos. Otros anticuerpos dirigidos contra EGFR se describen, por ejemplo, en EP 0586002 y en J. Natl. Cancer Inst. 1993, 85 27-33 (Mab 528).

5 Mab C225 (cetuximab, ErbituxTM):

Mab C225 (cetuximab) es un anticuerpo clínicamente probado que se une al receptor EGF. Mab C225 (cetuximab) es un anticuerpo quimérico cuyas regiones variables son de origen murino y cuyas regiones constantes son de origen humano. Fue
10 descrito por primera vez por Naramura et al., Cancer Immunol. Immunotherapy 1993, 37, 343-349 y en el documento WO 96/40210 A1.

Mab h425 (EMD 72000):

Mab h425 (EMD 72000) es un anticuerpo humanizado de monoclonal (Mab) obtenido de anticuerpo anti-EGFR murino 425
15 (Mab 425) (documento EP 0531472). El anticuerpo monoclonal murino Mab 425 se desarrolló en la línea celular de carcinoma humano A431, dado que se une aquí con un epitopo extracelular del receptor de factor de crecimiento epidérmico
20 (EGFR). Se halló que inhibe la unión de EGF (Murthy et al., 1987). Se observó aumento de la expresión de EGFR en tejidos malignos provenientes de diversas fuentes, y en consecuencia Mab 425 es un posible ingrediente activo para el diagnóstico y tratamiento terapéutico de tumores humanos. En consecuencia,
25 cia, se halló que Mab 425 media la citotoxicidad tumoral in

vitro y suprime el crecimiento tumoral de líneas celulares de carcinomas epidermoides y colorrectales *in vitro* (Rodeck et al., 1987). Además, se demostró que Mab 425 se une a xenoinjertos de gliomas humanos malignos en ratones (Takahashi et al., 1987). Sus formas humanizadas y quiméricas se describen, por ejemplo, en el documento EP 0531472; Kettleborough et al., Protein Engineering 1991, 4: 773-783; Bier et al., Cancer Chemother. Pharmacol. 2001, 47: 519-524; Bier et al., Cancer Immunol. Immunother 1998, 46: 167-173. Mab h425 (EMD 72000) es un anticuerpo humanizado (h425) en fase clínica I/II y cuya región constante se compone de una cadena K y una cadena γ -1 humana (documento EP 0531472).

Los anticuerpos humanos anti-EGFR se pueden preparar mediante tecnología XenoMouse, según se describe en los documentos WO 91/10741, WO 94/02602 y WO 96/33735. Un anticuerpo sometido a estudios clínicos y preparado mediante esta tecnología es, p.ej., ABX-EGF (Abgenix. Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2001. 38: 17-23; Cancer Research 1999, 59: 1236-43).

20 Anticuerpo:

Anticuerpo o inmunoglobulina se usan en el sentido más amplio, a los fines de la presente invención, y se refiere, en particular, a anticuerpos policlonales y anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) y, con particular preferencia, a anticuerpos monoclonales intactos

(Mab) que son biológicamente activos, y sus variantes y fragmentos. El término también cubre heteroanticuerpos que consisten en dos o más anticuerpos o sus fragmentos y/o tienen distintas especificidades de unión, y se unen entre sí.

5 Según la secuencia de aminoácidos de sus regiones constantes, los anticuerpos se pueden asignar a distintas clases de anticuerpo (inmunoglobulina): IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Varios de ellos se pueden subdividir en subclases (isotipos), por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Por lo ge-

10 neral, los anticuerpos tienen un peso molecular de aproximadamente 150 kDa y constan de dos cadenas livianas idénticas (L) y dos cadenas pesadas idénticas (H). Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de células homogéneas. Son muy específicas y están dirigidas contra un único

15 epítipo, mientras que los anticuerpos policlonales cubren distintos anticuerpos, dirigidos contra diversos epítopos. Los procesos para la preparación de anticuerpos monoclonales incluyen, por ejemplo, el método del hibridoma descrito por Kohler y Milstein (Nature 256, 495 (1975)) y en Burdon et

20 al., (1985) "Monoclonal Antibody Technology, The Production and Characterization of Rodent and Human Hybridomas", eds. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Volume 13, Elsevier Science Publishers, Amsterdam. Se pueden preparar, en particular, mediante técnicas conocidas de ADN

25 recombinante (véase, p.ej., el documento US 4816567). Los

anticuerpos monoclonales también se pueden aislar de bibliotecas de fagos de anticuerpos, por ejemplo con la ayuda de las técnicas descritas en Clackson et al. (Nature, 352: 624-628 (1991)) y Marks et al. (J. Mol. Biol, 222: 58, 1-5 597(1991)).

Variantes y fragmentos:

Las variantes (muteínas) de los anticuerpos son proteínas estructuralmente relacionadas, por ejemplo, que se pueden obtener por modificación de la secuencia primaria (secuencia de aminoácidos), por glucoingeniería (variantes de 10 los sitios o estructuras de glucosilación, también proteínas desglucosiladas), por PEGilación, por preparación en células huésped modificadas o por otras técnicas. Las variantes de acuerdo con la invención no se restringen a los ejemplos anteriores, sino que, en cambio, incluyen todas las variantes 15 de los anticuerpos de acuerdo con la invención que son conocidos por los expertos en el arte.

Los fragmentos (segmentos parciales) de anticuerpos son productos de escisión de los anticuerpos obtenidos, por 20 ejemplo, por digestión enzimática limitada con la ayuda de papaína, pepsina y plasmina o por preparación de los segmentos parciales mediante ingeniería genética. Son segmentos parciales típicos, por ejemplo, el fragmento bivalente $F(ab')_2$, el fragmento monovalente Fab y el fragmento Fc 25 (Lottspeich F., H. Zorbas (ed.). Bioanalytik, Heidelberg;

Berlín: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, (1998) pág. 1035). Los fragmentos de acuerdo con la invención no se restringen a los ejemplos anteriores, sino que, en cambio, incluyen todos los fragmentos de anticuerpos de acuerdo con la invención, conocidos para el experto en el arte.

Preparación farmacéutica:

Los términos formulación farmacéutica y preparación farmacéutica se usan como sinónimos a los fines de la presente invención.

10 Tal como se usa en la presente, "farmacéuticamente tolerado" se refiere a medicamentos, reactivos de precipitación, excipientes, coadyuvantes, estabilizantes, solventes y otros agentes que facilitan la administración de las preparaciones farmacéuticas así obtenidas a un mamífero, sin
15 efectos secundarios fisiológicos indeseados, tales como náuseas, mareos, problemas digestivos o similares.

En las preparaciones farmacéuticas para la administración parenteral, se requiere isotonicidad, euhidria y tolerabilidad y seguridad de la formulación (baja toxicidad), de
20 los coadyuvantes empleados y del envase primario. Sorprendentemente, las formas sólidas de los anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención preferentemente tienen la ventaja de que el uso directo es posible, dado que los reactivos de precipitación utilizados son agentes fisiológicamente
25 aceptables y, en consecuencia, son innecesarias otras etapas

de purificación para la eliminación de agentes toxicológicamente inaceptables, tales como, p.ej., elevadas concentraciones de solventes orgánicos u otros coadyuvantes toxicológicamente inaceptables, antes del uso de las formas sólidas de acuerdo con la invención en formulaciones farmacéuticas. La preparación de formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención permite, preferentemente de forma simultánea, un elevado rendimiento de proteína nativa y farmacéuticamente aceptable de gran pureza y es, en consecuencia, preferentemente simple, ahorra tiempo y de bajo costo.

Así, la invención también se refiere a un proceso para la preparación de una forma sólida de un anticuerpo anti-EGFR de acuerdo con la invención y/o uno de sus variantes y/o fragmentes que dé por resultado una proteína de anticuerpo biológicamente activa por disolución o suspensión en medio acuoso, caracterizado porque el anticuerpo y/o sus variantes y/o fragmentos disueltos o suspendidos en solución acuosa se precipitan mediante un reactivo de precipitación, y se separa el producto de precipitación. Los reactivos de precipitación utilizados en el proceso de acuerdo con la invención son preferentemente polímeros, con particular preferencia polietilenglicol (PEG), sales, con particular preferencia sulfato de amonio, o solventes orgánicos, con particular preferencia etanol.

Una forma sólida de un anticuerpo anti-EGFR de acuerdo

con la invención se puede preparar mediante la adición de los reactivos de precipitación de acuerdo con la invención mencionados en el Ejemplo 1, de preferencia polímeros, tales como, con particular preferencia, polietilenglicol (PEG) en una concentración de aproximadamente 0,1 a 99,9% (p/v), con un peso molecular promedio de 200-80.000, preferentemente de 400 a 20.000, con particular preferencia de 400 a 8.000; sales, tales como, con particular preferencia, sulfato de amonio en una concentración de 0,1-4,5 M, acetato de sodio trihidrato en una concentración de 0,1-4,5 M, citrato trisódico dihidrato en una concentración de 0,1-1,5 M, fosfato de potasio en una concentración de 0,1-1,2 M, cloruro de potasio en una concentración de 0,1 a 4,7 M, cloruro de sodio en una concentración de 0,1 a 6,1 M, hidrógeno-fosfato dipotásico en una concentración de 0,1 a 3,0 M, hidrógeno-fosfato disódico dihidrato en una concentración de 0,1 a 0,5 M, o solventes orgánicos, tales como, con particular preferencia, etanol en una concentración de 0,1-99,9% (v/v), o sus mezclas, y coadyuvantes, buffers y/o estabilizantes, a una solución que comprende anticuerpos de acuerdo con la invención en un método discontinuo, e incubar la mezcla a los valores de pH y temperatura mencionados en el Ejemplo 1. Al final, los volúmenes definidos de soluciones madre que comprenden los reactivos de precipitación, coadyuvantes, buffers y/o estabilizantes mencionados en el Ejemplo 1 en concentración

definida se agregan ventajosamente a una solución con una concentración definida de anticuerpos EGFR (de 0,01 a 150 mg/ml, preferentemente de 2 a 100 mg/ml, con particular preferencia aproximadamente de 5 a 20 mg/ml), como se obtuvo en su preparación, y opcionalmente se diluyen con agua o buffer (por ejemplo buffer de citrato o de fosfato, en una concentración de 1 mM a 200 mM, preferentemente de 2 a 20 mM, con particular preferencia de aproximadamente 10 mM; también con la adición de agentes isotónicos tales como, por ejemplo, cloruro de potasio, cloruro de sodio en una concentración de 1-1.000 mM, preferentemente 40 mM-310 mM) hasta una concentración calculada previamente. De modo alternativo, los reactivos de precipitación, los coadyuvantes, los buffers y los estabilizantes de acuerdo con la invención también se pueden agregar en forma sólida. Si el anticuerpo está por sí mismo en dicho estado de agregación sólido, por ejemplo como liofilizado, las formas sólidas de los anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención se pueden preparar primero disolviendo los anticuerpos de acuerdo con la invención en agua o en una solución acuosa que comprende uno o más de los demás ingredientes, y luego agregando volúmenes definidos de soluciones madre que comprenden los reactivos de precipitación, coadyuvantes, buffers y/o estabilizantes mencionados en el Ejemplo 1 en concentración definida. Los reactivos de precipitación, los coadyuvantes, los buffers y/o los estabi-

lizantes de acuerdo con la invención también se pueden añadir en los anticuerpos en estado de agregación sólido. Los anticuerpos de acuerdo con la invención también se pueden disolver ventajosamente de forma directa en una solución que
5 comprenda todos los reactivos de precipitación, coadyuvantes, buffers y/o estabilizantes.

La invención también cubre todos los hidratos, sales y derivados de los agentes antes mencionados, que con conocidos y aceptados por el experto en el arte.

10 Uno o más de los agentes mencionados en la invención se pueden agregar ventajosamente durante o después de completar el proceso de precipitación y opcionalmente eliminarlos, a fin de realizar, p.ej., una etapa de purificación adicional.

Uno o más de los reactivos de precipitación, coadyuvantes, buffers y/o estabilizantes mencionados en la invención
15 se pueden agregar ventajosamente durante o después de completar el proceso de preparación del anticuerpo. De preferencia, esto se realiza mediante la disolución del anticuerpo de acuerdo con la invención directamente en una solución
20 acuosa que comprende un, una pluralidad o todos los reactivos de precipitación, coadyuvantes, buffers y/o estabilizantes en la etapa final de la purificación que tiene lugar después de su preparación. Para la obtención de una preparación farmacéutica de acuerdo con la invención, el o los res-
25 pectivos ingredientes adicionales sólo se deben agregar en

las respectivas cantidades menores o no agregarse. Se prefiere particularmente que el respectivo ingrediente se disuelva en una solución acuosa que comprenda todos los demás reactivos de precipitación, coadyuvantes, buffers y/o estabilizantes en la etapa final de la purificación del anticuerpo, después de la preparación correspondiente. En consecuencia, se puede obtener ventajosamente una solución que se envasa o liofiliza de modo directo. La solución resultante que comprende el anticuerpo respectivo se ajusta a un pH de 4 a 10, de preferencia un pH de 5 a 9, se filtra manteniendo la esterilidad y, de ser necesario, se seca por congelación.

La reacción se lleva a cabo según los métodos conocidos por el experto en el arte en un solvente adecuado, en particular en un solvente inerte. Solventes inertes adecuados son etanol, glicerol, mezclas con agua o agua pura o agua que comprenda otros coadyuvantes tales como, por ejemplo, sales con acción amortiguadora o productora de isotonicidad. Se da particular preferencia al agua.

El proceso aquí descrito se puede realizar de particular preferencia de manera discontinua. Las formas sólidas de los anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención y/o sus variantes y/o fragmentos preparados por el procedimiento de acuerdo con la invención se pueden convertir con particular preferencia en la proteína de anticuerpo biológicamente activa mediante su disolución o suspensión en medio acuoso.

Por último, un anticuerpo y/o una de sus variantes y/o fragmentos disueltos o suspendidos en solución acuosa con particular preferencia se precipita mediante un reactivo de precipitación mencionado en el Ejemplo 1, y se separa el producto de precipitación.

De acuerdo con la elección de la concentración del reactivo de precipitación, se obtienen precipitados amorfos o cristales. De preferencia, se obtienen precipitados con una concentración relativamente elevada del reactivo de precipitación, mientras que de preferencia se obtienen cristales con una concentración relativamente baja del reactivo de precipitación. En consecuencia, mediante la correcta elección de la concentración del reactivo de precipitación, la concentración de la proteína, los demás agentes de acuerdo con la invención, el pH y la temperatura, se puede dirigir la reacción en la dirección deseada. Los Ejemplos 2 y 3 muestran condiciones ilustrativas de cristalización para Mab C225 (ErbituxTM), y los Ejemplos 4 y 5 muestran condiciones ilustrativas de precipitación. También se pueden combinar el proceso de precipitación de acuerdo con la invención y el proceso de cristalización de acuerdo con la invención.

Las temperaturas de reacción adecuadas son las temperaturas de -10 a 40°C, preferentemente de 0 a 25°C y con preferencia muy particular de 4 a 20°C. La presión utilizada es preferentemente de 1 a 20 bar, con particular preferencia es

presión atmosférica. El pH utilizado varía preferentemente entre 4 y 10. La duración de la reacción depende de las condiciones de reacción seleccionadas. En general, la duración de la reacción es de 0,5 horas a 10 días, preferentemente de 1 a 24 horas, con particular preferencia de 2 a 12 horas.

Por solvatos de las formas sólidas de acuerdo con la invención se entienden productos de adición de moléculas de solventes inertes sobre las formas sólidas, de acuerdo con la invención, que se forman debido a sus fuerzas de atracción mutuas. Son solvatos, por ejemplo, los hidratos, tales como monohidratos o dihidratos, o los alcoholatos, es decir, compuestos de adición con alcoholes, tales como, por ejemplo, con etanol.

Las formas sólidas resultantes de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención se pueden separar de la correspondiente solución en la cual se prepararon (por ejemplo por centrifugación y lavado) y, tras la separación se pueden almacenar en una composición distinta o permanecer directamente en la solución de la preparación. Las formas sólidas obtenidas de acuerdo con la invención también se pueden recuperar en los solventes deseados para el uso particular. Las formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención son preferentemente biológicamente activas tras la redisolución o la resuspensión, y la desnaturalización de los anticuerpos no ocurre preferentemente en el proceso de

acuerdo con la invención. Así, se mantiene la eficacia biológica de la proteína.

De modo similar se halló, sorprendentemente, que se pueden preparar formulaciones farmacéuticamente estables con la ayuda de formas sólidas de los anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención. De preferencia, estas formulaciones tienen mayor estabilidad a las influencias fisicoquímicas, tales como, por ejemplo, oxidación, estrés mecánico, valores de pH y de temperatura desfavorables, que las soluciones proteicas convencionales de anticuerpos. Una estabilidad comparable sólo se puede obtener de otro modo mediante métodos de alto costo y con gran consumo de tiempo tales como, por ejemplo, la adición de estabilizantes, almacenamiento en frío, congelamiento o secado por congelación. La elevada estabilidad facilita preferentemente el almacenamiento más simple y menos costoso, el transporte y la preparación de formulaciones farmacéuticamente valiosas, tales como, por ejemplo, formulaciones listas para usar, formulaciones con liberación retardada del ingrediente activo, o liberación controlada durante un período extendido.

En consecuencia, la invención también se refiere a formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención como medicamentos estables en almacenamiento.

La invención también se refiere con particular preferencia a preparaciones farmacéuticas que comprenden al menos

una forma sólida de un anticuerpo anti-EGFR de acuerdo con la invención en forma de precipitado no cristalino, precipitado cristalino o en forma disuelta o suspendida, y opcionalmente excipientes y/o coadyuvantes y/u otros ingredientes farmacéuticamente activos.

Las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden comprender, en consecuencia, formas sólidas de acuerdo con la invención en forma precipitada, es decir, como precipitado o como cristal, o en forma redisuelta o re-suspendida. En consecuencia, la invención también se refiere a preparaciones farmacéuticas que comprenden al menos un precipitado y/o cristal de un anticuerpo anti-EGFR, preferentemente de un anticuerpo anti-EGFR monoclonal, con particular preferencia Mab C225 (cetuximab) o Mab h425 (EMD 72000) y/o sus variantes o fragmentos en forma de precipitado, redisuelto o suspendido, así como opcionalmente excipientes y/o coadyuvantes y/u otros ingredientes farmacéuticamente activos.

Las formas sólidas de los anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención permiten preferentemente la preparación de formulaciones muy concentradas, sin que tenga lugar la indeseable agregación de los anticuerpos de acuerdo con la invención o la indeseable alta viscosidad, como se puede observar en el caso de soluciones proteicas convencionales muy concentradas. En consecuencia, las soluciones lis-

tas para usar, con elevado contenido de ingrediente activo se pueden redissolver o resuspender en solventes acuosos o en un medio acuoso con la ayuda de formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención. Las formulaciones en extremo concentradas de ingredientes activos de proteínas han tenido recientemente un gran aumento. La mayoría de los anticuerpos empleados para la terapia se usan en dosis en la región de mg/kg. Una dosis elevada y los pequeños volúmenes que se deben administrar (por ejemplo de aproximadamente 1 a 1,5 ml para la administración por vía subcutánea) demuestra la demanda de preparaciones proteicas muy concentradas, con concentraciones superiores a 100 mg/ml. Además, las formulaciones proteicas muy concentradas tienen considerables ventajas en los ensayos preclínicos para la investigación de la aceptabilidad y la eficacia *in vitro* e *in vivo* (en un modelo animal), en ensayos clínicos para la investigación de la aceptabilidad y la eficacia en humanos y en el uso clínico del producto (en particular para la administración por vía subcutánea). Sus ventajas consisten, en particular, en que se usa un volumen relativamente pequeño de la preparación. En contraste con la infusión o la inyección de medicamentos proteicos con una concentración relativamente baja, esto permite, por ejemplo, la administración por vía subcutánea de medicamentos proteicos para el paciente. La administración por vía subcutánea de medicamentos proteicos puede de-

berse a diversas causas. Por ejemplo, se puede desear la dirección a un blanco específico en conexión con una "ventana terapéutica". Además, la administración por vía subcutánea tiene la ventaja de que el paciente puede hacerse cargo de la administración por sí mismo, sin depender de personal médico. El ejemplo de la insulina muestra con claridad estas ventajas. Sin embargo, dado que las inyecciones para la administración por vía subcutánea tiene un máximo de 1-1,5 ml, a menudo se necesitan formulaciones proteicas muy concentradas, que contienen más de 100 mg/ml.

Sorprendentemente, se pueden obtener preparaciones farmacéuticas muy concentradas que permiten concentraciones de proteína de preferentemente 10-200 mg/ml, con particular preferencia de 50-150 mg/ml, en una formulación líquida, con la ayuda de formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención. Esto era inesperado, ya que la tendencia a la inestabilidad es mucho mayor en formulaciones proteicas muy concentradas que en formulaciones proteicas diluidas (Fields, G., Alonso, D., Stiger, D., Dill, K. (1992) "Theory for the aggregation of proteins and copolymers." J. Phys. Chem. 96, 3974-3981). La densidad de empaquetamiento de las moléculas de proteína está aumentada con la concentración proteica elevada. En consecuencia, se puede suponer que hay mayor cantidad de colisiones, y que se pueden producir ocasionales asociaciones proteicas. Por lo ge-

5 neral, este proceso tiene lugar por mecanismos de nucleación y crecimiento, en donde los núcleos críticos a menudo son proteínas asociadas solubles que, sin embargo, se pueden convertir rápidamente en precipitados de proteína insoluble (proteína desnaturalizada) (Reithel, J. F. (1962) "The dissociation and association of protein structures", Adv. Protein Chem. 18, 123). El tamaño de los agregados proteicos aumenta con el incremento de la concentración de proteínas, como ya se demostró para la β -lactoglobulina (Roefs, S. P. F. M., De Kruif, K. G. (1994) "A model for the denaturation and aggregation of β -lactoglobulin." por Eur. J. Biochem. 226, 883-889).

15 El límite de las formulaciones muy concentradas de inmunoglobulina es normalmente de 2-50 mg/ml (Humira®) en formulaciones líquidas de anticuerpos listas para usar.

20 Con las formas sólidas de acuerdo con la invención, sin embargo, sea pueden preparar formulaciones muy concentradas estables, lo cual era inesperado. En consecuencia, la etapa de precipitación o de cristalización puede dar una formulación de anticuerpo estable altamente concentrada que, después de la resuspensión o la redisolución, tiene menor viscosidad, comparada con las formulaciones de anticuerpos líquidas de la misma concentración, lo que así simplifica el manejo en el caso de la administración por vía parenteral.

25 En consecuencia, la invención también se refiere a pre-

paraciones farmacéuticas que comprenden al menos una forma sólida de un anticuerpo anti-EGFR de acuerdo con la invención y/o una de sus variantes y/o fragmentos en forma de precipitado no cristalino, precipitado cristalino o en forma disuelta o suspendida, donde el anticuerpo presente es biológicamente activo, caracterizado porque la concentración de anticuerpo es preferentemente de 10-200 mg/ml, con particular preferencia de 50-150 mg/ml.

La invención también se refiere a un proceso para la producción de una preparación farmacéutica altamente concentrada de acuerdo con la invención, caracterizada porque al menos una forma sólida de un anticuerpo anti-EGFR de acuerdo con la invención y/o una de sus variantes y/o fragmentos se disuelve o se resuspende en una solución de acuerdo con la invención, y la concentración de anticuerpo es preferentemente de 10-200 mg/ml, con particular preferencia de 50-150 mg/ml.

Se pueden producir preparaciones acuosas por disolución o suspensión de formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención en una solución acuosa y opcionalmente agregar coadyuvantes. Hasta el momento se agregan ventajosamente volúmenes definidos de soluciones madre que comprenden dichos coadyuvantes en concentraciones definidas a una solución o suspensión con una concentración definida de formas sólidas de acuerdo con la invención, y la mezcla se

5 diluye opcionalmente con agua hasta la concentración calculada previamente. De modo alternativo, los coadyuvantes se pueden agregar en forma sólida. Las cantidades de soluciones madre y/o de agua necesarias en cada caso se pueden añadir luego a la solución o suspensión acuosa obtenida.

Las formas sólidas de los anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención también se pueden disolver o suspender ventajosamente de manera directa en una solución que comprende todos los demás coadyuvantes.

10 Se preparan soluciones o suspensiones que contienen anticuerpos con un pH de 4 a 10, preferentemente con un pH de 5 a 9, y una osmolalidad de 250 a 350 mOsmol/kg ventajosamente a partir de las formas sólidas de acuerdo con la invención, por reconstitución con solventes acuosos. La preparación resuspendida o redisuelta se puede administrar entonces de forma directa, sustancialmente sin dolor, por vía intravenosa, intraarterial y también subcutánea. Además, la preparación también se puede agregar a soluciones para infusión, tales como, por ejemplo, solución de glucosa, solución fisiológica isotónica o solución de Ringer, que también puede contener otros ingredientes activos, lo que permite la administración de cantidades relativamente grandes de ingredientes activos.

25 Las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también pueden comprender mezclas de precipitados

y/o cristales de acuerdo con la invención en forma de precipitado o cristal y/o redisuelta o resuspendida.

Las preparaciones de acuerdo con la invención son fisiológicamente bien toleradas, fáciles de preparar, se pueden administrar con precisión y son preferentemente estables con respecto a los ensayos, productos de descomposición y agregados durante el almacenamiento y transporte y durante múltiples procesos de congelación y descongelación. Con preferencia, se pueden almacenar de forma estable durante un período de al menos tres meses a dos años a temperatura de refrigerador (2-8°C) y a temperatura ambiente (23-27°C) y 60% de humedad relativa ambiente (RH). Sorprendentemente, las preparaciones de acuerdo con la invención son preferentemente estables en almacenamiento de al menos seis meses aún con temperaturas y humedades ambiente elevadas, por ejemplo a una temperatura de 40°C y 75% de humedad relativa ambiente.

Por ejemplo las formas sólidas de acuerdo con la invención se pueden almacenar de forma estable por secado y cuando es necesario se convierten en una preparación farmacéutica lista para usar por disolución o suspensión. Entre los posibles métodos de secado se cuentan, p.ej., sin limitaciones, secado bajo gas nitrógeno, secado en horno de vacío, liofilización, lavado con solventes orgánicos y posterior secado al aire, secado en lecho líquido, secado en lecho

fluido, secado por rocío, secado por rodillo, secado en capas, secado al aire a temperatura ambiente y otros métodos.

El término "cantidad efectiva" denota la cantidad de un medicamento o de un ingrediente farmacéutico activo que causa una respuesta biológica o médica en un tejido, sistema, animal o humano que busca o es de interés, por ejemplo, para un investigador o médico.

Además, el término "cantidad terapéuticamente efectiva" denota una cantidad que, comparada con un sujeto correspondiente que no recibió dicha cantidad, tiene las siguientes consecuencias: mejor tratamiento, curación, prevención o eliminación de una enfermedad, síndrome, estado patológico, molestia, trastorno o prevención de efectos secundarios o también la reducción del progreso de una enfermedad, molestia o trastorno. El término "cantidad terapéuticamente efectiva" también abarca las cantidades que son efectivas para aumentar la función fisiológica normal.

Los medicamentos se pueden administrar en forma de dosis unitarias que comprenden una cantidad predeterminada de ingrediente activo por unidad de dosis. Una unidad de este tipo puede comprender, por ejemplo, de 0,5 mg a 1 g, preferentemente de 1 mg a 800 mg, de un ingrediente activo de acuerdo con la invención, según el estado patológico tratado, el método de administración y la edad, el peso y la salud del paciente. Las formulaciones unitarias de preferencia

son las que comprenden una dosis o subdosis diaria, según se indicó antes, o una de sus fracciones de ingrediente activo. Además, este tipo de medicamentos se pueden preparar por medio de uno de los procesos generalmente conocidos en el sector farmacéutico.

Los medicamentos se pueden adaptar para la administración por alguna vía de preferencia, por ejemplo por vía oral (incluyendo bucal o sublingual), rectal, pulmonar, nasal, tópica (incluyendo bucal, sublingual o transdérmica), vaginal o parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, intravenosa o intradérmica). Los medicamentos de este tipo se pueden preparar mediante todos los procesos conocidos en el sector farmacéutico, por ejemplo, por combinación del ingrediente activo con el o los excipientes o coadyuvantes.

La administración parenteral es preferentemente adecuada para la administración de los medicamentos de acuerdo con la invención. En el caso de la administración parenteral, se prefieren particularmente las administraciones intravenosa y subcutánea. En el caso de la administración intravenosa, la inyección se puede aplicar directamente o también como adición a soluciones por infusión.

Los medicamentos para la administración por vía subcutánea son particularmente adecuados, dado que se pueden preparar formulaciones estables muy concentradas con la ayuda de formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la

invención. De ese modo, se pueden obtener las formulaciones muy concentradas necesarias para la administración parenteral o subcutánea, y los pequeños volúmenes que se pueden administrar.

5 La administración por vía subcutánea tiene la ventaja de que el paciente se puede administrar a sí mismo el medicamento, sin necesidad de ayuda médica experta. Las formas sólidas de los anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención también son adecuados para la preparación de medicamentos para administrar por vía parenteral con liberación
10 lenta, sostenida y/o controlada del ingrediente activo. Los precipitados y/o cristales de acuerdo con la invención son preferentemente en forma de una suspensión que se disuelve durante un período extendido y/o controlado y se encuentra
15 entonces en el estado nativo y efectivo. Las formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención también son, por lo tanto, adecuadas para la preparación de formulaciones de liberación retardada, que son ventajosas para el paciente, dado que la administración sólo es necesaria a intervalos relativamente prolongados. Las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también se pueden inyectar directamente en el tumor y así desarrollar su efecto
20 directamente en el sitio de acción según se pretende.

 Los medicamentos adaptados para la administración parenteral incluyen soluciones para inyección acuosas y no
25

acuosas estériles que comprenden antioxidantes, buffers, bacteriostáticos y solutos, a través de los cuales la formulación es isotónica con la sangre del receptor que debe ser tratado; así como suspensiones estériles acuosas y no acuosas, que pueden comprender medios de suspensión y espesantes. Las formulaciones se pueden administrar en contenedores de dosis única o múltiple, p.ej. ampollas selladas y viales, y almacenar en estado seco por congelación (liofilizado) por lo que sólo es necesario agregar el portador líquido estéril, por ejemplo agua para inyecciones, inmediatamente antes de usar. Las soluciones y suspensiones para inyección preparadas de acuerdo con la formulación se pueden producir a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos.

Las formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención, opcionalmente en forma redisuelta, también se pueden administrar en forma de sistemas de suministro de liposomas, tales como, por ejemplo, pequeñas vesículas unilaminares, grandes vesículas unilaminares y vesículas multilaminares. Los liposomas se pueden formar a partir de diversos fosfolípidos tales como, por ejemplo, colesterol, esteárilamina o fosfatidilcolinas.

Las formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención y sus variantes en forma de precipitado, redisueltas o suspendidas también se pueden acoplar con polímeros solubles como excipientes medicinales dirigidos. Di-

chos polímeros pueden abarcar polivinilpirrolidona, copolí-
mero de pirano, polihidroxipropilmetacrilamidofenol, polihidroxietilaspirtamidofenol o polilisina de óxido de polietileno, sustituido con radicales palmitoílo. Las formas de anticuerpos anti-EGFR se pueden acoplar además a una clase de polímeros biodegradables adecuados para lograr la liberación lenta de un medicamento, p.ej. ácido poliláctico, poli-epsilon-caprolactona, ácido polihidroxibutírico, poliortoésteres, poliacetales, polidihidroxipiranos, policianoacrilatos, ácido poliláctico-co-glicólico, polímeros tales como conjugados entre dextrano y metacrilatos, polifosfoésteres, diversos polisacáridos y poliaminas y poli-epsilon-caprolactona, albúmina, quitosano, colágeno o gelatina modificada y copolímeros de hidrogeles con enlaces cruzados o de bloque anfipáticos.

Los medicamentos adaptados para la administración transdérmica se pueden aplicar como emplastes para lograr un contacto extendido estrecho con la epidermis del receptor. Así, p.ej., se puede proveer el ingrediente activo desde el emplaste mediante iontoforesis, como se describe en términos generales en Pharmaceutical Research, 3(6), 318 (1986).

Los medicamentos adaptados para la administración tópica se pueden formular como ungüentos, cremas, suspensiones, lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, rocíos, aerosoles o aceites.

Para el tratamiento del ojo o de otros tejidos externos, por ejemplo la boca y la piel, las formulaciones se administran preferentemente como ungüento tópico o crema. En el caso de la formulación como ungüento, el ingrediente activo se puede emplear con una base de crema con parafina o miscible con agua. De modo alternativo, el ingrediente activo se puede formular para dar una crema con una base de crema de aceite en agua o una base de agua en aceite.

Los medicamentos adaptados para la administración tópica del ojo incluyen gotas oftálmicas, donde el ingrediente activo se disuelve o se suspende en un excipiente adecuado, en particular un solvente acuoso.

Los medicamentos adaptados para la administración rectal se pueden suministrar en forma de supositorios o enemas.

Los medicamentos adaptados para la administración por inhalación abarcan polvos o vapores finamente particulados que pueden ser producidos mediante diversos tipos de dispensadores a presión con aerosoles, atomizadores o insufladores. A los fines de la presente invención, se da particular preferencia a los polvos de las formas sólidas de los anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención para la administración como inhalante.

Los medicamentos adaptados a la administración vaginal se pueden suministrar como pesarios, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o formulaciones en aerosol.

Es obvio que, además de los constituyentes particularmente mencionados con anterioridad, los medicamentos de acuerdo con la invención también pueden comprender otros agentes habituales en el sector con relación al tipo particular de formulación farmacéutica.

La invención además se refiere a equipos (kits) compuestos por paquetes separados de

- a) una cantidad efectiva de un precipitado y/o cristal de un anticuerpo anti-EGFR, preferentemente de un anticuerpo anti-EGFR monoclonal, con particular preferencia de Mab C225 (cetuximab) o Mab h425 (EMD 72000) y/o de sus variantes o fragmentos en forma de precipitado, en forma redisuelta o suspendida y
- b) una cantidad efectiva de otro medicamento o ingrediente activo.

El kit contiene recipientes adecuados, tales como cajas o cartones, frascos, bolsas o ampollas individuales. El equipo puede contener, por ejemplo, ampollas separadas, donde cada una contiene una cantidad efectiva de una forma sólida de acuerdo con la invención, opcionalmente en forma redisuelta, y una cantidad efectiva de otro ingrediente activo medicamentoso en forma disuelta o liofilizada.

Una cantidad terapéuticamente efectiva de una forma sólida de un anticuerpo anti-EGFR de acuerdo con la invención depende de varios factores, tales como, por ejemplo, la edad

y el peso, el estado patológico preciso que requiere tratamiento y su gravedad, la naturaleza de la formulación y el método de administración, y en última instancia es determinado por el médico o veterinario tratante. No obstante, una

5 cantidad efectiva de un anticuerpo anti-EGFR de acuerdo con la invención para el tratamiento de un desarrollo neoplásico, por ejemplo cáncer intestinal o de mama, oscila generalmente en el rango de 0,1 a 100 mg/kg de peso corporal del receptor (mamífero) por día y, en particular, típicamente en

10 el rango del 1 a 10 mg/kg de peso corporal por día. Por lo tanto, la cantidad real por día para un mamífero adulto que pesa 70 kg sería usualmente de entre 70 y 700 mg, donde esta cantidad se puede dar como dosis única por día o usualmente en una serie de subdosis (tales como, p.ej., dos, tres, cua-

15 tro, cinco o seis) por día, de modo que la dosis diaria total es la misma. El título de anticuerpo adecuado se determina mediante métodos conocidos por el especialista en el arte. La dosis propuesta para la administración suele ser suficiente para lograr la acción inhibidora del tumor buscada. No obstante, también se debe elegir la dosis más baja

20 posible para no tener efectos secundarios indeseados, tales como reacciones cruzadas, reacciones anafilácticas o similares.

La invención también se refiere al uso de formas sólidas de acuerdo con la invención para la preparación de un

25

medicamento que comprende el anticuerpo biológicamente activo y/o una de sus variantes y/o fragmentos en forma de precipitado no cristalino, precipitado cristalino o en forma disuelta o suspendida.

5 Los medicamentos de acuerdo con la invención se pueden usar, en particular, para la prevención y/o el tratamiento de enfermedades y estados patológicos. En consecuencia, la invención se refiere al uso de formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención, preferentemente anti-
10 cuerpos monoclonales anti-EGFR, con particular preferencia Mab C225 (cetuximab) o Mab h425 (EMD 72000) y/o sus variantes o fragmentos en forma de precipitado, redisuelta o suspendida para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades.

15 Se ha demostrado en diversos estudios *in vitro* e *in vivo* que el bloqueo de EGFR por anticuerpos actúa contra los tumores en diversos niveles, por ejemplo por inhibición de la proliferación de células cancerosas, reducción de angiogénesis mediada por un tumor, inducción de apoptosis de células cancerosas y aumento de los efectos tóxicos de la radioterapia y la quimioterapia convencional.
20 lulas cancerosas y aumento de los efectos tóxicos de la radioterapia y la quimioterapia convencional.

 Los medicamentos que comprenden formas sólidas de los anticuerpos de acuerdo con la invención en forma redisuelta o suspendida son capaces de regular, modular o inhibir efectivamente EGFR y, por ello, se pueden emplear para la pre-
25 tivamente EGFR y, por ello, se pueden emplear para la pre-

vención y/o el tratamiento de enfermedades conectadas con la actividad de EGFR no regulada o alterada. En particular, las formas sólidas de los anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención puede emplearse, en consecuencia, en el tratamiento de ciertas formas de cáncer y en enfermedades causadas por angiogénesis patológica, tales como retinopatía diabética o inflamación.

En consecuencia, la invención también se refiere al uso de formas sólidas de acuerdo con la invención en forma de precipitado, redisuelta o resuspendida para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades causadas, mediadas y/o propagadas por EGFR y/o por la transducción de señales mediadas por EGFR.

Los medicamentos de acuerdo con la invención son particularmente adecuados para el tratamiento y/o la prevención del cáncer, p.ej. carcinomas sólidos tales como p.ej., carcinomas (p.ej. de pulmón, páncreas, tiroides, vejiga o colon), enfermedades mieloides (p.ej. leucemia mieloide) o adenomas (por ejemplo adenoma colónica velludo), angiogénesis patológica y migración de células metastáticas. Los medicamentos también son útiles para el tratamiento de inflamación crónica dependiente de la activación del complemento (Niculescu et al. (2002) Immunol Res., 24: 191-199) e inmunodeficiencia inducida por VIH-1 (virus de inmunodeficiencia humana tipo 1) (Popik et al. (1998) J Virol, 72: 6406-6413).

Además, los presentes medicamentos son adecuados como ingredientes activos farmacéuticos para mamíferos, en particular los seres humanos, para el tratamiento enfermedades inducidas por EGFR. El término "enfermedades inducidas por EGFR" se refiere a estados patológicos dependientes de la actividad de EGFR. EGFR interviene directa o indirectamente en las vías de transducción de señales de diversas actividades celulares, por ejemplo proliferación, adhesión y migración, así como la diferenciación. Las enfermedades asociadas con la actividad de EGFR incluyen la proliferación de células tumorales, la neovascularización patológica que favorece el crecimiento de tumores sólidos, la neovascularización en el ojo (retinopatía diabética, degeneración macular inducida por la edad y similares) e inflamación (psoriasis, artritis reumatoidea y similares).

Las enfermedades analizadas aquí se suelen dividir en dos grupos: enfermedades hiperproliferativas y no hiperproliferativas. En esta conexión, se consideran enfermedades no cancerosas: psoriasis, artritis, inflamación, endometriosis, cicatrización, hiperplasia benigna de próstata, enfermedades inmunológicas, enfermedades autoinmunes y enfermedades de inmunodeficiencia, de las cuales artritis, inflamación, enfermedades inmunológicas, enfermedades autoinmunes y enfermedades de inmunodeficiencia se suelen considerar enfermedades no hiperproliferativas.

En esta conexión, se consideran enfermedades cancerosas el cáncer de cerebro, cáncer de pulmón, carcinoma de células escamosas, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer colo-
5 rrectal, cáncer de mama, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de esófago, cáncer ginecológico, cáncer de tiroides, linfoma, leucemia crónica y leucemia aguda, y todos se suelen incluir en el grupo de enfermedades hiperproliferativas. En particular, el desarrollo de las células cancerosas y en
10 particular el crecimiento de células cancerosas mediado directamente o indirectamente por EGFR es una enfermedad que representa un objeto de la presente invención.

Se puede demostrar que los medicamentos de acuerdo con la invención tienen acción antiproliferativa *in vivo* en un
15 modelo de tumor de xenotrasplante. Los medicamentos de acuerdo con la invención se administran a un paciente con una enfermedad hiperproliferativa, por ejemplo para inhibir el desarrollo del tumor, para reducir la inflamación asociada a una enfermedad linfoproliferativa, para inhibir el re-
20 chazo a un trasplante o el daño neurológico debido a la reparación tisular, etc. Los presentes medicamentos son útiles para fines preventivos o terapéuticos. Tal como se usa en la presente, el término "tratar" se usa como referencia tanto a la prevención de enfermedades como al tratamiento de las mo-
25 lestias existentes. La prevención de la proliferación se lo-

gra por la administración de los medicamentos de acuerdo con la invención antes del desarrollo de la enfermedad evidente, por ejemplo, para evitar el crecimiento del tumor, prevenir el crecimiento metastático, reducción de la restenosis asociada con la cirugía cardiovascular, etc. De modo alternativo, los medicamentos se usan para el tratamiento de enfermedades continuas al estabilizar o mejorar los síntomas clínicos del paciente.

El huésped o paciente puede pertenecer a cualquier especie de mamífero, por ejemplo, una especie de primate, y en particular humanos y roedores, por ejemplo ratones, ratas y hámsteres, conejos, caballos, vacas, perros, gatos, etc. Los modelos animales son de interés para estudios de experimentación, pues proveen un modelo para el tratamiento de la enfermedad humana.

La receptividad de cierta célula al tratamiento con los medicamentos de acuerdo con la invención se puede determinar mediante pruebas *in vitro*. Típicamente, un cultivo de la célula se incubaba con un medicamento de acuerdo con la invención con diferentes concentraciones durante un período suficiente para permitir que los ingredientes activos induzcan la muerte celular o inhiban la migración, por lo general entre aproximadamente una hora y una semana. Las pruebas *in vitro* se pueden llevar a cabo mediante células cultivadas provenientes de una muestra de biopsia. Luego se cuentan las

células vitales remanentes después del tratamiento.

La dosis varía según los medicamentos específicos utilizados, la enfermedad específica, el estado del paciente, etc. Típicamente, una dosis terapéutica es suficiente para
5 reducir considerablemente la población celular indeseada en el tejido blanco, mientras se mantiene la vitalidad del paciente. Generalmente se continúa el tratamiento hasta obtener una reducción considerable, por ejemplo una reducción de al menos aproximadamente el 50% del recuento celular específico,
10 fico, y se puede continuar hasta que esencialmente no se detecten células no deseadas en el organismo.

Existen diversos sistemas de ensayo para la identificación de inhibidores de EGFR. En el ensayo de proximidad de centelleo (Sorg et al., J. of Biomolecular Screening, 2002,
15 7, 11-19) y el ensayo con placa flash se mide la fosforilación radiactiva de una proteína o péptido como sustrato, mediante γ ATP. En presencia de un compuesto inhibidor se puede detectar una señal radiactiva reducida o nula. Además, las tecnologías de transferencia de energía de resonancia fluorescente homogénea por resolución en el tiempo (HTR-FRET) y
20 polarización de fluorescencia (FP) son útiles como métodos de ensayo (Sills et al., J. of Biomolecular Screening, 2002, 191-214).

Otros métodos de ensayo no radiactivos por ELISA utilizan fosfo-anticuerpos específicos (fosfo-AB). Los fosfo-AB
25

sólo se unen al sustrato fosforilado. Esta unión se puede detectar mediante un segundo anticuerpo antioveja conjugado a peroxidasa por quimioluminiscencia (Ross et al., 2002, Biochem. J., en imprenta, manuscrito BJ20020786).

5 Existen muchas enfermedades y estados patológicos asociados con la desregulación de la proliferación celular y la muerte celular (apoptosis). Las enfermedades y los estados patológicos que se pueden tratar, prevenir o aliviar mediante medicamentos de acuerdo con la invención incluyen las en-
10 fermedades y los estados patológicos enumerados más adelante, pero sin limitaciones. Los medicamentos de acuerdo con la invención son útiles para el tratamiento y/o la prevención de varias enfermedades y estados patológicos diversos, que afectan la proliferación y/o la migración de células
15 musculares lisas y/o células inflamatorias en la capa íntima de un vaso, lo que da por resultado una restricción del flujo sanguíneo a través de dicho vaso, por ejemplo en lesiones oclusivas de la neoíntima. Entre las enfermedades oclusivas de vasos por trasplante se incluyen aterosclerosis, enfermedad
20 vascular coronaria tras trasplante, estenosis de vena trasplantada, restenosis de prótesis perianastomótica, restenosis posterior a angioplastia o colocación de stents y similares.

 La presente invención se refiere al uso de medicamentos
25 de acuerdo con la invención para el tratamiento o la preven-

ción de cáncer. En consecuencia, la invención se refiere con particular preferencia al uso de formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención
5 de tumores y/o metástasis de tumores, donde el tumor se selecciona con particular preferencia del grupo formado por tumor de cerebro, tumor del tracto urogenital, tumor del sistema linfático, tumor de estómago, tumor de laringe, tumor de leucemia monocítica, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma
10 noma de pulmón de células pequeñas, cáncer de páncreas, glioblastoma y carcinoma de mama, sin restricciones.

La invención también se refiere al uso de medicamentos de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de enfermedades seleccionadas
15 del grupo formado por enfermedades cancerosas que consiste en carcinoma de células escamosas, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer colorectal, cáncer de mama, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de esófago, cáncer ginecológico, cáncer de páncreas,
20 linfoma, leucemia crónica y leucemia aguda.

Los medicamentos de acuerdo con la invención se pueden administrar a pacientes para el tratamiento de cáncer. Los presentes medicamentos inhiben la angiogénesis tumoral y, así, influyen sobre el desarrollo de los tumores (J. Rak et
25 al., Cancer Research, 55: 4575-4580, 1995). Las propiedades

inhibidoras de la angiogénesis de los medicamentos de acuerdo con la invención también son adecuados para el tratamiento de ciertas formas de ceguera asociada a la neovascularización de la retina.

5 En consecuencia, la invención también se refiere al uso de formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención en sus formas de precipitado, redisuelta o suspendida para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades causadas, mediadas
10 y/o propagadas por angiogénesis.

Una enfermedad de este tipo que incluye angiogénesis es una enfermedad ocular, tales como vascularización retiniana, retinopatía diabética, degeneración macular inducida por la edad y similares.

15 En consecuencia, la invención también se refiere al uso de formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención en sus formas de precipitado, redisuelta o suspendida para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades seleccionadas del
20 grupo formado por vascularización de la retina, retinopatía diabética, degeneración macular inducida por la edad y/o enfermedades inflamatorias.

La invención se refiere, además, al uso de medicamentos de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o la prevención
25 vención de enfermedades seleccionadas del grupo formado por

psoriasis, artritis reumatoidea, dermatitis de contacto, reacción de hipersensibilidad de tipo tardío, inflamación, endometriosis, cicatrización, hiperplasia benigna de próstata, enfermedades inmunológicas, enfermedades autoinmunes y enfermedades de inmunodeficiencia.

La invención también se refiere al uso de medicamentos de acuerdo con la invención para el tratamiento y/o la prevención de osteopatías seleccionadas del grupo formado por osteosarcoma, osteoartritis y raquitismo.

10 Los medicamentos de acuerdo con la invención también se pueden usar para proporcionar efectos aditivos o sinérgicos en ciertas quimioterapias e irradiaciones existentes contra el cáncer, y/o se pueden usar para restablecer la eficacia de ciertas quimioterapias e irradiaciones existentes contra
15 el cáncer.

En consecuencia, la invención también se refiere al uso de formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención en sus formas de precipitado, redisuelta o suspendida para la preparación de un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de enfermedades donde se administra
20 una cantidad terapéuticamente efectiva de una forma sólida de acuerdo con la invención en sus formas de precipitado, redisuelta o suspendida en combinación con un compuesto del grupo formado por 1) modulador de receptor de estrógeno, 2)
25 modulador de receptor de andrógeno, 3) modulador de receptor

de retinoide, 4) agente citotóxico, 5) agente antiprolif-
erativo, 6) inhibidores de prenil proteína transferasa, 7)
inhibidores de HMG-CoA reductasa, 8) inhibidores de proteasa
de VIH 9) inhibidores de la transcriptasa inversa, 10) in-
5 hibidores de receptor de factor de crecimiento y 11) inhibi-
dores de angiogénesis.

En consecuencia, la invención también se refiere al uso
de formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la
invención en sus formas de precipitado, redisuelta o sus-
10 pendida para la preparación de un medicamento para el trata-
miento y/o la prevención de enfermedades en donde se admi-
nistra una cantidad terapéuticamente efectiva de una forma
sólida de acuerdo con la invención en sus formas de precipi-
tado, redisuelta o suspendida en combinación con radiotera-
15 pia y un compuesto del grupo formado por 1) modulador de re-
ceptor de estrógeno, 2) modulador de receptor de andrógeno,
3) modulador de receptor de retinoide 4) agente citotóxico,
5) agente antiproliferativo, 6) inhibidores de prenil pro-
teína transferasa, 7) inhibidores de HMG-CoA reductasa, 8)
20 inhibidores de proteasa de VIH 9) inhibidores de transcrip-
tasa inversa, 10) inhibidores de receptor de factor de cre-
cimiento y 11) inhibidores de angiogénesis.

En consecuencia, los medicamentos de acuerdo con la in-
vención también se pueden administrar junto con otros agen-
25 tes terapéuticos bien conocidos que se seleccionan por su

particular utilidad contra la condición que se trata. Por ejemplo, en el caso de condiciones patológicas óseas, entre las combinaciones que serían favorables se incluyen las que contienen bisfosfonatos antirresortivos, tales como alendronato y risedronato, bloqueadores de integrina (como se define más adelante), tales como antagonistas $\alpha_v\beta_3$, estrógenos conjugados utilizados en terapia de reemplazo hormonal, tales como Prempro®, Premarin® y Endometrion®; moduladores selectivos de receptor de estrógenos (SERM), tales como raloxifeno, droloxifeno, CP-336.156 (Pfizer) y lasofoxifeno, inhibidores de catepsina K e inhibidores de bomba de protones ATP.

Los presentes medicamentos también son adecuados para la combinación con agentes anticancerosos conocidos. Estos agentes anticancerosos conocidos incluyen los siguientes: moduladores de receptor de estrógeno, moduladores de receptor de andrógenos, moduladores de receptor de retinoide, agentes citotóxicos, agentes antiproliferativos, inhibidores de prenil proteína transferasa, inhibidores de HMG-CoA reductasa, inhibidores de proteasa de VIH, inhibidores de transcriptasa inversa, inhibidores de factor de crecimiento e inhibidores de angiogénesis. Los presentes compuestos son particularmente adecuados para administrar al mismo tiempo que la radioterapia.

“Moduladores de receptor de estrógenos” se refiere a

compuestos que interfieren con o inhiben la unión del estrógeno al receptor, sin importar el mecanismo. Entre los ejemplos de moduladores de receptor de estrógenos se incluyen, sin limitaciones, tamoxifeno, raloxifeno, idoxifeno, LY353381, LY 117081, toremifeno, fulvestrant, 2,2-dimetilpropanoato de 4-[7-(2,2-dimetil-1-oxopropoxi-4-metil-2-[4-[2-(1-piperidinil)etoxi]fenil]-2H-1-benzopiran-3-il]fenilo, 4,4'-dihidroxibenzofenon-2,4-dinitrofenilhidrazona y SH646.

“Moduladores de receptor de andrógeno” se refiere a compuestos que interfieren con o inhiben la unión de los andrógenos con el receptor, sin importar el mecanismo. Ejemplos de moduladores de receptor de andrógenos incluyen finasterida y otros inhibidores de 5 α -reductasa, nilutamida, flutamida, bicalutamida, liarozol y acetato de abiraterona.

“Moduladores de receptor de retinoide” se refiere a compuestos que interfieren con o inhiben la unión de los retinoides con el receptor, sin importar el mecanismo. Ejemplos de moduladores de receptor de retinoides incluyen bexaroteno, tretinoína, ácido 13-cis-retinoico, ácido 9-cis-retinoico, α -difluorometilornitina, ILX23-7553, trans-N-(4'-hidroxifenil)retinamida y N-4-carboxifenilretinamida.

“Agentes citotóxicos” se refiere a compuestos que dan por resultado la muerte celular, principalmente por acción directa sobre la función celular, o inhiben o interfieren con la miosis celular, e incluyen agentes alquilantes, fac-

tores de necrosis tumoral, intercaladores, inhibidores de microtubulina e inhibidores de topoisomerasa.

Ejemplos de agentes citotóxicos incluyen, sin limitaciones, tirapazimina, sertenef, caquectina, ifosfamida, ta-
 5 sonermina, lonidamina, carboplatino, altretamina, prednimustina, dibromodulcitol, ranimustina, fotemustina, nedaplatino, oxaliplatino, temozolomida, heptaplatino, estramustina, tosilato de improsulfano, trofosfamida, nimustina, cloruro de dibrospidio, pumitepa, lobaplatino, satraplatino, profi-
 10 romicina, cisplatino, irofulveno, dexifosfamida, cis--aminodicloro(2-metilpiridina)platino, bencilguanina, glufosfamida, GPX100, tetracloruro de (trans,trans,trans)-bis-mu-(hexan-1,6-diamin)-mu-[diamin-platino
 (II)]bis[diamin(cloro)platino (II)], diarizidinil-espermina,
 15 trióxido de arsénico, 1-(11-dodecilamino-10-hidroxiundecil)-3,7-dimetilxantina, zorrubicina, idarrubicina, daunorrubicina, bisantreno, mitoxantrona, pirarrubicina, pinafida, valrubicina, amrubicina, antineoplastona, 3'-desamino-3'-morfolino-13-desoxo-10-hidroxicarminomicina, anamicina, ga-
 20 larrubicina, elinafida, MEN10755 y 4-desmetoxi-3-desamino-3-azindinil-4-metilsulfonildaunorrubicina (véase el documento WO 00/50032).

Ejemplos de inhibidores de microtubulina incluyen paclitaxel, sulfato de vindesina, 3',4'-dideshidro-4'-desoxi-
 25 8'-norvincaleucoblastina, docetaxol, rizoxina, dolastatina,

isetionato de mivobulina, auristatina, cemadotina, RPR109881, BMS184476, vinflunina, criptoficina, 2,3,4,5,6-pentafluoro-N-(3-fluoro-4-metoxifenil)bencensulfonamida, anhidrovinblastina, N,N-dimetil-L-valil-L-valil-N-metil-L-valil-L-prolil-L-prolin-t-butilamida, TDX258 y BMS188797.

Algunos ejemplos de inhibidores de topoisomerasa son topotecano, hicaftamina, irinotecano, rubitecano, 6-etoxipropionil-3',4'-O-exobencilidencartreusin, 9-metoxi-N,N-dimetil-5-nitropirazolo[3,4,5-kl]acridin-2-(6H)-propanamina, 1-amino-9-etil-5-fluoro-2,3-dihidro-9-hidroxi-4-metil-1H,12H-benzo[de]-piran[3',4':b,7]-indolizino[1,2b]-quinolin-10,13-(9H,15H)diona, lurtotecano, 7-[2-(N-isopropilamino)etil]-(20S)camptotecina, BNP1350, BNPI1100, BN80915, BN80942, fosfato de etopósido, tenipósido, sobuzoxano, 2'-dimetilamino-2'-desoxietopósido, GL331, N-[2-(dimetilamino)etil]-9-hidroxi-5,6-dimetil-6H-pirido(4,3-b]carbazol-1-carboxamida, asulacrina, (5a,5aB,8aa,9b)-9-[2-[N-[2-(dimetilamino)etil]-N-metilamino]etil]-5-[4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil]-5,5a,6,8,8a,9-hexohidrofuro(3',4':6,7)-nafto-(2,3-d)-1,3-dioxol-6-ona, 2,3-(metilendioxi)-5-metil-7-hidroxi-8-metoxibenzo[c]fenantridinio, 6,9-bis[(2-aminoetil)amino]benzo[g]isoquinolin-5,10-diona, 5-(3-aminopropilamino)-7,10-dihidroxi-2-(2-hidroxi-etilaminometil)-6H-pirazolo[4,5,1-de]acridin-6-ona, N-[1-[2-(dietilamino)etilamino]-7-metoxi-9-oxo-9H-tioxanten-4-ilmetil]formamida, N-(2-(dimetilamino)etil)acridin-

4-carboxamida, 6-[[2-(dimetilamino)etil]amino]-3-hidroxi-7H-indeno[2,1-c]quinolin-7-ona y dimesna.

"Agentes antiproliferativos" incluyen oligonucleótidos de ARN y ADN antisentido, tales como G3139, ODN698, RVAS-
 5 KRAS, GEM231 e INX3001, y antimetabolitos tales como enocitabina, carmofur, tegafur, pentostatina, doxifluridina, trimetrexato, fludarabina, capecitabina, galocitabina, ocfosfato de citarabina, hidrato de fosteabina de sodio, raltitrexed, paltitrexid, emitefur, tiazofurina, decitabina, nolatrexed, pemetrexed, nelzarabina, 2'-desoxi-2'-metilidencitidina, 2'-fluorometilen-2'-desoxicitidina, N-[5-(2,3-dihidrobenzofuril)sulfonil]-N'-(3,4-diclorofenil)urea, N6-(4-desoxi-4-[N2-[2(E), 4(E)-tetradecadienoil]glicilamino]-L-glicero-B-L-manoheptopiranosil]adenina, aplidina, ecteinas-
 15 cidina, troxacitabina, ácido 4-[2-amino-4-oxo-4,6,7,8-tetrahidro-3H-pirimidino[5,4-b]-1,4-tiazin-6-il-(S)-etil]-2,5-tienoil-L-glutámico, aminopterina, 5-fluorouracilo, alanosina, éster del ácido 11-acetil-8-(carbamoiloximetil)-4-formil-6-metoxi-14-oxa-1,11-diazatetra-ciclo(7.4.1.0.0)tetra-
 20 deca-2,4,6-trien-9-il-acético, swainsonina, lometrexol, dexrazoxano, metioninasa, 2'-ciano-2'-desoxi-N4-palmitoil-1-B-D-arabinofuranosil-citosina y tiosemicarbazona de 3-aminopiridin-2-carboxaldehído. "Agentes antiproliferativos" también incluyen anticuerpos monoclonales contra factores de
 25 crecimiento distintos de los enumerados antes bajo "inhibi-

dores de angiogénesis", tales como trastuzumab, y genes supresores de tumores, tales como p53 que se pueden proveer a través de una transferencia génica mediada por virus recombinante (véase patente US N° 6.069.134, p.ej.). Los medicamentos de acuerdo con la invención también se pueden administrar en combinación con todos los demás anticuerpos terapéuticos conocidos por los expertos en el arte o los ingredientes farmacéuticos activos que son adecuados en conexión con las enfermedades antes mencionadas.

10 Además, las formas sólidas según la invención de los anticuerpos de acuerdo con la invención en sus formas de precipitado, redisuelta o suspendida se pueden usar para el aislamiento y la investigación de la actividad o la expresión de EGFR. Además, son particularmente adecuados para ser
15 usados como métodos de diagnóstico de enfermedades relacionadas con la actividad no regulada o alterada de EGFR. En consecuencia, la invención también se refiere al uso de formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR de acuerdo con la invención en sus formas de precipitado, redisuelta o suspendida
20 da como activadores o inhibidores de EGFR, con particular preferencia como inhibidores de EGFR.

 Con fines diagnósticos, los anticuerpos de acuerdo con la invención pueden recibir, por ejemplo, una marca radiactiva. Un método de rotulado preferido es el método de yodogénico (Fraker et al., 1978). Con fines diagnósticos, el an-
25 génico (Fraker et al., 1978). Con fines diagnósticos, el an-

ticuerpo usado con particular preferencia es el fragmento F(ab')₂. Así se obtienen excelentes resultados, lo cual significa que no es necesario restar el fondo. Los fragmentos de este tipo se pueden preparar mediante los métodos conocidos (por ejemplo, Herlyn et al., 1983). En general se realiza la digestión con pepsina en pH ácido, y los fragmentos se separan de la IgG no digerida y de los fragmentos de cadenas pesadas mediante cromatografía de proteína A en SepharoseTM.

Los precipitados y/o cristales de acuerdo con la invención preferentemente exhiben una actividad biológica ventajosa, que se detecta con facilidad en los ensayos de enzima, como se describe en los ejemplos. En los ensayos basados en enzimas de este tipo, los anticuerpos de acuerdo con la invención preferentemente exhiben y causan un efecto inhibitorio, que se suele documentar mediante valores de IC₅₀ en un rango adecuado, preferentemente en el rango micromolar, y más preferentemente en el rango nanomolar.

Métodos de determinación

Respecto de los métodos de determinación, la presente invención abarca todos los métodos de determinación conocidos por los expertos en el arte o de la bibliografía.

Las estructuras cristalinas se pueden determinar, por ejemplo, respecto del espectro de difracción en la medición de la difracción por rayos X. En particular, las estructuras cristalinas de los anticuerpos de acuerdo con la invención

se pueden determinar mediante estudios con microscopia mediante filtros polarizados. Otros métodos de determinación, sin restricciones, abarcan las microfotografías electrónicas.

5 La determinación del tamaño de la proteína, la integridad estructural, la pureza o el patrón de glucosilación de las formas sólidas de acuerdo con la invención en sus formas de precipitado, redisuelta o suspendida abarcan, sin restricciones, SE-HPLC, mapeo peptídico (digestión), secuencia
10 de N-terminal, SDS-PAGE, gel de gradiente TRIS/glicina (no reductor), el método FTIR (espectro infrarrojo de transformación de Fourier), CD (dicroísmo circular), espectroscopia RAMAN, tinción de hidratos de carbono (método PAS), perfil de oligosacáridos, determinación de la composición de mono-
15 sacáridos y enfoque isoeléctrico.

La estabilidad de las formas sólidas o formulaciones de acuerdo con la invención se pueden determinar, por ejemplo, sin restricciones, con la ayuda de programas de estabilización, por ejemplo almacenamiento a 25°C y 60% de humedad re-
20 lativa ambiente y a 40°C y 70% de humedad relativa ambiente durante un período extenso y determinación de la estabilidad o la integridad estructural de la proteína a intervalos regulares, por ejemplo mediante los métodos de determinación antes mencionados (SE-HPLC, FT-IR, SDS-PAGE (reductor o no
25 reductor)).

Los métodos para la determinación de la actividad biológica o la eficacia de las formas sólidas de acuerdo con la invención en sus formas de precipitado cristalino, precipitado no cristalino, forma disuelta o suspendida abarcan, por ejemplo, sin limitaciones, ELISA, ensayos biológicos celulares, FTIR o CD.

La determinación de la reducción de la tendencia a la agregación de las formas sólidas de acuerdo con la invención en sus formas de precipitado cristalino, precipitado no cristalino, disuelta o suspendida y, en consecuencia, la posibilidad de preparar formulaciones muy concentradas, el tamaño del cristal o el tamaño del precipitado abarcan, por ejemplo, sin limitaciones, la inspección visual, el análisis de partículas sub-visibles, nefelometría o turbidimetría o caracterización dinámica de la dispersión de la luz.

Previa y posteriormente, todas las temperaturas están indicadas en °C. En los siguientes ejemplos, "elaboración convencional" significa que se agrega agua de ser necesario, y si es necesario se ajusta el pH entre 2 y 10, según la constitución del producto final.

Ejemplo 1: Agentes y condiciones de precipitación y/o cristalización que se pueden usar de acuerdo con la invención

La siguiente lista incluye en cada caso todos los hidratos, sales y derivados viables relacionados de dichos compuestos que son conocidos por el especialista en el arte.

1. Reactivos de precipitación:

1.1 Sales:

Por ejemplo, acetato de sodio trihidrato, cloruro de potasio, cloruro de sodio, citrato trisódico dihidrato, hidrógeno-fosfato dipotásico, hidrógeno-fosfato disódico dihidrato, sulfato de amonio, acetato de amonio, bromuro de amonio, cloruro de amonio, citrato de triamonio, hidrógeno-citrato de diamonio, dihidrógeno-fosfato de amonio, hidrógeno-fosfato de diamonio; tartrato de diamonio, ácido cítrico monohidrato, imidazol, acetato de potasio, bromuro de potasio, citrato tripotásico monohidrato, dihidrógeno-fosfato de potasio, sulfato de potasio, acetato de magnesio tetrahidrato, bromuro de magnesio hexahidrato, cloruro de magnesio hexahidrato, sulfato de magnesio heptahidrato, dihidrógeno-fosfato sódico monohidrato, sulfato de sodio decahidrato, prolina, ácido succínico, acetato de zinc dihidrato, sulfato de zinc heptahidrato.

1.2 Polímeros:

por ejemplo polietilenglicol (PEG):

ciclodextrinas, dextrano, carboximetilcelulosa sódica (Na-CMC), poloxámero, ácido poliacrílico, polietilenglicolmonometiléter (mPEG), polipropilenglicol (PPG), alcohol polivinílico (PVA), polivinilpirrolidona (PVP).

1.3 Solventes orgánicos:

por ejemplo, etanol, glicerol.

2. Coadyuvantes:

por ejemplo, sustancias que modifican la viscosidad, detergentes (por ejemplo Tween®, Solutol® HS 15, Pluronic®, Cremophor® EL, Avacel® 20, polioxietilensorbitano monooleato),
 5 agentes de reducción (glutación 2-mercaptoetanol, ditiotreit-
 tol), agentes de complejación (EDTA, EGTA).

3. Buffers:

por ejemplo, buffer de fosfato: fosfato de Na (o K), también
 con adición de agentes isotónicos (por ejemplo NaCl (o
 10 KCl)), pH posible aproximadamente 6,0-8,2

buffer de citrato: citrato de Na o ácido cítrico, pH posible
 aproximadamente 2,2-6,5, también con adición de agentes iso-
 tónicos (por ejemplo, NaCl); también se pueden concebir
 otras sales para la isotonización

15 buffer de succinato: pH aproximadamente 4,8 - 6,3

buffer de acetato: acetato de sodio, pH aproximadamente 2,5-
 6

buffer de histidina: pH aproximadamente 6,0 - 7,8

ácido glutámico: pH 8,0 a 10,2

20 glicina (N,N-bis(2-hidroxietil)glicina): pH aproximadamente
 8,6 a 10,6

buffer de glicinato: pH aproximadamente 6,5 - 7,5

imidazol: pH 6,2 a 7,8

cloruro de potasio: pH aproximadamente 1,0 a 2,2

25 buffer de lactato: pH aproximadamente 3,0 - 6,0

buffer de maleato: pH aproximadamente 2,5-5,0

buffer de tartrato: pH aproximadamente 3,0 - 5,0

TRIS: pH aproximadamente 6,8 - 7,7

buffer de fosfato/citrato

5 4. Intervalo del pH

El pH teóricamente concebible es pH 4 - 10, preferentemente pH 5-9.

5. Intervalo de temperatura:

El intervalo de temperatura teóricamente concebible es la temperatura de -10°C a 40°C, preferentemente de 0 a 25°C, con particular preferencia de 4°C a 20°C.

6. Estabilizantes:

6.1 Aminoácidos:

por ejemplo, arginina, ornitina, lisina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, isoleucina, leucina, alanina, fenilalanina, tirosina, triptófano, metionina, serina, prolina.

6.2 Azúcares y alcoholes de azúcar

por ejemplo, sacarosa, lactosa, glucosa, manosa, maltosa, galactosa, fructosa, sorbosa, rafinosa, trehalosa, glucosamina, N-metilglucosamina, galactosamina, ácido neurámico.

6.3 Antioxidantes:

por ejemplo, acetona, bisulfito de sodio, ácido ascórbico, ésteres de ácido ascórbico, butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), cisteína, ácido nordihidroguayarático

(NDGA), monotioglicerol, bisulfito de sodio, metabisulfito de sodio, tocoferoles, glutatión.

6.4 Conservantes:

por ejemplo, m-cresol, clorocresol, fenol, alcohol bencílico, metilparabeno, propilparabeno, butilparabeno, clorobutanol, nitrato fenilmercúrico, acetato fenilmercúrico, timer-sal, cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio.

6.5 Ciclodextrinas:

por ejemplo, hidroxipropil- β -ciclodextrina, sulfobutiletil- β -ciclodextrina, γ -ciclodextrina, α -ciclodextrina.

6.6 Albúminas:

por ejemplo, albúmina de suero humano (HSA), albúmina de suero bovino (BSA).

6.7 Alcoholes polihídricos:

por ejemplo, glicerol, etanol, manitol.

6.8 Sales

por ejemplo, sales de acetato (por ejemplo acetato de sodio), cloruro de magnesio, cloruro de calcio, trometamina, EDTA (por ejemplo EDTA sódico).

7. Agentes isotónicos:

por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio, glucosa, glicerol, dextrosa, sulfato de sodio.

Ejemplo 2: Cristalización de ErbituxTM con sulfato de amonio

500 μ l de proteína (20 mg/ml en fosfato 10 mM, pH 8,0)

400 μ l de buffer (fosfato 10 mM, pH 8,0)

100 µl de precipitante (solución saturada de sulfato de amonio en fosfato 10 mM, pH 8,0)

La adición de agentes de precipitación a la solución de proteínas se lleva a cabo en solución (procedimiento discontinuo). Después de pipetear, la muestra se debería mezclar por "agitación manual". El procedimiento se puede llevar a cabo a temperatura ambiente o a 4°C.

Ejemplo 3: Cristalización de Erbitux™ con etanol

500 µl de proteína (20 mg/ml en citrato 10 mM, pH 5,5)

10 400 µl de buffer (citrato 10 mM, pH 5,5)

100 µl de precipitante (50% (v/v) de etanol en citrato 10 mM, pH 5,5)

o

500 µl de proteína (20 mg/ml en citrato 10 mM, pH 5,5)

15 500 µl de precipitante (50% (v/v) de etanol en citrato 10 mM, pH 5,5)

La adición de los reactivos de precipitación a la solución de proteínas se lleva a cabo en solución (procedimiento discontinuo). Después de pipetear, la muestra se debería mezclar por "agitación manual". El procedimiento se puede llevar a cabo a temperatura ambiente o a 4°C.

Ejemplo 4: Precipitación de Erbitux™ con sulfato de amonio

500 µl de proteína (20 mg/ml en fosfato 10 mM, pH 8,0)

500 µl de precipitante (solución saturada de sulfato de amonio en fosfato 10 mM, pH 8,0)

25

o

200 µl de proteína (20 mg/ml en fosfato 10 mM, pH 8,0)

800 µl de precipitante (solución saturada de sulfato de amonio en fosfato 10 mM, pH 8,0)

5 o

500 µl de proteína (20 mg/ml en citrato 10 mM, pH 5,5)

500 µl de precipitante (solución saturada de sulfato de amonio en citrato 10 mM, pH 5,5)

o

10 200 µl de proteína (20 mg/ml en citrato 10 mM, pH 5,5)

800 µl de precipitante (solución saturada de sulfato de amonio en citrato 10 mM, pH 5,5)

La adición de reactivos de precipitación a la solución de proteínas se lleva a cabo en solución (procedimiento discontinuo). Después de pipetear, la muestra se debería mezclar por "agitación manual". El procedimiento se puede llevar a cabo a temperatura ambiente o a 4°C

Ejemplo 5: Precipitación de ErbituxTM con PEG

500 µl de proteína (20 mg/ml en fosfato 10 mM, pH 8,0)

20 500 µl de precipitante (50% (p/v) de PEG 4000 en fosfato 10 mM, pH 8,0)

o

500 µl de proteína (20 mg/ml en citrato 10 mM, pH 5,5)

500 µl de precipitante (50% (p/v) de PEG 4000 en citrato 10 mM, pH 5,5)

25

o

500 μ l de proteína (20 mg/ml en fosfato 10 mM, pH 8,0)

500 μ l de precipitante (50% (p/v) de PEG 8000 en fosfato 10 mM, pH 8,0)

5 o

500 μ l de proteína (20 mg/ml en citrato 10 mM, pH 5,5)

500 μ l de precipitante (50% (p/v) de PEG 8000 en citrato 10 mM, pH 5,5)

La adición de los reactivos de precipitación a la solución de proteínas se lleva a cabo en solución (procedimiento discontinuo). Después de pipetear, la muestra se debería mezclar por "agitación manual". El procedimiento se puede llevar a cabo a temperatura ambiente o a 4°C.

Ejemplo 6: Investigación microscópica de la forma cristalina

Los cristales obtenidos en los Ejemplos 1 y 2 fueron investigados por microscopia. Se detectaron tanto las propiedades birrefringentes que son típicas de los cristales como la capacidad de coloración con azul brillante de Coomassie que es típica de las proteínas.

Se hallaron cristales con un tamaño de aproximadamente 50-200 μ m.

Ejemplo 7: Investigación de los precipitados para determinar si son nativos

Los precipitados obtenidos en los Ejemplos 4 y 5 se redispersaron e investigaron por medio de espectrometría FT-

IR. Los espectros de derivación I-2 de la amida del material de partida antes de la precipitación y del precipitado redisperso eran congruentes.

Ejemplo 8: Rendimiento del método de cristalización descrito

5 en el documento WO 02/072636

A fin de controlar los resultados de la solicitud de patente WO 02/072636, en primer lugar se intentó, en un experimento de control tal como se describe en el documento WO 02/072636, obtener cristales que pudieran usarse posteriormente como cristales de semilla por medio de la pantalla Wizard I. A pesar de que se obtuvieron cristales con forma de aguja en condiciones de precipitación con cloruro de calcio o acetato de calcio, igualmente se formaron, no obstante, en solución de buffer de citrato sin proteínas. Así, los cristales con forma de aguja descritos se obtienen tanto de la solución de proteínas como del control negativo (sin proteína), empleando el procedimiento descrito en el documento WO 02/072636. En el mejor de los casos es obvio que presumiblemente sean inclusiones de proteínas en cristales del reactivo de precipitación.

10

15

20

REIVINDICACIONES

1. Procedimiento para la preparación de un cristal de anticuerpo anti-EGFR, caracterizado porque comprende las etapas de:

Disolver o suspender la proteína del anticuerpo anti-EGFR Mab C225 (cetuximab) ó Mab h425 (EMD 72000) en un medio acuoso;

Añadir un reactivo de precipitación en presencia de un búfer apropiado, a un pH entre 4 y 10, y a una temperatura entre -10°C y 40°C; y

Separar el producto de precipitación del mismo.

2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque el reactivo de precipitación es seleccionado a partir del grupo que consiste de sulfato de amonio, acetato de sodio, citrato de sodio, fosfato de potasio, PEG, etanol y mezclas del mismo.

3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el reactivo de precipitación es seleccionado a partir de sulfato de amonio, PEG y/o etanol.

4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de precipitación se lleva a cabo preferentemente a un pH entre 5 y 9.

5. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la etapa de precipitación se lleva a cabo preferentemente a una temperatura entre -10°C y 40°C, y con particular preferencia entre 4°C a 20°C.

6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque puede comprender una etapa de purificación adicional.



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO FORMAS SÓLIDAS DE ANTICUERPOS ANTI-EGFR

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL _____

71. SOLICITANTE MERCK PATENT GMBH

DOMICILIO DARMSTADT, ALEMANIA

74. APODERADO LUZ CLEMENCIA DE PAEZ
C.C. 35.456.344 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C., _____