



Industria y Comercio

S U P E R I N T E N D E N C I A

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-50507

54. TÍTULO

FORMAS SOLIDAS DE ANTICUERPOS ANTI-EGFR

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

A61K 9/14, 39/395, C07K16/28, A61P

71. SOLICITANTE

8078

MERCK PATENT GMBH

DOMICILIO

DARNSTADT, REPUBLICA FEDERAL DE ALEMANIA

74. APODERADO

EMILIO FERRERO

C.C. 438.019 de Usaquén

22. BOGOTÁ, D. C.,

Ch



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PETITORIO

EL SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Rad: 06-050507-00000-0000

Fes: 2005-05-25 16:47:46 Dep. 2000 NUECREACIONES

Tra: 11 PATENTE
Evs: 375 FASE NACIONAL

Act 411 PRESENTACION

Folios: 157

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL 29-06-06

SOLICITUD DE:

1

☒ Patente de Invención.

☐ Patente de Modelo de Utilidad.

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

2

S LICITANTE
(71)

Nombre: **MERCK PATENT GMBH**
sociedad constituida y existente bajo las
leyes de República Federal de Alemania.

Dirección: Frankfurter Strasse 250,
Darmstadt 64293
República Federal de Alemania

Domicilio: Darmstadt 64293
República Federal de Alemania

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE
O APODERADO

Nombre: **EMILIO FERRERO**
Dirección: Carrera 4ª. No. 72-35
Teléfono: 347 38 11
Fax: 211 88 50
E-mail: clientes@camyo.com.
Domicilio: Bogotá, Colombia.

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒

NIT ☐

C.E. ☐

Otro ☐

Cual

Número 438.019 T.P 31.929

4

INVENTOR (ES)
(72)

1. **Susanne MATHEUS**
Realschulstrasse 19
Neumagen-Dhron 54347
República Federal de Alemania

2. **Hanne-Christien MAHLER**
Buschungstrasse 54a
Wiesbaden 65205
República Federal de Alemania

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/EP2004/012837

Fecha: 12 de noviembre de 2004

Publicación Internacional No. WO 2005/051355 A1

Fecha: 9 de junio de 2005

6

Título (54)

FORMAS SOLIDAS DE ANTICUERPOS ANTI-EGFR

7

Clasificación Internacional (51) A61K 9/14, C07K 16/28, A61P 35/00,
A61K 39/395.

8

Prioridad

(33) País de Origen

(32) Fecha

(31) Número de Solicitud

SI ☒ NO ☐

DE

29 de noviembre de 2003

103 55 904.3

9

Comprobante de pago No.: 06-36.150

Fecha: 15 de mayo de 2006

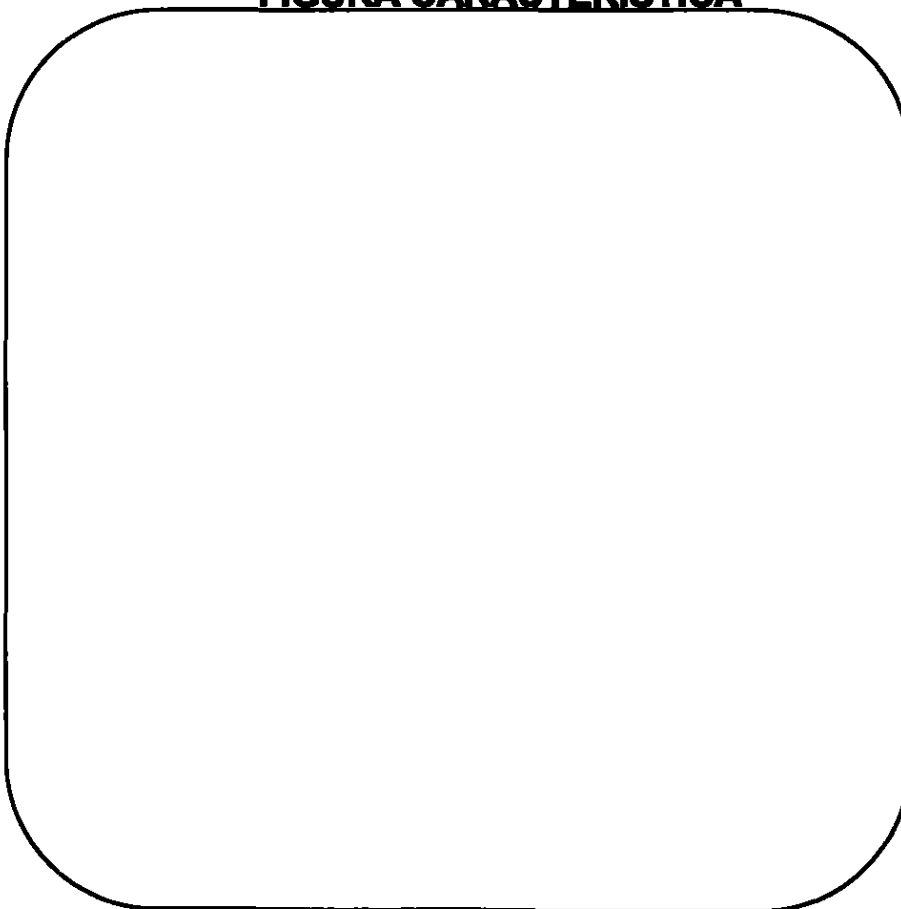
10

Anex s:

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud por \$ 463.000.00.
- ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Poderes, si fuere el caso.
- ☒ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ Traducción del examen preliminar efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.
- ☐ Arte final 12x12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☒ Otros **VER HOJA DE DOCUMENTOS ANEXOS**

11

FIGURA CARACTERÍSTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE:

EMILIO FERRERO

FIRMA:

Emilio Ferrero

C.C. 438.019 de Usaquén T.P. 31.929

DOCUMENTOS ANEXOS

1. ☒ Publicación Internacional WO 2005/051355 A1
2. ☒ Forma **PCT/ISA/210**. Informe de Búsqueda Internacional.
3. ☒ Extracto de publicación.

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

9266
0105

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 4° 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 (nuestras) 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.

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 4° 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, or all of them, shall declare their intention not to exercise the representation 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.

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, enseñas, 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 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 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

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 _____

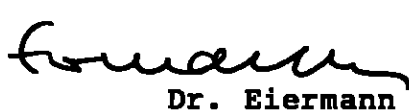
Firma

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 compañía 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 compañía 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.

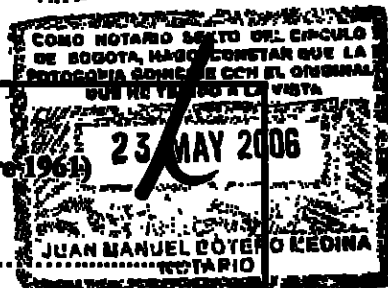
The Notary Public is aware and attests to the above facts upon examination of the corresponding documents.

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

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 E l e r m a n n

2) Mr. Dr. Ulrich L a n g

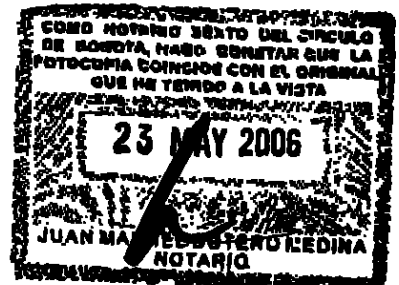
business address: D-64293 Darmstadt, Frankfurter Straße 250,
both identified by German identity card.

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



Pfeiffer
notary Public



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



8

TRADUCCIÓN OFICIAL N . 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**.

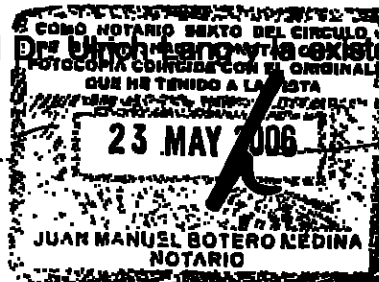
Merck Patent GmbH

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, en presencia 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.

9

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.

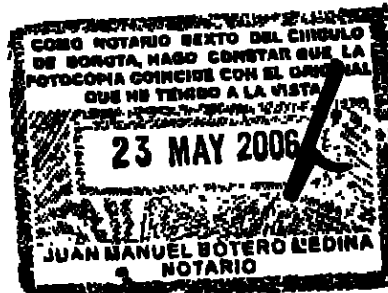
Es traducción fiel y completa de la cual se deja copia en esta oficina para su confrontación.

COLO 09266-841-011-8

WPCL 9266 - ID 405

DIC 07/05

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



COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE SANTAFE DE
 BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRMA(S) DE
María Elvira Martelo
 COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
 EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
 SANTAFE DE BOGOTA, 12 DIC 2005

PABLO MENDEZ
 BARALLO

NO SE ASUME
 RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 DIC 12 P.M. 4:45

EYE DE IDENTIFICACION
 NOTARIAL

MINISTERIO DE
 RELACIONES EXTERIORES

396378

María Elvira Martelo
 COTIA FIRMA APARECE EN EL
 DOCUMENTO DESEMPESA
 LAS FUNCIONES INDIICADAS

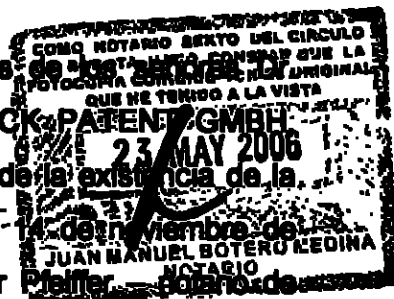
COMO NOTARIO SEXTO II,
 DE BOGOTA, HAGO CONSTAR
 FOTOGRAFIA COINCIDE CON EL ORIGINAL
 QUE NO TENGO A LA VISTA
23 MAY 2006
 JUAN MANUEL BOTERO MEDINA
 NOTARIO

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 05.105.386 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
TRADUCCION E INTERPRETE OFICIAL
[Firma]
Resolución No 599 Minjusticia

14

APOSTILLE
(Convention de La Haya du 5 octobre 1981)

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

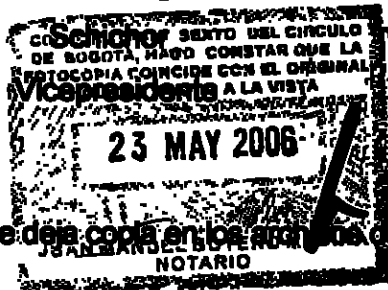
9. Sello

(sello redondo No.3, en tinta -

El Presidente del Tribunal Regional
de Darmstadt)

10. Firma

Fdo.: ilegible



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

Bogotá, 9 de diciembre de 2005

C. 2013

LIZ ARRIAGA DE HERBER
TRADUCTORA E INTERPRETE OFICIAL
Resolución No. 599 de 2004

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

Jose Priaga de Herber

COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA

SANTAFE DE BOGOTA, 13 DIC 2005

NOTARIA SEXTA

PABLO MENDEZ BARRAZA

Notario Sexto Encargado

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2005 DIC 13 P 2:00

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES

32063

Amigosa
CUYA FIRMA APARECE EN EL DOCUMENTO DESEMPENA LAS FUNCIONES INDICADAS

COMO NOTARIO SEXTO DEL CIRCULO DE BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA FOTOCOPIA COINCIDE CON EL ORIGINAL QUE ME FUE PRESENTADO A LA VISTA

23 MAY 2006

JUAN MANUEL ROMEDINA

DECLARATION OF INVENTORSHIP

WITH ASSIGNMENT

We, the undersigned
Susanne Matheus; Dr. Hanns-Christian Mahler

citizens of
Germany

residing at
Frankfurter Str. 250
64293 Darmstadt

by these presents declare under oath to be the
sole and true inventors of the invention titled:

and to transfer in full property without reservation
or limitation whatsoever all our rights on same to

Merck Patent GmbH
Darmstadt

residing at
Darmstadt

who may apply for and obtain its own name the
registration of the corresponding patent in the
Republic of Columbia, holding all the corres-
ponding rights.

Granted and signed at

on

INVENTORS:

Susanne Matheus
Hanns-Christian Mahler

DECLARACION DE INVENTORES

CON TRANSFERENCIA

Nosotros,
Susanne Matheus; Dr. Hanns-Christian Mahler

de nacionalidad
Alemania

domiciliados en
Frankfurter Str. 250
64293 Darmstadt

por el presente documento declaramos bajo jura-
mento ser los únicos y verdaderos inventores de la
invención titulada:

FORMAS SOLIDAS DE ANTICUERPOS
ANTI-EGFR

y que cedemos en plena propiedad y sin reserva ni
limitación alguna todos nuestros derechos sobre la
misma a

Merck Patent GmbH
Darmstadt
domiciliada en

Darmstadt

quien podrá solicitar y obtener a su nombre el re-
gistro de la patente correspondiente en la Repúbli-
ca de Columbia ejerciendo todos los derechos que
a ello corresponde.

Dado y firmado en

a los días del mes de de 20

INVENTORES:

No. 588 of the document scroll for 2004 (E)

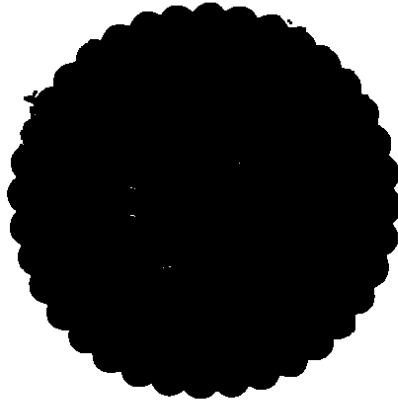
I hereby certify that the foregoing document was signed in my presence by

1. Mr. Hanns-Christian Mahler,
2. Mrs. Susanne Matheus,

business address of both: 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 had acted in the matter which is the subject of this instrument, except in a notarial matter. Both of the appeared denied.

Darmstadt, this 16th day of August 2004




(Dr. Ebner, notary public)

Kostenberechnung

Geschäftswert € 1.350,00

Gebühr gem. §§ 32, 45 KostO
(Unterschriftbeglaubigung)

€ 10,00

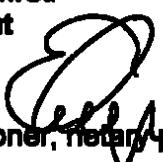
Auslagen gem. §§ 137, 152 KostO
18 % MwSt.

€ 2,58

€ 2,01

Gesamt

€ 14,57


(Dr. Ebner, notary public)

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Land: Bundesrepublik Deutschland
Diese öffentliche Urkunde
2. ist unterschrieben von Dr. Wolfgang Ebner
3. in seiner Eigenschaft als Notar
4. sie ist versehen mit dem Siegel/Stempel des Notars
Dr. Wolfgang Ebner in Darmstadt

Bestätigt

5. in Darmstadt
6. am 18. Aug. 2004
7. durch den Präsidenten des Landgerichts
8. unter 910 E 2/1 - 2306/04
9. Siegel/Stempel
10. Unterschrift

im Auftrag



Wellenreuther
Vorsitzender Richter

TRADUCCION OFICIAL No. 11315

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 los sellos y autenticaciones en alemán que aparecen a continuación de un documento de Cesión, escrito en español e inglés, por medio del cual los señores Hanns-Christian Mahler y Susanne Matheusr, inventores, domiciliados en Darmstadt, Alemania, ceden a MERCK PATENT GmbH, domiciliada en Darmstadt, Alemania los sobre la invención FORMAS SOLIDAS DE ANTICUERPOS ANTI-EGFR.

Sigue legalización en inglés de las firmas de los mencionados señores por el notario de Darmstadt, Dr. Ebner, el 16 de agosto de 2004 bajo el No. 586 de 2004 (E). Fdo.: firma ilegible.- Hilo y oblea notarial.

Costas	
<u>Valor del negocio: € 1.470.00</u>	
Derechos Art. 32, 45 KostO (legalización de firma)	€ 10,00
Gastos seg. Art. 137, 152 KostO	€ 2,56
16% IVA	€ 2,01
Total	€ 14,57
Fdo.: firma ilegible	

APOSTILLE
(Convention de La Haya du 5 octobre 1961)

1. País: República Federal de Alemania
Este documento público
2. Ha sido firmado por el Dr. Wolfgang Ebner
3. Actuando en calidad de notario
4. Lleva el sello oficial del notario de Darmstadt, Dr. Wolfgang Ebner

Luz ARRIAGA DE HERBER
TRANSLADORA E INTERPRETE OFICIAL

Resolución No.599 Minjusticia

Certificado

5. en Darmstadt

7. por el Presidente del Tribunal Regional

8. bajo el No 910 E 2/1 2306/04

9. Sello

(sello redondo No.3, en tinta –)

El Presidente del Tribunal Regional de Darmstadt)
6. el 18 de agosto de 2004

10. Firma

Fdo.: ilegible

Wellenreuther

Juez Presidente

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

Bogotá, 21 de abril de 2006.
C. 1354

LUZ ARRIAGA-HERNANDEZ
TRADUCCION E INTERPRETE OFICIAL
Resolución No.586 del 2004

23/04/2006
11:30 AM
CALLE 100 No. 100-100
BOGOTÁ D.C.

71-1-2306-04
01X37430-010101010230

23/04/2006
11:30 AM
CALLE 100 No. 100-100
BOGOTÁ D.C.

2306042306040101010230

88388

2306042306040101010230

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2006 APR 25 P 2:15
CUID
JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES
88365-
Luz Arangua
CUYA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INICIALES

COMO NOTARIO SEPTO DEL CIRCULO DE
BOGOTA, HAGO CONSTAR QUE LA(S) FIRM(A)
Luz Arangua
de J. Arango
COINCIDE(N) CON LA FIRMA REGISTRADA POR
EL (ELLOS) EN ESTA NOTARIA
SANTAFE DE BOGOTA, 25-ABR-2006

NOTARIA SEPTA
PABLO MENDEZ
BARAJAS

16

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 04.24/06c realizada por Diego Vargas, Traductor Oficial, Resolución No. 0001 de 1999 del Ministerio de Justicia, registrado ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia.

A continuación se traducen los sellos y legalizaciones de un documento de cesión por medio del cual Susanne Matheus; Dr. Hanns-Christian Mahler, de nacionalidad alemana y domiciliados en Frankfurter Str. 250, 64293. Darmstadt, Alemania, declaran bajo juramento ser únicos y verdaderos inventores de la invención "formas sólidas de anticuerpos anti-EGFR" y declaran así mismo que ceden y transfieren sin limitación a favor de la sociedad MERCK PATENT GMBH Darmstadt, domiciliada en Darmstadt, Alemania, todos los derechos inherentes a dicha invención y que dicha Compañía queda facultada para solicitar a su nombre la patente correspondiente en la República de Colombia.

Firma Ilegible
Susanne Matheus

Firma Ilegible
Hans-Christian Mahler

No. 586 del registro de documentos para 2004 (E)

Por el presente certifico que el anterior documento fue firmado en
mi presencia por

1. Sr. Hanns-Christian Mahler,
2. Sra. Susanne Matheus,

domiciliados ambos en : D-64293 Darmstadt, Frankfurter Straße 250,
ambos identificados por sus tarjetas de identificación alemanas.

17

Sello de oblea

(Dr. Ebner, Notario Público)

Firma Ilegible

(Dr. Ebner, Notario Público)

Es traducción fiel y completa de la cual se ~~debe~~ copiar esta
oficina para su confrontación.

DVZ/ID-7698/WPCL002G/COLO 09266-841-014-2

DIEGO F. VARGAS Z.
TRADUCTOR E INTERPRETE OFICIAL
ESPAÑOL - INGLÉS - INGLÉS - ESPAÑOL
RES. 0001 DE ENERO 4 DE 1999
MINISTERIO DE JUSTICIA

VARGAS Z.
INTERPRETE OFICIAL
ES - INGLES - ESPAÑOL
4 DE 1999
888

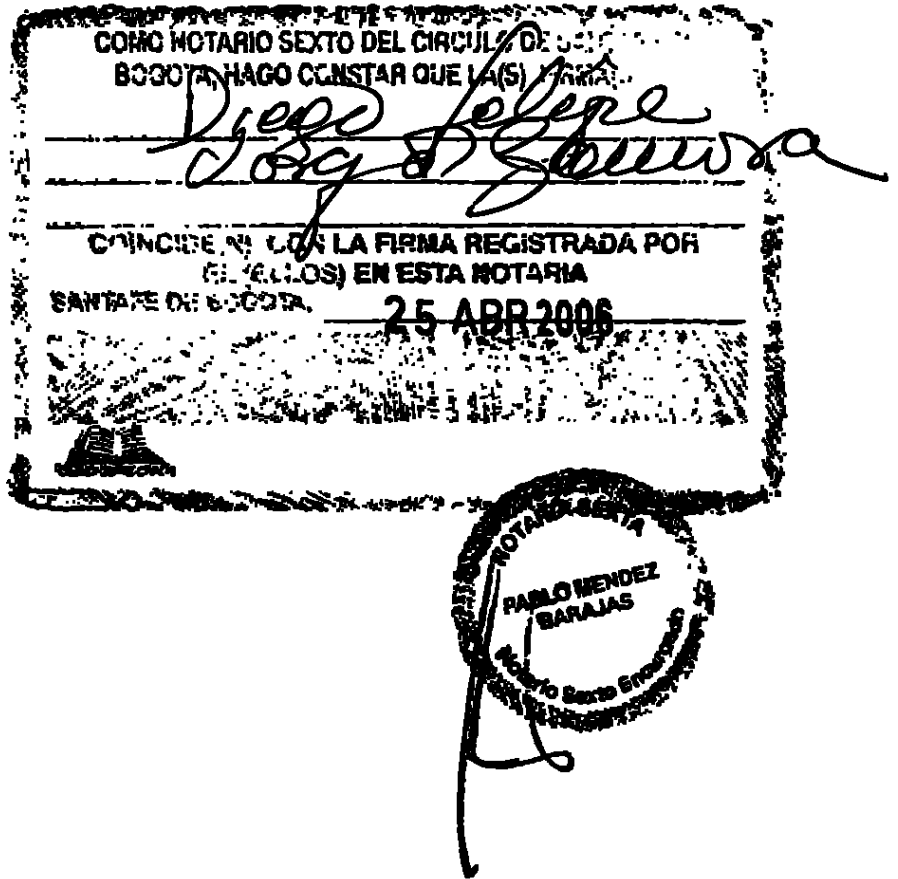
NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2006 APR 25 P 2:15

JEFE DE LEGALIZACIONES
SANTAFE DE BOGOTA D.C.

MINISTERIO DE RELACIONES
EXTERIORES

883666
Diego Vargas
Cuya firma aparece en el
DOCUMENTO DESEMPLEA
LAS FUNCIONES INDICADAS



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. Juni 2005 (09.06.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2005/051355 A1

(51) Internationale Patentklassifikation: A61K 9/14, C07K 16/28, A61P 35/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2004/012837

(22) Internationales Anmeldedatum:
12. November 2004 (12.11.2004)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
103 55 904.3 29. November 2003 (29.11.2003) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): MERCK PATENT GMBH [DE/DE]; Frankfurter
Straße 250, 64293 Darmstadt (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): MATHEUS, Su-
sanne [DE/DE]; Realschulstraße 19, 54347 Neuma-
gen-Dixon (DE). MAHLER, Hanna-Christian [DE/DE];
Buschungsstraße 54a, 65205 Wiesbaden (DE).

(74) Gemeinsamer Vertreter: MERCK PATENT GMBH;
Frankfurter Straße 250, 64293 Darmstadt (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AB, AG, AL,
AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG,
PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM,
TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM,
ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SI, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LU, MC, NL, PL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM,
GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NR, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— mit internationalem Recherchemerkmal

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: SOLID FORMS OF ANTI-BGFR-ANTIBODIES

(54) Bezeichnung: FESTE FORMEN VON ANTI-BGFR-ANTIKÖRPERN

(57) Abstract: The invention relates to solid forms of antibodies against the BGF receptor, especially precipitates and crystals of monoclonal antibodies against the BGF receptor, especially preferably Mab C225 (Cetuximab) and Mab h425 (BMD 72000), that create biologically active antibody proteins by dissolution or suspension in an aqueous medium. Said proteins can be obtained by precipitation of the antibody dissolved or suspended in the aqueous medium and/or one of the variants or fragments thereof by means of a precipitation reagent. The invention also relates to pharmaceutical preparations containing at least one solid form of the cited antibody in a precipitated non-crystalline form, a precipitated crystalline form or a soluble or suspended form, and optionally carrier and/or auxiliary substances and/or other pharmaceutical active ingredients, and to a method for producing inventive solid forms of anti-BGFR-antibodies.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft feste Formen von Antikörpern gegen den BGF-Rezeptor, insbesondere Präzipitate und Kristalle von monoklonalen Antikörpern gegen den BGF-Rezeptor, besonders bevorzugt von Mab C225 (Cetuximab) und Mab h425 (BMD 72000), welche durch Auflösen oder Suspendieren in wässrigem Medium zu biologisch aktivem Antikörperprotein führen, erhältlich durch Ausfällung des in wässrigem Medium gelösten oder suspendierten Antikörpers und/oder einer seiner Varianten und/oder Fragmente mittels eines Präzipitationsreagenzes. Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zubereitungen enthaltend wenigstens eine feste Form obengenannter Antikörper in präzipitierter nicht-kristalliner, präzipitierter kristalliner oder in löslicher oder suspendierter Form, sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe und/oder weitere pharmazeutische Wirkstoffe, sowie ein Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer fester Formen von anti-BGFR-Antikörpern.

18

WO 2005/051355 A1

Feste Formen von anti-EGFR-Antikörpern

Hintergrund der Erfindung

Die Erfindung betrifft feste Formen von Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor (EGFR), insbesondere Präzipitate und Kristalle von monoklonalen Antikörpern gegen den EGF-Rezeptor, besonders bevorzugt von Mab C225 (Cetuximab) und Mab h425 (EMD 72000), welche durch Auflösen oder Suspendieren in wässrigem oder nicht-wässrigem Medium zu biologisch aktivem Antikörperprotein führen, erhältlich durch Ausfällung, des in wässrigem Medium gelösten oder suspendierten Antikörpers und/oder einer seiner Varianten und/oder Fragmente mittels eines Präzipitationsreagenz. Die Erfindung betrifft weiterhin pharmazeutische Zubereitungen enthaltend wenigstens eine feste Form obengenannter Antikörper in präzipitierter nicht-kristalliner, präzipitierter kristalliner oder in gelöster oder suspendierter Form, sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe und/oder weitere pharmazeutische Wirkstoffe, sowie ein Verfahren zur Herstellung erfindungsgemäßer fester Formen von anti-EGFR-Antikörpern.

Fortschritte im Bereich der Biotechnologie machten es im Laufe der letzten 10 Jahre möglich eine Reihe von Proteinen zur pharmazeutischen Anwendung mittels rekombinanter DNA-Techniken herzustellen. Proteinarzneimittel wie monoklonale Antikörper finden ihre Anwendung beispielsweise in der Tumorthherapie, z.B. zur spezifischen Immuntherapie oder Tumorstabilisierung. Therapeutische Proteine sind größer und komplexer als herkömmliche organische und anorganische Wirkstoffe und sie weisen komplexe dreidimensionale Strukturen und zahlreiche funktionelle Gruppen auf, die die biologische Aktivität des Proteins bedingen oder auch unerwünschte Wirkungen hervorrufen können. Proteinarzneimittel sind während Herstellung, Lagerung und Transport zahlreichen exogenen Einflüssen ausgesetzt, die sich stabilitätsmindernd

auf den Proteinwirkstoff auswirken können. Es ist daher erforderlich, die Ursachen und Mechanismen der speziellen Abbaureaktionen genau zu studieren, um z.B. durch Zusatz bestimmter stabilisierender Hilfsstoffe das Protein stabilisieren zu können (siehe z.B. Manning M.C., Patel K., & Borchardt R.T. (1989) Stability of protein pharmaceuticals. Pharm. Res. 6, 903-918).

Aus der Literatur sind zahlreiche Formulierungen therapeutischer Proteine bekannt. Die Anforderungen an die Zusammensetzung einer pharmazeutischen Zubereitung von Proteinwirkstoffen können jedoch sehr unterschiedlich sein und im Allgemeinen ist es aufgrund spezifischer physikochemischer Eigenschaften und Abbaureaktionen der unterschiedlichen Proteine nicht möglich, bereits etablierte Proteinformulierungen auf neue Protein-Wirkstoffe zu übertragen. Deshalb sind geeignete pharmazeutische Formulierungen und stabile Formen dieser neuartigen Wirkstoffe noch immer eine große Herausforderung.

Chemische Instabilitäten zeichnen sich durch kovalente Modifikationen des Proteins aus. Die Primärstruktur des Proteins ändert sich durch Bruch, Neuaufbau oder Umbildung chemischer Bindungen. Die neu entstandene Substanz unterscheidet sich in der Regel in der biologischen Aktivität komplett von dem ursprünglichen, nativen Protein. Physikalische Instabilitäten verändern die räumliche Anordnung des Moleküls (die Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur), ohne kovalente Bindungen zu zerstören. Man kann sie in Denaturierung, Assoziation, Aggregation, Präzipitation oder Adsorption unterteilen. Physikalische Instabilitäten sind insbesondere bei größeren Proteinen ein häufiges Phänomen. Präzipitate sind das makroskopisch sichtbare Äquivalent von Aggregaten und entstehen mechanistisch durch Cluster von Aggregaten oder Assoziaten. Durch Überschreitung der Löslichkeitsgrenze und Ausfällung (Präzipitation) werden die Flocken ab einem Durchmesser von ca. 10 µm durch ein Lichtmikroskop und ab ca. 50 µm visuell sichtbar. Die

Proteinaggregation kann ein reversibler oder irreversibler Prozess sein (siehe z.B. 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 Carrier Syst. 10, 307-377).

In bisheriger Literatur wird zwar die Präzipitation von Proteinen mit Salzen, Polymeren und organischen Lösungsmitteln als Standardmethode zur Aufreinigung von Proteinen beschrieben (Scopes R.K. (1997) Separation by Precipitation. In: Protein Purification: Principles and Practice (ed Scopes R.K.), 2 edn, pp. 41-71. Springer Verlag, New York), allerdings führt die Anwendung dieser Methode besonders bei Immunglobulinen zumeist zu einer Denaturierung, zu einer damit verbundenen Aktivitätsminderung und zu schlechten quantitativen Ausbeuten, insbesondere bei Verwendung von Salzen und organischen Lösungsmitteln (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). Bei Verwendung von Polyethylenglycol (PEG) werden dagegen bessere Ergebnisse erzielt (A. Polson, G. M. Potgieter, J. F. Largier, and G. E. F. Joubert F. J. Mears. The Fractionation of Protein Mixtures by linear Polymers of High Molecular Weight. Biochim. Biophys. Acta 82:463-475, 1984).

Proteinkristalle sind aus den Aufreinigungsverfahren (Down Stream Processing) vorzugsweise von Enzymen und zur Aufklärung der Tertiärstruktur von Proteinen mittels Röntgenstrukturanalyse bekannt (R. K. Scopes. Analysis for purity: Crystallization. In: Protein Purification: Principles and Practice, edited by R. K. Scopes, New York:Springer Verlag, 1997, p. 284-301). Hierbei kommt es zur Bildung neuer geordneter, intermolekularer Kontakte zwischen Proteinen. Es handelt sich um einen langsamen Prozess, mit reduzierter Mobilität. Die Konzentration des in Lösung befindlichen Proteins wird dabei vermindert.

In der Literatur wird zwar die Kristallisation von Proteinen mit Salzen, Polymeren und organischen Lösungsmitteln als Standardmethode zur Strukturaufklärung von Immunglobulinen beschrieben (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 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), allerdings gestaltet sich die Kristallisation von intakten, beispielsweise glykosylierten Antikörpern äußerst schwierig, da die Größe des Proteins, das unterschiedliche Glykosylierungsmuster der einzelnen Antikörpermoleküle und die damit verbundenen Mikroheterogenitäten sowie die strukturelle Flexibilität des Immunglobulins den geordneten Einbau in ein Kristallgitter erschweren oder gar verhindern (McPherson A. (1999) *Crystallization of Biological Macromolecules*, 1 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Außerdem zeigen Antikörpermoleküle eine Tendenz zur Aggregation, was ebenfalls große Schwierigkeiten bei der Kristallisation bereitet (McPherson A. (1999) *Crystallization of Biological Macromolecules*, 1 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Darüber hinaus macht die Gefahr der Denaturierung der Antikörper im Rahmen des Kristallisationsvorgangs die Kristallisation von therapeutischen Antikörpern für den Fachmann unattraktiv. So wurden bisher erst wenige intakte Antikörper zur Strukturaufklärung kristallisiert bzw. erst drei Antikörper in präperativem Maßstab kristallisiert. So handelt es sich bei den in der Biological Macromolecule Crystallization Database (Gilliland, G.L., Tung, M., Blakeslee, D.M. and Ladner, J. 1994. *The Biological Macromolecule Crystallization Database, Version 3.0: New Features, Data, and the NASA Archive for Protein Crystal Growth Data*. *Acta Crystallogr.* D50 408-413.)

aufgelisteten, bereits kristallisierten Immunglobulinen hauptsächlich um Fab und Fc Fragmente.

5 In der WO02072636 werden Antikörper-Kristalle beschrieben, die jedoch in einem aufwendigen Verfahren mit Animpfen und unter Verwendung von In pharmazeutischen Formulierungen möglichst zu vermeidenden Detergenzien und z.T. toxikologisch bedenkliche Hilfsstoffe hergestellt werden. Außerdem ist in dem beschriebenen Verfahren die Partikelgröße nicht kontrollierbar. In einem Kontrollversuch (siehe Beispiel 8) konnte 10 gezeigt werden, dass mit dem in der WO02072636 beschriebenen Verfahren sowohl aus der Proteinlösung als auch aus der Negativkontrolle (ohne Protein) die beschriebenen nadelförmigen Kristalle erhalten werden. Daraus wird deutlich, dass es sich hier vermutlich allenfalls um Proteineinschlüsse in Kristalle des Präzipitationsreagenzes handelt.

15 Aus obengenannten Gründen wird klar, dass sich die Kristallisation von Antikörpern für den Fachmann als äußerst schwierig darstellt und sich aus der Literatur bekannte Kristallisationsverfahren aufgrund der großen Heterogenität der verschiedenen bekannten Antikörper bezüglich Primär-, 20 Sekundär- und Tertiärstruktur, Glykosylierung und struktureller Flexibilität nicht auf alle bekannten Antikörper übertragen lassen. Ebenso war es aus obengenannten Gründen für den Fachmann unattraktiv, Präzipitate von therapeutischen Antikörpern herzustellen, da insbesondere mit einer irreversiblen Denaturierung zu rechnen war.

25 Aufgabe der vorliegenden Erfindung war es daher, stabile Formen, beispielsweise Präzipitate oder Kristalle für therapeutische Proteine, insbesondere Antikörper, zu finden, so dass bei Herstellung, Lagerung, Transport und Applikation deren Wirksamkeit erhalten bleibt. Da sich wie 30 oben erwähnt bereits etablierte Proteinformulierungen im Allgemeinen nicht auf neue Protein-Wirkstoffe übertragen lassen, war es eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, neue stabile Formulierungen für

monoklonale Antikörper gegen den EGF-Rezeptor, beispielsweise Mab C225 (Cetuximab) und Mab h425 (EMD 72000), zu finden. Formulierungen enthaltend Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD 72000) sind zwar aus der WO03053465 und aus der WO03007988 bekannt. Jedoch weisen
5 die aus der WO03053465 bekannten Formulierungen eine relativ geringe Proteinkonzentration auf und sie sind langfristig bei Raumtemperatur nicht stabil und die aus der WO03007988 bekannten Formulierungen weisen ebenfalls eine relativ geringe Proteinkonzentration auf und die Zubereitung (Lyophilisat) muss vor Anwendung noch rekonstituiert werden. Folglich war
10 es eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung, eine stabile pharmazeutische Zubereitung zu finden, die eine hohe Konzentration obengenannter Antikörper aufweist.

Der Prozess der Lyophilisierung zur Stabilisierung von Proteinformulierungen ist beispielsweise aus der WO9300807 oder WO9822138 bekannt, jedoch bestehen signifikante Nachteile von lyophilisierten Zubereitungen darin, dass der Anwender das Lyophilisat vor Anwendung noch rekonstituieren muss, was eine erhebliche Fehlerquelle bei der Zubereitung vor der Anwendung darstellt. Da ein weiterer Herstellungs-
15 prozess im Vergleich zu flüssigen Formulierungen hinzukommt, ist der Prozess hinsichtlich zusätzlichem Aufwand für Prozessentwicklung (Gewährleistung der Stabilität bei der Lyophilisierung), Herstellung (Herstellungskosten und -dauer) und z.B. Validierung ungünstig.
20

Somit war es Aufgabe der vorliegenden Erfindung, feste Formen und Formulierungen für obengenannte Antikörper zu finden, die eine erhöhte Stabilität gegenüber Stressbedingungen, wie erhöhter Temperatur, Luftfeuchtigkeit und/oder Scherkräften aufweisen und keine toxikologisch bedenklichen Hilfstoffe enthalten.
25

30

Zusammenfassung der Erfindung

Überraschenderweise wurde gefunden, dass sich feste Formen oben-
genannter Antikörper herstellen lassen und diese festen Formen und
daraus hergestellte Formulierungen nicht die im Stand der Technik
genannten Nachteile aufweisen. Die nachfolgend beschriebenen
5 erfindungsgemäßen festen Formen von anti-EGFR-Antikörpern und/oder
die daraus hergestellten Formulierungen zeichnen sich überraschender-
weise durch einen oder mehrere Vorteile aus, ausgewählt unter: hohe
Stabilität, kontrollierbare Partikelgröße, Protein nach Wiederauflösung
oder Resuspension nativ und biologisch aktiv, hohe Reinheit, Abwesenheit
10 pharmazeutisch bedenklicher Agenzien und damit hohe Sicherheit, gute
Verträglichkeit und Möglichkeit der direkten Verwendung, geringe
Aggregationstendenz und damit die Möglichkeit hochkonzentrierte
Formulierungen herzustellen und bei Formulierung als Proteinsuspension
eine im Vergleich zu einer Lösung geringe Viskosität.

Das nachfolgend beschriebene erfindungsgemäße Herstellungsverfahren
zeichnet sich überraschenderweise durch einen oder mehrere Vorteile
aus, ausgewählt unter: Einfachheit, Zeit- und Kostenersparnis,
Verwendung pharmazeutisch unbedenklicher Agenzien, hohe Ausbeute.
Das erfindungsgemäße Verfahren ist somit in der Durchführung
20 vorzugsweise wesentlich einfacher, zeitsparender und kosteneffektiver als
die in der Literatur beschriebenen Techniken, da nur die Zugabe eines
einzelnen Präzipitationsreagenzes notwendig ist.

Zudem erfolgt die Zugabe des Präzipitationsreagenzes zu einer Lösung
25 des Antikörpers in einem geeigneten Puffersystem, d.h. es ist keine
Stabilisierung der Reaktionslösungen durch weitere Hilfstoffe, wie z.B.
Detergenzien notwendig. Die Verwendung von Detergenzien in
Zubereitungen zur parenteralen Anwendung ist generell zu vermeiden
bzw. zu minimieren, da von ihnen ein nicht unerhebliches toxisches und
30 immunogenes Potential ausgeht (Sweetana S. & Akers M.J. (1998)
Solubility principles and practices for parenteral drug dosage form
development. PDA J. Pharm. Sci. Technol. 50, 330-342) und sie auch zur

Veränderung der Sekundärstruktur von Proteinen führen können (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 Ig G. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects 161, 139-150). So können die erhaltenen festen Formen von anti-EGFR-Antikörpern direkt in Arzneimitteln verwendet werden, eine weitere Reinigung zum Entfernen pharmakologisch bedenklicher Agenzien ist nicht notwendig. Die in der WO02072636 erhaltenen Kristalle müssen dagegen in einem aufwendigen Verfahren von pharmakologisch bedenklichen Agenzien, beispielsweise CHES, Imidazol, Tris, Mangan(II)-chlorid, Zink(II)-Chlorid, Kupfer(II)-sulfat, 2-Propanol, 2-Methoxy-2,4-pentandiol, von HEPES, Lithiumsulfat, Ethoxyethanol oder Detergenzien wie Polysorbat 80 oder 20 gereinigt werden bzw. es ist gar nicht möglich vorstehend genannte, bedenkliche Agenzien vollständig zu entfernen.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass vorzugsweise stabile feste Formen erhalten werden, wenn Antikörper gegen den EGF-Rezeptor (anti-EGFR-Antikörper), bevorzugt monoklonale anti-EGFR-Antikörper, besonders bevorzugt Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD 72000), mithilfe bestimmter Präzipitationsreagenzien, ausgewählt unter Polymeren, vorzugsweise Polyethylenglycol (PEG), Salzen, vorzugsweise Ammoniumsulfat oder organischen Lösungsmitteln, vorzugsweise Ethanol, oder deren Mischungen, in Gegenwart eines geeigneten Puffers, bei geeignetem pH-Wert und geeigneter Temperatur inkubiert werden.

Überraschenderweise wurde gefunden, dass die mit erfindungsgemäßen Verfahren erhaltenen festen Formen von anti-EGFR-Antikörpern, bevorzugt von monoklonalen anti-EGFR-Antikörpern, besonders bevorzugt von Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD 72000) und/oder deren Varianten oder Fragmenten, vorzugsweise nach Wiederauflösung nativ sind und vorzugsweise in einer hohen Ausbeute erhalten werden.

Gegenstand der Erfindung sind deshalb feste Formen von anti-EGFR-Antikörpern und/oder deren Varianten oder Fragmenten, welche durch Auflösen oder Suspendieren in wässrigem Medium zu biologisch aktivem Antikörperprotein führen, erhältlich durch Ausfällung des in wässrigem Medium gelösten oder suspendierten Antikörpers und/oder einer seiner Varianten und/oder Fragmente mittels eines Präzipitationsreagenzes, ausgewählt unter Polymeren, vorzugsweise Polyethylenglycol (PEG), Salzen, vorzugsweise Ammoniumsulfat, oder organischen Lösungsmitteln, vorzugsweise Ethanol, oder deren Mischungen, in Gegenwart eines geeigneten Puffers, bei geeignetem pH-Wert und geeigneter Temperatur.

Feste Formen von anti-EGFR-Antikörpern:

Unter erfindungsgemäßen festen Formen eines anti-EGFR-Antikörpers versteht man vorzugsweise Präzipitate oder Kristalle, welche durch Auflösen oder Suspendieren in wässrigem oder nicht-wässrigem Medium zu biologisch aktivem Antikörper führen.

Erfindungsgemäße feste Formen werden durch Ausfällen des in einem wässrigen Medium gelösten oder suspendierten Antikörpers gemäß untenstehend beschriebenen Verfahren erhalten. Die erfindungsgemäßen festen Formen können im Bereich von μm und nm liegen.

Präzipitate:

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung versteht man unter Präzipitaten feste Formen in amorpher nicht-kristalliner Struktur oder Aggregations- und Assoziationszustände.

Kristalle:

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung versteht man unter Kristallen feste Formen in kristalliner Struktur.

Kristalline Strukturen lassen sich mit untenstehenden Verfahren nachweisen.

präzipitiert: Unter präzipitiert versteht man man im Rahmen der vorliegenden Erfindung erfindungsgemäße feste Formen in ausgefällter Form, d.h. je nach Verfahrenbedingungen in Form eines Präzipitats oder eines Kristalls.

5

präzipitiert kristallin: Unter präzipitiert kristallin oder kristallin versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung erfindungsgemäße feste Formen in geordneter kristalliner Struktur.

10

präzipitiert nicht-kristallin: Unter präzipitiert nicht-kristallin versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung erfindungsgemäße feste Formen in amorpher nicht-kristalliner Strukturen oder Aggregations- und Assoziationszustände.

15

gelöst: Unter gelöster Form versteht man im Rahmen der vorliegenden Erfindung erfindungsgemäße feste Formen die in einer erfindungsgemäßen Lösung gelöst bzw. wiederaufgelöst vorliegen.

20

suspendiert: Unter suspendierter Form versteht man erfindungsgemäße feste Formen die in einer erfindungsgemäßen Lösung suspendiert bzw. resuspendiert vorliegen.

25

Als **wässriges Medium** im Rahmen der Erfindung werden Wasser oder Gemische von Wasser mit geeigneten inerten Lösungsmitteln und anderen in Beispiel 1 genannten Agenzien verstanden, wie beispielsweise Puffer, Stabilisatoren oder Hilfstoffe, mit der Eigenschaft, dass erfindungsgemäße wässrige Medien allein nicht zur Ausfällung oder Kristallisation des Antikörpers führen, sondern eine Ausfällung oder Kristallisation erst durch Zusatz von erfindungsgemäßen Präzipitationsreagenzien erfolgt.

30

Als **nicht-wässriges Medium** im Rahmen der Erfindung werden Öle oder Gemische von Ölen mit Wasser oder anderen geeigneten inerten

Lösungsmitteln und anderen in Beispiel 1 genannten Agenzien verstanden, wie beispielsweise Stabilisatoren oder Hilfsstoffe, mit der Eigenschaft, dass erfindungsgemäße nicht-wässrige Medien allein nicht zur Ausfällung oder Kristallisation des Antikörpers führen, sondern eine Ausfällung oder Kristallisation erst durch Zusatz von erfindungsgemäßen Präzipitationsreagenzien erfolgt.

Bezüglich der erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörper und im Rahmen der vorliegenden Erfindung, versteht man unter „biologisch aktiv“, „nativ“ und „wirksam“, dass erfindungsgemäße anti-EGFR-Antikörper auch nach Überführung in erfindungsgemäße feste Formen und anschließender Wiederauflösung oder Resuspension ihre biologische Wirkung ausüben können, insbesondere die Bindung an EGFR, Inhibition der Bindung von Liganden, insbesondere EGF, an den EGFR, Modulation, insbesondere Inhibition der EGFR-vermittelten Signaltransduktion und Prophylaxe oder Therapie von EGFR-vermittelten Erkrankungen.

Insbesondere eine unproblematische Herstellung von Kristallen von erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörpern war deshalb nicht zu erwarten, da Antikörper im Allgemeinen eine starke Tendenz zur Aggregation aufweisen, was den geordneten Einbau in ein Kristallgitter erschwert oder gar verhindert (McPherson A. (1999) Crystallization of Biological Macromolecules, 1 edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York). Trotz der für den Fachmann zu erwartenden Schwierigkeiten bei der Kristallisation erfindungsgemäßer Antikörper aufgrund der obengenannten Inhomogenität bezüglich Proteinstruktur, Glykosylierung und struktureller segmentaler Flexibilität auch innerhalb einer Antikörper-Spezies, werden überraschenderweise mit erfindungsgemäßen Verfahren ausgezeichnete Ergebnisse erzielt.

Die hohe Stabilität der erhaltenen Kristalle erfindungsgemäßer Antikörper ist auch dadurch gekennzeichnet, dass es weder zur Veränderung der

Partikelform und des Partikelgrößenspektrums, was als kritisch im Hinblick auf immunogene Nebenwirkungen anzusehen wäre, noch zu Veränderungen in der Primärstruktur oder Sekundärstruktur des Proteins kommt. Das erfindungsgemäße Verfahren bietet somit den Vorteil, dass vorzugsweise die Partikelgröße der erhaltenen Kristalle kontrollierbar ist und vorzugsweise stabile dreidimensionale Kristalle erhalten werden. Die Kristallgröße kann im Bereich von μm und nm liegen.

anti-EGFR-Antikörper: Erfindungsgemäße anti-EGFR-Antikörper sind vorzugsweise monoklonal und muriner oder humaner Herkunft, besonders bevorzugt sind sie muriner Herkunft und chimär oder humanisiert. Bei dem gegen den Rezeptor des epidermalen Wachstumsfaktors (EGFR) gerichteten Antikörper handelt es sich besonders bevorzugt um Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD 72000) und/oder deren Varianten oder Fragmente. Weitere gegen den EGFR gerichtete Antikörper sind z.B. in der EP0586002 sowie in J. Natl. Cancer Inst. 1993, 85:27-33 (Mab 528) beschrieben.

Mab C225 (Cetuximab, ErbituxTM): Mab C225 (Cetuximab) ist ein klinisch erprobter Antikörper, der an den EGF-Rezeptor bindet. Mab C225 (Cetuximab) ist ein chimärer Antikörper, dessen variable Regionen murinen und dessen konstante Regionen humanen Ursprungs sind. Er wurde erstmals von Naramura et al., Cancer Immunol. Immunotherapy 1993, 37: 343-349 sowie in WO 96/40210 A1 beschrieben.

Mab h425 (EMD 72000): Mab h425 (EMD 72000) ist ein humanisierter monoklonaler Antikörper (Mab), der aus dem murinen anti-EGFR-Antikörper 425 (Mab 425) erhalten wurde (EP0531472). Der murine monoklonale Antikörper Mab 425 wurde in der humanen Karzinomzelllinie A431 entwickelt, da er hier an ein extrazelluläres Epitop des epidermalen Wachstumsfaktorrezeptor (EGFR) bindet. Es wurde gefunden, dass er die Bindung von EGF inhibiert (Murthy et al., 1987). Erhöhte Expression von

EGFR wird in malignen Geweben aus unterschiedlichen Quellen gefunden, so dass Mab 425 ein möglicher Wirkstoff zur Diagnose und therapeutischen Behandlung von humanen Tumoren ist. So wurde gefunden, dass Mab 425 In vitro Tumorzytotoxizität vermittelt und in vitro
5 das Tumorwachstum von Zelllinien epidermoider und colorektaler Karzinome unterdrückt (Rodeck et al., 1987). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Mab 425 an Xenografts von humanen malignen Gliomen in Mäusen bindet (Takahashi et al., 1987). Seine humanisierten und
10 chimären Formen sind z.B. aus EP0531472; 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, 48: 167-173 bekannt. Mab h425 (EMD 72000) ist dabei ein in der klinischen Phase I/II befindlicher humanisierter Antikörper (h425), dessen konstanter
15 Bereich sich aus einer κ und einer humanen γ -1-Kette zusammensetzt (EP0531472).

Humane anti-EGFR-Antikörper können nach der XenoMouse-Technologie bereitgestellt werden, wie in der WO9110741, WO9402802, WO9633735 beschrieben. Ein gemäß dieser Technologie hergestellter, in der klinischen
20 Erprobung befindlicher Antikörper ist beispielsweise auch ABX-EGF (Abgenix, Crit. Rev. Oncol. Hematol. 2001, 38: 17-23; Cancer Research 1999, 59: 1236-43).

Antikörper. Antikörper oder Immunglobulin wird im Rahmen der
25 vorliegenden Erfindung im breitesten Umfang verwendet und betrifft insbesondere polyklonale Antikörper und multispezifische Antikörper (z.B. bispezifische Antikörper) und besonders bevorzugt intakte monoklonale Antikörper (Mab), die biologisch wirksam sind, sowie deren Varianten und
30 Fragmente. Es sind auch Heteroantikörper, die aus zwei oder mehreren Antikörpern oder deren Fragmenten bestehen und/oder verschiedene Bindungsspezifitäten aufweisen und miteinander verbunden sind, umfasst.

In Abhängigkeit von der Aminosäuresequenz ihrer konstanten Regionen können Antikörper verschiedenen „Antikörper- (Immunglobulin-) Klassen zugeordnet werden: IgA, IgD, IgE, IgG und IgM. Mehrere davon können weiter in Subklassen (Isotypen) unterteilt werden, beispielsweise IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 und IgA2. Antikörper haben gewöhnlich ein Molekulargewicht von etwa 150 kDa, bestehen aus zwei identischen leichten Ketten (L) und zwei identischen schweren Ketten (H). Monoklonale Antikörper werden aus einer Population homogener Zellen erhalten. Sie sind hochspezifisch und gegen ein einziges Epitop gerichtet, während polyklonale Antikörper verschiedene Antikörper umfassen, die gegen unterschiedliche Epitope gerichtet sind. Verfahren zur Herstellung monoklonaler Antikörper umfassen beispielsweise die von Kohler und Milstein (Nature 256, 495 (1975)) und in Burdon et 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 beschriebene Hybridommethode. Sie können insbesondere durch bekannte rekombinante DNA-Techniken hergestellt werden (siehe z.B. US4816567). Monoklonale Antikörper können auch aus Phagenantikörperbibliotheken isoliert werden beispielsweise mithilfe der in Clackson et al. (Nature, 352:624-628 (1991)) und Marks et al. (J. Mol. Biol., 222:58, 1-597(1991)) beschriebenen Techniken.

Varianten und Fragmente: Bei Varianten (Mutelne) von Antikörpern handelt es sich um strukturverwandte Proteine, beispielsweise solche, die durch Modifikation der Primärsequenz (Aminosäuresequenz), durch Glycoengineering (Varianten der Glykosylierungsstellen bzw -strukturen, auch deglykosylierte Proteine), durch PEGylierung, durch Herstellung in modifizierten Wirtszellen oder durch andere Techniken erhalten werden können. Erfindungsgemäße Varianten sind hierbei nicht auf die vorstehenden Beispiele beschränkt, sondern umfassen alle dem Fachmann bekannten Varianten erfindungsgemäßer Antikörper.

Bei Fragmenten (Teilesegmenten) von Antikörpern handelt es sich um Spaltungsprodukte von Antikörpern, die beispielsweise durch limitierte enzymatische Verdauung mithilfe von Papain, Pepsin und Plasmin oder durch gentechnische Herstellung der Teilesegmente gewonnen werden.

5 Typische Teilesegmente sind beispielsweise das bivalente $F(ab')_2$ -Fragment, das monovalente Fab-Fragment sowie das Fc-Fragment. (Lottspeich F., H. Zorbas (ed.). Bioanalytik, Heidelberg; Berlin: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, (1998) pp.1035). Erfindungsgemäße Fragmente sind hierbei nicht auf die vorstehenden Beispiele beschränkt,

10 sondern umfassen alle dem Fachmann bekannten Fragmente erfindungsgemäßer Antikörper.

Pharmazeutische Zubereitung: Die Begriffe pharmazeutische Formulierung und pharmazeutische Zubereitung werden im Rahmen der vorliegenden

15 Erfindung als Synonyme verwendet.

Wie hier verwendet bezieht sich „pharmazeutisch verträglich“ auf Arzneimittel, Präzipitationsreagenzien, Trägerstoffe, Hilfsstoffe, Stabilisatoren, Lösungsmittel und sonstige Agenzien, die die Verabreichung der daraus

20 erhaltenen pharmazeutischen Zubereitungen ohne unerwünschte physiologische Nebenwirkungen, wie Übelkeit, Schwindel, Verdauungsprobleme o.ä. an ein Säugetier ermöglichen.

Bei pharmazeutischen Zubereitungen zur parenteralen Verabreichung besteht die Forderung nach Isotonie, Euhydrie sowie nach Verträglichkeit

25 und Sicherheit der Formulierung (geringe Toxizität), der eingesetzten Hilfsstoffe und des Primärpackmittels. Überraschenderweise haben erfindungsgemäße feste Formen von anti-EGFR-Antikörpern vorzugsweise den Vorteil, dass eine direkte Verwendung möglich ist, da als

30 Präzipitationsreagenzien physiologisch unbedenkliche Agenzien verwendet werden und vor Verwendung der erfindungsgemäßen festen Formen in pharmazeutischen Formulierungen somit keine weiteren

Reinigungsschritte zum Entfernen toxikologisch bedenklicher Agenzien, wie beispielsweise hohe Konzentrationen organischer Lösungsmittel oder anderer toxikologisch bedenklicher Hilfsstoffe, erforderlich sind. Somit ist die Herstellung erfindungsgemäßer fester Formen von anti-EGFR-Antikörpern bei vorzugsweise gleichzeitig hoher Ausbeute an nativem und pharmazeutisch unbedenklichem Protein hoher Reinheit, vorzugsweise einfach, zeiteparend und kostengünstig.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch ein Verfahren zur Herstellung einer festen Form eines erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörpers und/oder einer seiner Varianten und/oder Fragmente, welche durch Auflösen oder Suspendieren in wässrigem Medium zu biologisch aktivem Antikörperprotein führt, dadurch gekennzeichnet, dass der in wässriger Lösung gelöste oder suspendierte Antikörper und/oder seine Varianten und/oder Fragmente durch ein Präzipitationsreagenz ausgefällt werden und das Ausfällungsprodukt abgetrennt wird. Als Präzipitationsreagenzien werden im erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise Polymere, besonders bevorzugt Polyethylenglycol (PEG), Salze, besonders bevorzugt Ammoniumsulfat, oder organische Lösungsmittel, besonders bevorzugt Ethanol verwendet.

Eine erfindungsgemäße feste Form eines anti-EGFR-Antikörpers kann hergestellt werden, indem einer Lösung, die erfindungsgemäße Antikörper enthält, die in Beispiel 1 genannten erfindungsgemäßen Präzipitationsreagenzien, vorzugsweise Polymere, wie besonders bevorzugt Polyethylenglykol (PEG) in einer Konzentration von 0,1 bis 99,9 % (w/v), mit einem durchschnittlichen Molekulargewicht von 200 – 80.000, bevorzugt 400 bis 20.000, besonders bevorzugt 400 – 8.000; Salze, wie besonders bevorzugt Ammoniumsulfat in einer Konzentration von 0,1 – 4,5 M, Natriumacetat-Trihydrat in einer Konzentration von 0,1 – 4,5 M, tri-Natriumcitrat Dihydrat in einer Konzentration von 0,1 – 1,5 M, Kaliumphosphat in einer Konzentration von 0,1 – 1,2 M, Kaliumchlorid in einer

Konzentration von 0,1 bis 4,7 M, Natriumchlorid in einer Konzentration von 0,1 bis 6,1 M, di-Kaliumhydrogenphosphat in einer Konzentration von 0,1 bis 3,0 M, di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat in einer Konzentration von 0,1 bis 0,5 M oder organische Lösungsmittel, wie besonders bevorzugt Ethanol in einer Konzentration von 0,1 – 99,9% (v/v), oder deren Mischungen, sowie Hilfsstoffe, Puffer und/oder Stabilisatoren in einer Batch-Methode zugefügt werden und das Gemisch bei in Beispiel 1 genannten pH-Werten und Temperaturen inkubiert wird. Zweckmäßigerweise wird hierzu einer Lösung mit einer definierten Konzentration an EGFR-Antikörper (0,01 bis 150 mg/ml, bevorzugt 2 bis 100 mg/ml, besonders bevorzugt ca. 5-20 mg/ml), wie sie bei dessen Herstellung gewonnen wird, mit definierten Volumina an Stammlösungen, die die in Beispiel 1 genannten Präzipitationsreagenzien, Hilfsstoffe, Puffer und/oder Stabilisatoren in definierter Konzentration enthalten, versetzt und gegebenenfalls mit Wasser oder Puffer (beispielsweise Citrat oder Phosphatpuffer, in einer Konzentration von 1mM bis 200 mM, bevorzugt 2 bis 20mM, besonders bevorzugt ca. 10 mM; auch unter Zusatz von Isotonisierungsmitteln wie beispielsweise Kaliumchlorid, Natriumchlorid in einer Konzentration von 1 – 1000 mM, bevorzugt 40 mM - 310 mM) auf die vorberechnete Konzentration verdünnt. Alternativ können erfindungsgemäße Präzipitationsreagenzien, Hilfsstoffe, Puffer und Stabilisatoren auch in fester Form zugesetzt werden. Liegt der Antikörper selbst in festem Aggregatzustand vor, beispielsweise als Lyophilisat, können die erfindungsgemäßen festen Formen von anti-EGFR-Antikörpern hergestellt werden, indem erfindungsgemäße Antikörper zunächst in Wasser oder in einer einen oder mehrere weitere Inhaltsstoffe enthaltenden wässrigen Lösung gelöst werden und anschließend mit definierten Volumina an Stammlösungen, die die in Beispiel 1 genannten Präzipitationsreagenzien, Hilfsstoffe, Puffer und/oder Stabilisatoren in definierter Konzentration enthalten, versetzt werden. Erfindungsgemäße Präzipitationsreagenzien, Hilfsstoffe, Puffer und/oder Stabilisatoren können zudem auch in festem Aggregatzustand zugesetzt werden. Zweckmäßigerweise können

erfindungsgemäße Antikörper auch direkt in einer alle Präzipitationsreagenzien, Hilfsstoffe, Puffer und/oder Stabilisatoren enthaltenden Lösung gelöst werden.

- 5 Die Erfindung umfasst auch alle dem Fachmann bekannten und denkbaren Hydrate, Salze und Derivate der vorstehend genannten Agenzien.

- 10 Vorteilhaft kann eines oder mehrere der in der Erfindung genannten Agenzien während oder nach Beendigung des Präzipitationsverfahrens zugegeben und gegebenenfalls wieder entfernt werden, um beispielsweise einen zusätzlichen Reinigungsschritt auszuführen.

- 15 Vorteilhaft kann eines oder mehrere der in der Erfindung genannten Präzipitationsreagenzien, Hilfsstoffe, Puffer und/oder Stabilisatoren während oder nach Beendigung des Herstellungsverfahrens des Antikörpers zugegeben werden. Bevorzugt kann dies dadurch erfolgen, indem der erfindungsgemäße Antikörper im letzten Schritt der nach seiner Herstellung erfolgenden Aufreinigung direkt in einer wässrigen Lösung
- 20 gelöst wird, die einen, mehrere oder alle weiteren Präzipitationsreagenzien, Hilfsstoffe, Puffer und/oder Stabilisatoren enthält. Dann müssen zur Herstellung einer erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zubereitung die jeweiligen weiteren Inhaltsstoff/e nur noch in jeweils geringerer Menge oder gar nicht zugesetzt werden. Besonders bevorzugt
- 25 ist, wenn der jeweilige Inhaltsstoff im letzten Schritt der Aufreinigung des Antikörpers, die seiner Herstellung folgt, in einer alle weiteren Präzipitationsreagenzien, Hilfsstoffe, Puffer und/oder Stabilisatoren enthaltenden wässrigen Lösung gelöst wird. So kann vorteilhafterweise eine direkt abzufüllende oder zu lyophilisierende Lösung erhalten werden.
- 30 Die so erhaltene, den jeweiligen Antikörper enthaltende Lösung wird auf einen pH-Wert von 4 bis 10, bevorzugt pH 5 bis 9 eingestellt, steriltriftriert und je nach Bedarf gefriergetrocknet.

Die Umsetzung erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden in einem geeigneten Lösungsmittel, insbesondere in einem inerten Lösungsmittel. Als inerte Lösungsmittel eignen sich Ethanol, Glycerol, Gemische mit Wasser oder reines oder andere Hilfsstoffe, wie
5 beispielsweise Salze mit puffernder oder isotonsierender Wirkung, enthaltendes Wasser. Besonders bevorzugt ist Wasser.

Besonders bevorzugt kann das hier beschriebene Verfahren im „batch“-Format durchgeführt werden. Nach erfindungsgemäßem Verfahren hergestellte erfindungsgemäße feste Formen von anti-EGFR-Antikörpern und/oder seiner Varianten und/oder Fragmente können besonders bevorzugt durch Auflösen oder Suspendieren in wässrigem Medium in biologisch aktives Antikörperprotein überführt werden. Dazu werden
10 besonders bevorzugt ein in wässriger Lösung gelöster oder suspendierter Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente durch ein in Beispiel 1 genanntes Präzipitationsreagenz ausgefällt und das Ausfällungsprodukt abgetrennt.

Je nach Wahl der Konzentration des Präzipitationsreagenzes werden entweder amorphe Präzipitate oder Kristalle erhalten. Vorzugsweise werden bei höherer Konzentration des Präzipitationsreagenzes Präzipitate, bei niedrigerer Konzentration des Präzipitationsreagenzes dagegen Kristalle erhalten. Durch geeignete Wahl, der Konzentration des
20 Präzipitationsreagenzes, der Konzentration des Proteins, der übrigen erfindungsgemäßen Agenzien, des pH-Werts und der Temperatur lässt sich so die Umsetzung in die gewünschte Richtung lenken. In den Beispielen 2 und 3 sind beispielhafte Kristallisationsbedingungen für Mab C225 (ErbixTM) aufgeführt, in den Beispielen 4 und 5 beispielhafte
25 Präzipitationsbedingungen. Das erfindungsgemäße Präzipitationsverfahren und das erfindungsgemäße Kristallisationsverfahren können auch kombiniert werden.

Gelegnete Reaktionstemperaturen liegen bei Temperaturen von -10 bis 40°C, vorzugsweise bei 0 bis 25°C und ganz besonders bevorzugt bei 4 bis 20°C. Bevorzugt wird bei einem Druck von 1 bis 20 bar gearbeitet, besonders bevorzugt bei Normdruck. Bevorzugt wird bei einem pH-Wert von 4 bis 10 gearbeitet. Die Dauer der Umsetzung hängt von den gewählten Reaktionsbedingungen ab. In der Regel beträgt die Reaktionsdauer 0.5 Stunden bis 10 Tage, vorzugsweise 1 bis 24 Stunden, besonders bevorzugt 2 bis 12 Stunden.

10

Unter Solvaten der erfindungsgemäßen festen Formen werden Anlagerungen von inerten Lösungsmittelmolekülen an die erfindungsgemäßen festen Formen verstanden, die sich aufgrund ihrer gegenseitigen Anziehungskraft ausbilden. Solvate sind beispielsweise Hydrate, wie Monohydrate oder Dihydrate oder Alkoholate, d.h. Additionsverbindungen mit Alkoholen wie beispielsweise mit Ethanol.

15

Die erhaltenen erfindungsgemäßen festen Formen von anti-EGFR-Antikörpern können von der entsprechenden Lösung, in der sie hergestellt werden, getrennt werden (z.B. durch Zentrifugation und Waschen) und können nach der Trennung in einer anderen Zusammensetzung gelagert werden, oder sie können direkt in der Herstellungslösung verbleiben. Die erhaltenen erfindungsgemäßen festen Formen können auch zur jeweiligen Verwendung in gewünschte Lösungsmittel aufgenommen werden. Die erfindungsgemäßen festen Formen von anti-EGFR-Antikörper sind vorzugsweise nach Wiederauflösung oder Resuspension biologisch aktiv und es kommt bei erfindungsgemäßen Verfahren vorzugsweise nicht zu einer Denaturierung der Antikörper. So bleibt die biologische Wirksamkeit des Proteins vorzugsweise erhalten.

20

25

30

Ebenso wurde überraschend gefunden, dass sich mithilfe erfindungsgemäßer fester Formen von anti-EGFR-Antikörpern vorzugsweise stabile

pharmazeutische Formulierungen herstellen lassen. Diese Formulierungen weisen vorzugsweise eine höhere Stabilität gegenüber physikochemischen Einflüssen wie beispielsweise Oxidation, mechanischen Belastungen, ungünstigen pH-Werten und Temperaturen auf als herkömmliche Proteinlösungen von Antikörpern. Üblicherweise ist eine vergleichbare Stabilität sonst nur durch kosten- und zeitaufwendige Methoden zu erreichen, wie beispielsweise der Zusatz von Stabilisatoren, eine kühle Lagerung, Einfrieren oder Gefriertrocknung. Die hohe Stabilität ermöglicht vorzugsweise eine einfachere und kostengünstigere Lagerung, Transport und Herstellung pharmazeutisch wertvoller Formulierungen, wie beispielsweise ready-to-use-Formulierungen, Formulierungen mit verzögerter Wirkstofffreisetzung oder kontrollierter Freisetzung über einen längeren Zeitraum hinweg.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind deshalb erfindungsgemäße feste Formen von anti-EGFR-Antikörpern als lagerstabile Arzneimittel.

Ein besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung sind auch pharmazeutische Zubereitungen enthaltend wenigstens eine erfindungsgemäße feste Form eines anti-EGFR-Antikörpers in präzipitierter nicht-kristalliner, präzipitierter kristalliner oder in gelöster oder suspendierter Form, sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe und/oder weitere pharmazeutische Wirkstoffe.

Somit können erfindungsgemäße pharmazeutische Zubereitungen erfindungsgemäße feste Formen in präzipitierter Form, d.h. als Präzipitat oder als Kristall, oder in wiederaufgelöster oder resuspendierter Form enthalten. Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend wenigstens ein Präzipitat und/oder Kristall eines anti-EGFR-Antikörpers, bevorzugt eines monoklonalen anti-EGFR-Antikörpers, besonders bevorzugt von Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD 72000) und/oder deren Varianten oder Fragmenten in präzipitierter,

wiederaufgelöster oder suspendierter Form sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe und/oder weitere pharmazeutische Wirkstoffe.

Vorzugsweise ermöglichen es die erfindungsgemäßen festen Formen von anti-EGFR-Antikörpern, hochkonzentrierte Formulierungen herzustellen, ohne dass es zu ungünstigen unerwünschten Aggregationen der erfindungsgemäßen Antikörper oder zu unerwünscht hoher Viskosität kommt, wie sie bei gewöhnlichen, hochkonzentrierten Proteinlösungen beobachtet werden kann. So lassen sich mithilfe erfindungsgemäßer fester Formen von anti-EGFR-Antikörpern mit wässrigen Lösungsmitteln oder in wässrigen Medien applikationsfertige Lösungen mit hohem Wirkstoffanteil wiederauflösen oder resuspendieren. In jüngerer Zeit werden vermehrt möglichst hochkonzentrierte Formulierungen von Proteinwirkstoffen gefordert. Die meisten Antikörper, die zur Therapie eingesetzt werden, werden im Bereich mg/kg dosiert. Eine hohe Dosis und geringe zu applizierende Volumina (z.B. ca. 1 bis 1,5 ml bei subkutaner Applikation) zeigen den Bedarf an hochkonzentrierten Proteinzubereitungen mit Konzentrationen von mehr als 100 mg/ml. Außerdem können hochkonzentrierte Proteinformulierungen in präklinischen Tests zur Untersuchung der Unbedenklichkeit und Wirksamkeit in-vitro und in-vivo (am Tiermodell), in klinischen Tests zur Untersuchung der Unbedenklichkeit und Wirksamkeit beim Menschen und in der klinischen Anwendung des Produktes (insbesondere bei der subkutanen Applikation) erhebliche Vorteile aufweisen. Ihre Vorteile bestehen insbesondere darin, dass ein geringeres Volumen der Zubereitung angewendet werden muss. Im Gegensatz zur Infusion oder Injektion von relativ niedrig konzentrierten Proteinarzneimitteln ist dadurch z.B. eine subkutane Applikation von Proteinarzneimitteln für den Patienten möglich. Die subkutane Applikation von Proteinarzneimitteln kann verschiedene Gründe haben. Beispielsweise kann ein spezielles Targeting erwünscht sein, welches in Zusammenhang mit einem „therapeutischen Fenster“ steht. Des Weiteren hat eine

subkutane Applikation den Vorteil, dass der Patient selbst die Applikation vornehmen kann, ohne auf ärztliches Personal angewiesen zu sein. Das Beispiel des Insulins zeigt deutlich diese Vorteile. Da die Injektionen zur subkutanen Applikation jedoch maximal 1 - 1,5 ml betragen können, sind häufig hochkonzentrierte Proteinformulierungen mit mehr als 100 mg/ml nötig.

Überraschenderweise lassen sich mithilfe erfindungsgemäßer fester Formen von anti-EGFR-Antikörpern hochkonzentrierte pharmazeutische Zubereitungen erhalten, die in einer flüssigen Formulierung Proteinkonzentrationen von bevorzugt 10 – 200 mg/ml, besonders bevorzugt von 50 – 150 mg/ml ermöglichen.

Dies war nicht zu erwarten, da bei hoch konzentrierten Proteinformulierungen die Tendenz zur Instabilität weitaus größer ist als bei verdünnten Proteinformulierungen (Fields, G., Alonso, D., Stiger, D., Dill, K. (1992) "Theory for the aggregation of proteins and copolymers." J. Phys. Chem. 96, 3974-3981). Bei einer hohen Proteinkonzentration ist die "Packungsdichte" der Proteinmoleküle erhöht. Eine vermehrte Anzahl an Kollisionen ist demnach anzunehmen und es kann zu gelegentlichen Protein-Assoziationen kommen. Dieser Prozess erfolgt in der Regel durch Nukleations- und Wachstumsmechanismen, bei der die kritischen Nuklei oft lösliche assoziierte Proteine darstellen, die sich jedoch schnell in unlösliche Proteinpräzipitate (denaturiertes Protein) umwandeln können (Reithel, J.F. (1982) „The dissociation and association of protein structures“, Adv. Protein Chem. 18, 123). Die GröÙe der Proteinaggregate erhöht sich mit steigender Proteinkonzentration, wie für das β -Lactoglobulin bereits gezeigt werden konnte (Roefs, S.P.F.M., De Kruif, K.G. (1994) "A model for the denaturation and aggregation of β -lactoglobulin." Eur. J. Biochem. 226, 883-889)

30

Die Grenze bei bekannten hochkonzentrierten Formulierungen von Immunglobulinen liegt bei gebrauchsfertigen flüssigen Formulierungen von Antikörpern normalerweise bei 2 - 50mg/mL (Humira®).

5 Mit den erfindungsgemäßen festen Formen lassen sich jedoch stabile hochkonzentrierte Formulierungen herstellen, was nicht zu erwarten war. Somit kann durch den Schritt der Präzipitation oder Kristallisation eine hochkonzentrierte stabile Antikörperformulierung erhalten werden, die nach Resuspendierung oder Wiederauflösen eine verringerte Viskosität
10 verglichen mit flüssigen Antikörperformulierungen gleicher Konzentration aufweist und dadurch die Handhabbarkeit bei der parenteralen Verabreichung erleichtert.

Gegenstand der Erfindung sind deshalb auch pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend wenigstens eine erfindungsgemäße feste Form
15 eines anti-EGFR-Antikörpers und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente in präzipitierter nicht-kristalliner, präzipitierter kristalliner oder in gelöster oder suspendierter Form enthält, wobei der enthaltene Antikörper biologisch aktiv ist, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörperkonzentration bevorzugt 10 – 200 mg/ml, besonders bevorzugt 50 – 150
20 mg/ml beträgt.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung einer erfindungsgemäßen hochkonzentrierten pharmazeutischen Zubereitung, dadurch gekennzeichnet, dass man wenigstens eine erfindungsgemäße
25 feste Form eines anti-EGFR-Antikörpers und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente in einer erfindungsgemäßen Lösung löst oder resuspendiert und die Antikörperkonzentration bevorzugt 10 – 200 mg/ml, besonders bevorzugt 50 – 150 mg/ml beträgt.

Wässrige Zubereitungen können hergestellt werden, indem man
30 erfindungsgemäße feste Formen von anti-EGFR-Antikörpern in einer wässrigen Lösung löst oder suspendiert und gegebenenfalls Hilfsstoffe zufügt. Zweckmäßigerweise wird hierzu einer Lösung oder Suspension mit

einer definierten Konzentration an erfindungsgemäßen festen Formen mit definierten Volumina an Stammlösungen, die die genannten weiteren Hilfsstoffe in definierter Konzentration enthalten, versetzt und ggf. mit Wasser auf die vorberechnete Konzentration verdünnt. Alternativ können die Hilfsstoffe in fester Form zugesetzt werden. Die erhaltene wässrige Lösung oder Suspension kann anschließend mit den jeweils erforderlichen Mengen an Stammlösungen und/oder Wasser versetzt werden. Zweckmäßigerweise können erfindungsgemäße feste Formen von anti-EGFR-Antikörpern auch direkt in einer alle weiteren Hilfsstoffe enthaltenden Lösung gelöst oder suspendiert werden.

Vorteilhaft können aus den erfindungsgemäßen festen Formen durch die Rekonstitution mit wässrigen Lösungsmitteln antikörperhaltige Lösungen oder Suspensionen mit einem pH-Wert von 4 bis 10, bevorzugt mit einem pH-Wert von 5 bis 9, und einer Osmolalität von 250 bis 350 mOsmol/kg hergestellt werden. Die resuspendierte oder wieder gelöste Zubereitung kann somit weitgehend schmerzfrei intravenös, intraarteriell und auch subkutan direkt verabreicht werden. Daneben kann die Zubereitung auch Infusionslösungen, wie z.B. Glukoselösung, isotonische Kochsalzlösung oder Ringerlösung, die auch weitere Wirkstoffe enthalten können, zugesetzt werden, so dass auch größere Wirkstoffmengen appliziert werden können.

Erfindungsgemäße pharmazeutische Zubereitungen können auch Mischungen erfindungsgemäßer Präzipitate und/oder Kristalle in präzipitierter bzw. kristalliner und/oder wiederaufgelöster oder resuspendierter Form enthalten.

Die erfindungsgemäßen Zubereitungen sind physiologisch gut verträglich, leicht herstellbar, exakt dosierbar und vorzugsweise über die Dauer der Lagerung sowie des Transports und bei mehrfachen Einfrier- und Auftauvorgängen hinsichtlich Gehalt, Zersetzungsprodukten und

- Aggregaten stabil. Sie können bei Kühlschranktemperatur (2-8°C) und bei Raumtemperatur (23-27°C) und 60 % relativer Luftfeuchtigkeit (r.F.) vorzugsweise über einen Zeitraum von mindestens drei Monaten bis zu zwei Jahren stabil gelagert werden. Überraschenderweise sind die erfindungsgemäßen Zubereitungen vorzugsweise auch bei höheren Temperaturen und Luftfeuchtigkeiten, beispielsweise bei einer Temperatur von 40°C und 75% relativer Luftfeuchtigkeit über mindestens sechs Monate stabil lagerbar.
- 10 Beispielsweise können erfindungsgemäße feste Formen durch Trocknung stabil gelagert und bei Bedarf durch Lösung oder Suspension in eine gebrauchsfertige pharmazeutische Zubereitung überführt werden. Mögliche Methoden zur Trocknung sind zum Beispiel, ohne auf diese Beispiele beschränkt zu sein, Stickstoffgastrocknung, Vakuumofen-
- 15 Trocknung, Lyophilization, Waschen mit organischem Lösungsmittel und anschließende Lufttrocknung, Flüssigbett-Trocknung, Wirbelschicht-trocknung, Sprühtrocknung, Walzentrocknung, Lagentrocknung; Lufttrocknung bei Raumtemperatur und weitere Methoden.
- 20 Der Ausdruck "wirksame Menge" bedeutet die Menge eines Arzneimittels oder eines pharmazeutischen Wirkstoffes, die eine biologische oder medizinische Antwort in einem Gewebe, System, Tier oder Menschen hervorruft, die z.B. von einem Forscher oder Mediziner gesucht oder angestrebt wird.
- 25 Darüber hinaus bedeutet der Ausdruck "therapeutisch wirksame Menge" eine Menge, die, verglichen zu einem entsprechenden Subjekt, das diese Menge nicht erhalten hat, folgendes zur Folge hat: verbesserte Heilbehandlung, Heilung, Prävention oder Beseitigung einer Krankheit, eines Krankheitsbildes, eines Krankheitszustandes, eines Leidens, einer Störung oder Verhinderung von Nebenwirkungen oder auch die Verminderung des Fortschreitens einer Krankheit, eines Leidens oder einer Störung. Die
- 30

Bezeichnung "therapeutisch wirksame Menge" umfasst auch die Mengen, die wirkungsvoll sind, die normale physiologische Funktion zu erhöhen.

5 Arzneimittel können in Form von Dosisseinheiten, die eine vorbestimmte Menge an Wirkstoff pro Dosisseinheit enthalten, dargereicht werden. Eine solche Einheit kann beispielsweise 0,5 mg bis 1 g, vorzugsweise 1 mg bis 800 mg, eines erfindungsgemäßen Wirkstoffs enthalten, je nach dem behandelten Krankheitszustand, dem Verabreichungsweg und dem Alter, Gewicht und Zustand des Patienten. Bevorzugte Dosierungseinheits-

10 formulierungen sind solche, die eine Tagesdosis oder Teildosis, wie oben angegeben, oder einen entsprechenden Bruchteil davon eines Wirkstoffs enthalten. Weiterhin lassen sich solche Arzneimittel mit einem der im pharmazeutischen Fachgebiet allgemein bekannten Verfahren herstellen.

15 Arzneimittel lassen sich zur Verabreichung über einen beliebigen geeigneten Weg, beispielsweise auf oralem (einschließlich buccalem bzw. sublingualen), rektalem, pulmonalen, nasalem, topischem (einschließlich buccalem, sublingualen oder transdermale), vaginalen oder parenteralem (einschließlich subkutanem, intramuskulärem, intravenösem

20 oder intradermale) Wege, anpassen. Solche Arzneimittel können mit allen im pharmazeutischen Fachgebiet bekannten Verfahren hergestellt werden, indem beispielsweise der Wirkstoff mit dem bzw. den Trägerstoff(en) oder Hilfsstoff(en) zusammengebracht wird.

25 Zur Verabreichung der erfindungsgemäßen Arzneimittel eignen sich vorzugsweise die parenterale Applikation. Im Falle der parenteralen Applikation sind die intravenöse und subkutane Applikation besonders bevorzugt. Im Falle der intravenösen Applikation kann die Injektion direkt oder auch als Zusatz zu Infusionslösungen erfolgen.

30 Insbesondere eignen sich Arzneimittel zur subkutanen Applikation, da sich mithilfe erfindungsgemäßer fester Formen von anti-EGFR-Antikörpern

stabile, hochkonzentrierte Formulierungen herstellen lassen. Dadurch lassen sich die für die parenterale oder subkutane Verabreichung erforderlichen hochkonzentrierten Formulierungen und geringe zu applizierende Volumina realisieren.

5

Die subkutane Applikation hat den Vorteil, dass der Patient ohne medizinische fachmännische Hilfe sich selbst das Arzneimittel verabreichen kann. Erfindungsgemäße feste Formen von anti-EGFR-Antikörpern eignen sich auch zur Herstellung von parenteral zu applizierenden Arzneimitteln mit kontrollierter, gleichmäßiger und/oder verzögerter Wirkstofffreisetzung (slow-release, sustained-release, controlled release). Die erfindungsgemäßen Präzipitate und/oder Kristalle liegen dabei vorzugsweise in Suspension vor und lösen sich über einen längeren und/oder kontrollierten Zeitraum hinweg auf und liegen dann in nativem und wirksamen Zustand vor. Somit eignen sich erfindungsgemäße feste Formen von anti-EGFR-Antikörpern auch zur Herstellung von Depot-Formulierungen, die für den Patienten vorteilhaft sind, da eine Applikation nur in größeren Zeitintervallen notwendig ist. Erfindungsgemäße pharmazeutische Zubereitungen können auch direkt in den Tumor injiziert werden und so direkt am bestimmungsgemäßen Wirkort ihre Wirkung entfalten.

Zu den an die parenterale Verabreichung angepassten Arzneimitteln gehören wässrige und nichtwässrige sterile Injektionslösungen, die Antioxidantien, Puffer, Bakteriostatika und Solute, durch die die Formulierung isotonisch mit dem Blut des zu behandelnden Empfängers gemacht wird, enthalten; sowie wässrige und nichtwässrige sterile Suspensionen, die Suspensionsmittel und Verdicker enthalten können. Die Formulierungen können in Einzeldosis- oder Mehrfachdosisbehältern, z.B. versiegelten Ampullen und Fläschchen, dargereicht und in gefriergetrocknetem (lyophilisiertem) Zustand gelagert werden, so dass nur die Zugabe der sterilen Trägerflüssigkeit, z.B. Wasser für Injektionszwecke,

30

unmittelbar vor Gebrauch erforderlich ist. Rezepturmäßig hergestellte Injektionslösungen und Suspensionen können aus sterilen Pulvern, Granulaten und Tabletten hergestellt werden.

- 5 Die erfindungsgemäßen festen Formen von anti-EGFR-Antikörpern, gegebenenfalls in wiederaufgelöster Form lassen sich auch in Form von Liposomenzuführsystemen, wie z.B. kleinen unilamellaren Vesikeln, großen unilamellaren Vesikeln und multilamellaren Vesikeln, verabreichen. Liposomen können aus verschiedenen Phospholipiden, wie z.B.
- 10 Cholesterin, Stearylamin oder Phosphatidylcholinen, gebildet werden.

- Die erfindungsgemäßen festen Formen von anti-EGFR-Antikörpern und deren Varianten in präzipitierter, wiederaufgelöster oder suspendierter Form können auch mit löslichen Polymeren als zielgerichtete Arznei-
- 15 stoffträger gekoppelt werden. Solche Polymere können Polyvinylpyrrolidon, Pyran-Copolymer, Polyhydroxypropylmethacrylamidphenol, Polyhydroxyethylaspartamidphenol oder Polyethylenoxypolylysin, substituiert mit Palmitoylresten, umfassen. Weiterhin können die festen
- 20 Formen von anti-EGFR-Antikörpern an eine Klasse von biologisch abbaubaren Polymeren, die zur Erzielung einer kontrollierten Freisetzung eines Arzneistoffs geeignet sind, z.B. Polymilchsäure, Polyepsilon-Caprolacton, Polyhydroxybuttersäure, Polyorthoester, Polyacetale, Polydihydroxypyran, Polycyanoacrylate, Polymilchcoglykolsäure, Polymere wie Konjugate zwischen Dextran und Methacrylate,
- 25 Polyphosphoester, verschiedene Polysaccharide und Polyamine sowie Poly-epsilon-caprolacton, Albumin, Chitosan, Collagen oder modifizierte Gelatine und quervernetzte oder amphipatische Blockcopolymere von Hydrogelen, gekoppelt sein.

- 30 An die transdermale Verabreichung angepasste Arzneimittel können als eigenständige Pflaster für längeren, engen Kontakt mit der Epidermis des

Empfängers dargereicht werden. So kann beispielsweise der Wirkstoff aus dem Pflaster mittels Iontophorese zugeführt werden, wie in Pharmaceutical Research, 3(6), 318 (1986) allgemein beschrieben.

5 **An die topische Verabreichung angepasste Arzneimittel können als Salben, Cremes, Suspensionen, Lotionen, Pulver, Lösungen, Pasten, Gele, Sprays, Aerosole oder Öle formuliert sein.**

10 **Für Behandlungen des Auges oder anderer äußerer Gewebe, z.B. Mund und Haut, werden die Formulierungen vorzugsweise als topische Salbe oder Creme appliziert. Bei Formulierung zu einer Salbe kann der Wirkstoff entweder mit einer paraffinischen oder einer mit Wasser mischbaren Cremebasis eingesetzt werden. Alternativ kann der Wirkstoff zu einer Creme mit einer Öl-in-Wasser-Cremebasis oder einer Wasser-in-Öl-Basis**
15 **formuliert werden.**

Zu den an die topische Applikation am Auge angepassten Arzneimittel gehören Augentropfen, wobei der Wirkstoff in einem geeigneten Träger, insbesondere einem wässrigen Lösungsmittel, gelöst oder suspendiert ist.

20 **An die rektale Verabreichung angepasste Arzneimittel können in Form von Zäpfchen oder Einläufen dargereicht werden.**

25 **An die Verabreichung durch Inhalation angepasste Arzneimittel umfassen feinstpartikuläre Stäube oder Nebel, die mittels verschiedener Arten von unter Druck stehenden Dosierspendern mit Aerosolen, Verneblern oder Insufflatoren erzeugt werden können. Besonders bevorzugt im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind Pulver erfindungsgemäßer fester Formen von anti-EGFR-Antikörpern zur Applikation als Inhalat.**

30

An die vaginale Verabreichung angepasste Arzneimittel können als Pessare, Tampons, Cremes, Gele, Pasten, Schäume oder Sprayformulierungen dargereicht werden.

5 Es versteht sich, dass die erfindungsgemäßen Arzneimittel neben den obigen besonders erwähnten Bestandteilen andere im Fachgebiet übliche Mittel mit Bezug auf die jeweilige Art der pharmazeutischen Formulierung enthalten können.

10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind Sets (Kits) bestehend aus getrennten Packungen von

- a) einer wirksamen Menge eines Präzipitats und/oder eines Kristalls eines anti-EGFR-Antikörpers, bevorzugt eines monoklonalen anti-EGFR-Antikörpers, besonders bevorzugt von Mab C225 (Cetuximab) oder
15 Mab h425 (EMD 72000) und/oder deren Varianten oder Fragmenten in präzipitierter, wiederaufgelöster oder suspendierter Form, und
b) einer wirksamen Menge eines weiteren Arzneimittelwirkstoffs.

Das Set enthält geeignete Behälter, wie Schachteln oder Kartons,
20 individuelle Flaschen, Beutel oder Ampullen. Das Set kann z.B. separate Ampullen enthalten, in denen jeweils eine wirksame Menge einer erfindungsgemäßen festen Form, gegebenenfalls in wiederaufgelöster Form und einer wirksamen Menge eines weiteren Arzneimittelwirkstoffs gelöst oder in lyophilisierter Form vorliegt.

25 Eine therapeutisch wirksame Menge einer erfindungsgemäßen festen Form eines anti-EGFR-Antikörpers hängt von einer Reihe von Faktoren ab, einschließlich z.B. dem Alter und Gewicht, dem exakten Krankheitszustand, der der Behandlung bedarf, sowie seines
30 Schweregrads, der Beschaffenheit der Formulierung sowie dem Verabreichungsweg, und wird letztendlich von dem behandelnden Arzt bzw. Tierarzt festgelegt. Jedoch liegt eine wirksame Menge eines

erfindungsgemäßen anti-EGFR-Antikörper für die Behandlung von neoplastischem Wachstum, z.B. Dickdarm- oder Brustkarzinom, im allgemeinen im Bereich von 0,1 bis 100 mg/kg Körpergewicht des Empfängers (Säugers) pro Tag und besonders typisch im Bereich von 1 bis 10 mg/kg Körpergewicht pro Tag. Somit läge für einen 70 kg schweren erwachsenen Säuger die tatsächliche Menge pro Tag für gewöhnlich zwischen 70 und 700 mg, wobei diese Menge als Einzeldosis pro Tag oder üblicher in einer Reihe von Teildosen (wie z.B. zwei, drei, vier, fünf oder sechs) pro Tag gegeben werden kann, so dass die Gesamttagesdosis die gleiche ist. Die Bestimmung des geeigneten Antikörper-Titers erfolgt nach dem Fachmann bekannten Methoden. Die für die Verabreichung vorgesehene Dosierung ist im Allgemeinen ausreichend, um die gewünschte tumor-hemmende Wirkung zu erzielen. Die Dosierung sollte jedoch auch möglichst gering gewählt werden, so dass keine Nebenwirkungen, wie unerwünschte Kreuzreaktionen, anaphylaktische Reaktionen o.ä. auftreten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung erfindungsgemäßer fester Formen zur Herstellung eines Medikaments, welches den biologisch aktiven Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente in präzipitierter nicht-kristalliner, präzipitierter kristalliner oder in gelöster oder suspendierter Form enthält.

Erfindungsgemäße Medikamente können insbesondere zur Prophylaxe und/oder zur Behandlung von Krankheiten und Krankheitszuständen verwendet werden. Gegenstand der Erfindung ist deshalb die Verwendung von erfindungsgemäßen festen Formen von anti-EGFR-Antikörpern, bevorzugt von monoklonalen anti-EGFR-Antikörpern, besonders bevorzugt von Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD 72000) und/oder deren Varianten oder Fragmenten in präzipitierter, wiederaufgelöster oder suspendierter Form zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten.

In verschiedenen In vitro und in vivo Studien konnte gezeigt werden, dass die Blockade des EGFR durch Antikörper auf unterschiedlichen Ebenen gegen Tumore, beispielsweise durch Hemmung der Krebszellproliferation, Verringerung der tumorvermittelten Angiogenese, Induktion der Krebszell-
5 apoptose und Verstärkung der toxischen Wirkungen der Strahlentherapie und der herkömmlichen Chemotherapie.

Arzneimittel enthaltend feste Formen der erfindungsgemäßen Antikörper in
10 wiederaufgelöster oder suspendierter Form können EGFR wirksam regulieren, modulieren oder hemmen und können deshalb zur Vorbeugung und/oder Behandlung von Erkrankungen im Zusammenhang mit unregulierter oder gestörter EGFR-Aktivität eingesetzt werden. Insbesondere lassen sich die erfindungsgemäßen festen Formen von anti-
15 EGFR-Antikörpern deshalb bei der Behandlung gewisser Krebsformen einsetzen, sowie bei durch pathologische Angiogenese bedingten Erkrankungen wie diabetische Retinopathie oder Entzündungen.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb die Verwendung von
20 erfindungsgemäßen festen Formen in präzipitierter, wiederaufgelöster oder resuspendierter Form zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, die durch EGFR und/oder durch EGFR-vermittelte Signaltransduktion verursacht, vermittelt und/oder propagiert werden.

25 Erfindungsgemäße Arzneimittel eignen sich besonders zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krebs, einschließlich solider Karzinome, wie zum Beispiel Karzinome (z. B. der Lungen, des Pankreas, der Schilddrüse, der Harnblase oder des Kolons), myeloische Erkrankungen (z. B. myeloische
30 Leukämie) oder Adenome (z. B. villöses Kolonadenom), pathologische Angiogenese und metastatische Zellmigration. Die Arzneimittel sind ferner nützlich bei der Behandlung der Komplementaktivierungs-abhängigen

chronischen Entzündung (Niculescu et al. (2002) Immunol. Res., 24:191-199) und durch HIV-1 (Human Immunodeficiency Virus Typ 1) induzierte Immunschwäche (Popik et al. (1998) J Virol, 72: 6406-6413).

5 Außerdem eignen sich die vorliegenden Arzneimittel als pharmazeutische Wirkstoffe für Säugetiere, insbesondere für den Menschen, bei der Behandlung von EGFR-bedingten Krankheiten. Der Ausdruck „EGFR-bedingte Krankheiten“ bezieht sich auf pathologische Zustände, die von der EGFR-Aktivität abhängig sind. EGFR ist entweder direkt oder indirekt
10 an den Signaltransduktionswegen verschiedener Zellaktivitäten, darunter Proliferation, Adhäsion und Migration sowie Differenzierung beteiligt. Zu den Krankheiten, die mit EGFR-Aktivität assoziiert sind, zählen die Proliferation von Tumorzellen, die pathologische Gefäßneubildung, die das Wachstum fester Tumore fördert, Gefäßneubildung im Auge (diabetische
15 Retinopathie, altersbedingte Makula-Degeneration und dergleichen) sowie Entzündung (Schuppenflechte, rheumatoide Arthritis und dergleichen).

Gewöhnlich werden die hier besprochenen Erkrankungen in zwei Gruppen eingeteilt, in hyperproliferative und nicht-hyperproliferative Erkrankungen.
20 In diesem Zusammenhang werden Psoriasis, Arthritis, Entzündungen, Endometriose, Vernarbung, gutartige Prostatahyperplasie, immunologische Krankheiten, Autoimmunkrankheiten und Immunschwächekrankheiten als nicht-krebsartige Krankheiten angesehen, von denen Arthritis, Entzündung, immunologische Krankheiten, Autoimmunkrankheiten und
25 Immunschwächekrankheiten gewöhnlich als nicht-hyperproliferative Erkrankungen angesehen werden.

In diesem Zusammenhang sind Hirnkrebs, Lungenkrebs, Plattenepithelkrebs, Blasenkrebs, Magenkrebs, Pankreaskrebs, Leberkrebs, Nierenkrebs, Kolorektalkrebs, Brustkrebs, Kopfkrebs, Halskrebs, Ösophaguskrebs, gynäkologischer Krebs, Schilddrüsenkrebs, Lymphome, chronische Leukämie und akute Leukämie als krebsartige Erkrankungen anzusehen,
30

die alle gewöhnlich zur Gruppe der hyperproliferativen Erkrankungen gezählt werden. Insbesondere krebsartiges Zellwachstum und insbesondere durch EGFR direkt oder indirekt vermitteltes krebsartiges Zellwachstum ist eine Erkrankung, die ein Ziel der vorliegenden Erfindung darstellt.

Es kann gezeigt werden, dass die erfindungsgemäßen Arzneimittel in einem Xenotransplantat-Tumor-Modell eine in vivo antiproliferative Wirkung aufweisen. Die erfindungsgemäßen Arzneimittel werden an einen Patienten mit einer hyperproliferativen Erkrankung verabreicht, z. B. zur Inhibition des Tumorwachstums, zur Verminderung der mit einer lymphoproliferativen Erkrankung einhergehenden Entzündung, zur Inhibition der Transplantatabstoßung oder neurologischer Schädigung aufgrund von Gewebereparatur usw. Die vorliegenden Arzneimittel sind nützlich für prophylaktische oder therapeutische Zwecke. Wie hierin verwendet, wird der Begriff „behandeln“ als Bezugnahme sowohl auf die Verhinderung von Krankheiten als auch die Behandlung vorbestehender Leiden verwendet. Die Verhinderung von Proliferation wird durch Verabreichung der erfindungsgemäßen Arzneimittel vor Entwicklung der evidenten Krankheit, z. B. zur Verhinderung des Tumorwachstums, Verhinderung metastatischen Wachstums, der Herabsetzung von mit kardiovaskulärer Chirurgie einhergehenden Restenosen usw. erreicht. Als Alternative werden die Arzneimittel zur Behandlung andauernder Krankheiten durch Stabilisation oder Verbesserung der klinischen Symptome des Patienten verwendet.

Der Wirt oder Patient kann jeglicher Säugerspezies angehören, z. B. einer Primatenspezies, besonders Menschen; Nagetieren, einschließlich Mäusen, Ratten und Hamstern; Kaninchen; Pferden, Rindern, Hunden, Katzen usw. Tiermodelle sind für experimentelle Untersuchungen von Interesse, wobei sie ein Modell zur Behandlung einer Krankheit des Menschen zur Verfügung stellen.

Die Empfänglichkeit einer bestimmten Zelle gegenüber der Behandlung mit den erfindungsgemäßen Arzneimitteln kann durch in vitro-Tests bestimmt werden. Typischerweise wird eine Kultur der Zelle mit einem
5 erfindungsgemäßen Arzneimittel bei verschiedenen Konzentrationen für eine Zeitdauer inkubiert, die ausreicht, um den Wirkstoffen zu ermöglichen, Zelltod zu induzieren oder Migration zu inhibieren, gewöhnlich zwischen ungefähr einer Stunde und einer Woche. Zu in vitro-Tests können kultivierte Zellen aus einer Biopsieprobe verwendet werden. Die
10 nach der Behandlung zurückbleibenden lebensfähigen Zellen werden dann gezählt.

Die Dosis variiert abhängig von den verwendeten spezifischen Arzneimitteln, der spezifischen Erkrankung, dem Patientenstatus usw..
15 Typischerweise ist eine therapeutische Dosis ausreichend, um die unerwünschte Zellpopulation im Zielgewebe erheblich zu vermindern, während die Lebensfähigkeit des Patienten aufrechterhalten wird. Die Behandlung wird im Allgemeinen fortgesetzt, bis eine erhebliche Reduktion vorliegt, z. B. mindestens ca. 50 % Verminderung der spezifischen Zellzahl
20 und kann fortgesetzt werden, bis im Wesentlichen keine unerwünschten Zellen mehr im Körper nachgewiesen werden.

Zur Identifikation von EGFR-Inhibitoren stehen verschiedene Assay-Systeme zur Verfügung. Beim Scintillation-Proximity-Assay (Sorg et al., J.
25 of. Biomolecular Screening, 2002, 7, 11-19) und dem FlashPlate-Assay wird die radioaktive Phosphorylierung eines Proteins oder Peptids als Substrat mit γ ATP gemessen. Bei Vorliegen einer inhibitorischen Verbindung ist kein oder ein vermindertes radioaktives Signal nachweisbar. Ferner sind die Homogeneous Time-resolved Fluorescence Resonance
30 Energy Transfer- (HTR-FRET-) und Fluoreszenzpolarisations- (FP-)

88

Technologien als Assay-Verfahren nützlich (Sills et al., J. of Biomolecular Screening, 2002, 191-214).

Andere nicht radioaktive ELISA-Assay-Verfahren verwenden spezifische Phospho-Antikörper (Phospho-AK). Der Phospho-AK bindet nur das phosphorylierte Substrat. Diese Bindung ist mit einem zweiten Peroxidase-konjugierten Anti-Schaf-Antikörper durch Chemilumineszenz nachweisbar (Ross et al., 2002, Biochem. J., unmittelbar vor der Veröffentlichung, Manuskript BJ20020786).

Es gibt viele mit einer Deregulation der Zellproliferation und des Zelltods (Apoptose) einhergehende Erkrankungen und Krankheitszustände. Die Erkrankungen und Krankheitszustände, die durch erfindungsgemäße Arzneimittel behandelt, verhindert oder gelindert werden können umfassen die nachfolgend aufgeführten Erkrankungen und Krankheitszustände, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Die erfindungsgemäßen Arzneimittel sind nützlich bei der Behandlung und/oder Prophylaxe einer Reihe verschiedener Erkrankungen und Krankheitszustände, bei denen Proliferation und/oder Migration glatter Muskelzellen und/oder Entzündungszellen in die Intimaschicht eines Gefäßes vorliegt, resultierend in eingeschränkter Durchblutung dieses Gefäßes, z. B. bei neointimalen okklusiven Läsionen. Zu okklusiven Transplantat-Gefäßerkrankungen von Interesse zählen Atherosklerose, koronare Gefäßerkrankung nach Transplantation, Venentransplantatstenose, peri-anastomotische Prothesenrestenose, Restenose nach Angioplastie oder Stent-Platzierung und dergleichen.

Die vorliegende Erfindung umfasst die Verwendung der erfindungsgemäßen Arzneimittel zur Behandlung oder Vorbeugung von Krebs. Ein besonders bevorzugter Gegenstand der Erfindung ist deshalb die Verwendung erfindungsgemäßer fester Formen von anti-EGFR-Antikörpern zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Tumoren und/oder Tumormetastasen, wobei der Tumor besonders bevorzugt aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus

Gehirntumor, Tumor des Urogenitaltrakts, Tumor des lymphatischen Systems, Magentumor, Kehlkopftumor, Monozytenleukämie, Lungenadenokarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Glioblastom und Brustkarzinom, ohne darauf beschränkt zu sein.

5

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von erfindungsgemäßen Arzneimittel zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Krankheiten, ausgewählt aus der Gruppe der krebsartigen Erkrankungen bestehend aus Plattenepithelkrebs, Blasenkrebs, Magenkrebs, Leberkrebs, Nierenkrebs, Kolorektalkrebs, Brustkrebs, Kopfkrebs, Halskrebs, Ösophaguskrebs, gynäkologischem Krebs, Schilddrüsenkrebs, Lymphom, chronischer Leukämie und akuter Leukämie.

10

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel können an Patienten zur Behandlung von Krebs verabreicht werden. Die vorliegenden Arzneimittel hemmen die Tumorangio-genese und beeinflussen so das Wachstum von Tumoren (J. Rak et al. Cancer Research, 55:4575-4580, 1995). Die angiogenesehemmenden Eigenschaften der erfindungsgemäßen Arzneimittel eignen sich auch zur Behandlung bestimmter Formen von Blindheit, die mit Retina-Gefäßneubildung in Zusammenhang stehen.

15

20

Gegenstand der Erfindung ist deshalb außerdem die Verwendung erfindungsgemäßer fester Formen von anti-EGFR-Antikörpern in präzipitierter, wiederaufgelöster oder suspendierter Form zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, die durch Angiogenese verursacht, vermittelt und/oder propagiert werden.

25

Eine derartige Krankheit, an der Angiogenese beteiligt ist, ist eine Augenkrankheit, wie Retina-Vaskularisierung, diabetische Retinopathie, altersbedingte Makula-Degeneration und dergleichen.

30

Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung von erfindungsgemäßen festen Formen von anti-EGFR-Antikörpern in präzipitierter, wiederaufgelöster oder suspendierter Form zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Retina-Vaskularisierung, diabetischer Retinopathie, altersbedingter Makula-Degeneration und/oder Entzündungskrankheiten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von erfindungsgemäßen Arzneimitteln zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Psoriasis, rheumatoide Arthritis, Kontaktdermatitis, Spät-Typ der Überempfindlichkeitsreaktion, Entzündungen, Endometriose, Vernarbung, gutartiger Prostatahyperplasie, Immunologischer Krankheiten, Autoimmunkrankheiten und Immunschwächekrankheiten.

Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung von erfindungsgemäßen Arzneimitteln zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Knochen-Pathologien, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Osteosarkom, Osteoarthritis und Rachitis.

Weiterhin können die erfindungsgemäße Arzneimittel verwendet werden, um bei gewissen existierenden Krebschemotherapien und -bestrahlungen additive oder synergistische Effekte bereitzustellen, und/oder können dazu verwendet werden, um die Wirksamkeit gewisser existierender Krebschemotherapien und -bestrahlungen wiederherzustellen.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung von erfindungsgemäßen festen Formen von anti-EGFR-Antikörpern in präzipitierter, wiederaufgelöster oder suspendierter Form zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, wobei eine therapeutisch wirksame Menge einer erfindungsgemäßen

festen Form in präzipitierter, wiederaufgelöster oder suspendierter Form in Kombination mit einer Verbindung aus der Gruppe 1) Östrogenrezeptormodulator, 2) Androgenrezeptormodulator, 3) Retinoidrezeptormodulator, 4) Zytotoxikum, 5) antiproliferatives Mittel, 6) Prenyl-Proteintransferaseinhibitoren, 7) HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, 8) HIV-Proteaseinhibitoren, 9) Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, 10) Wachstumsfaktorrezeptor-Inhibitoren sowie 11) Angiogenese-Inhibitoren verabreicht wird.

Gegenstand der Erfindung ist deshalb auch die Verwendung von erfindungsgemäßen festen Formen von anti-EGFR-Antikörpern in präzipitierter, wiederaufgelöster oder suspendierter Form zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Krankheiten, wobei eine therapeutisch wirksame Menge einer erfindungsgemäßen festen Form in präzipitierter, wiederaufgelöster oder suspendierter Form in Kombination mit Radiotherapie und einer Verbindung aus der Gruppe 1) Östrogenrezeptormodulator, 2) Androgenrezeptormodulator, 3) Retinoidrezeptormodulator, 4) Zytotoxikum, 5) antiproliferatives Mittel, 6) Prenyl-Proteintransferaseinhibitoren, 7) HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, 8) HIV-Proteaseinhibitoren, 9) Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, 10) Wachstumsfaktorrezeptor-Inhibitoren sowie 11) Angiogenese-Inhibitoren verabreicht wird.

Die erfindungsgemäßen Arzneimittel können so auch gemeinsam mit anderen gut bekannten Therapeutika, die aufgrund ihrer jeweiligen Eignung für das behandelte Leiden ausgewählt werden, verabreicht werden. So wären zum Beispiel bei Knochenleiden Kombinationen günstig, die antiresorptiv wirkende Bisphosphonate, wie Alendronat und Risedronat, Integrinblocker (wie sie weiter unten definiert werden), wie $\alpha\beta 3$ -Antagonisten, bei der Hormontherapie verwendete konjugierte Östrogene wie Prempro®, Premarin® und Endometrin®; selektive Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs) wie Raloxifen, Droloxifen, CP-

336,156 (Pfizer) und Lasofoxifen, Kathepsin-K-Inhibitoren und ATP-Protonenpumpeninhibitoren enthalten.

Die vorliegenden Arzneimittel eignen sich auch zur Kombination mit bekannten Antikrebsmitteln. Zu diesen bekannten Antikrebsmitteln zählen

5 die folgenden: Östrogenrezeptormodulatoren, Androgenrezeptormodulatoren, Retinoidrezeptormodulatoren, Zytotoxika, antiproliferative Mittel, Prenyl-Proteintransferaseinhibitoren, HMG-CoA-Reduktase-Inhibitoren, HIV-Protease-Inhibitoren, Reverse-Transkriptase-Inhibitoren, Wachstumsfaktor-Inhibitoren sowie Angiogeneseinhibitoren. Die
10 vorliegenden Verbindungen eignen sich insbesondere zur gemeinsamen Anwendung mit Radiotherapie.

„Östrogenrezeptormodulatoren“ bezieht sich auf Verbindungen, die die Bindung von Östrogen an den Rezeptor stören oder diese hemmen, und zwar unabhängig davon, wie dies geschieht. Zu den Östrogenrezeptormodulatoren zählen zum Beispiel Tamoxifen, Raloxifen, Idoxifen,
15 LY353381, LY 117081, Toremifen, Fulvestrant, 4-[7-(2,2-Dimethyl-1-oxopropoxy-4-methyl-2-[4-[2-(1-piperidinyl)ethoxy]phenyl]-2H-1-benzopyran-3-yl]phenyl-2,2-dimethylpropanoat, 4,4'-Dihydroxybenzophenon-2,4-dinitrophenylhydrazon und SH646, was jedoch keine
20 Einschränkung darstellen soll.

„Androgenrezeptormodulatoren“ bezieht sich auf Verbindungen, die die Bindung von Androgenen an den Rezeptor stören oder diese hemmen, und zwar unabhängig davon, wie dies geschieht. Zu den Androgenrezeptormodulatoren zählen zum Beispiel Finasterid und andere 5 α -
25 Reduktase-Inhibitoren, Nilutamid, Flutamid, Bicalutamid, Liarozol und Abirateron-acetat.

„Retinoidrezeptormodulatoren“ bezieht sich auf Verbindungen, die die Bindung von Retinoiden an den Rezeptor stören oder diese hemmen, und zwar unabhängig davon, wie dies geschieht. Zu solchen Retinoidrezeptormodulatoren zählen zum Beispiel Bexaroten, Tretinoin, 13-cis-Retinsäure,
30 9-cis-Retinsäure, α -Difluormethylomithin, ILX23-7553, trans-N-(4'-Hydroxyphenyl)retinamid und N-4-Carboxyphenylretinamid.

„Zytotoxika“ bezieht sich auf Verbindungen, die in erster Linie durch direkte
Einwirkung auf die Zellfunktion zum Zelltod führen oder die die Zellmyose
hemmen oder diese stören, darunter Alkylierungsmittel, Tumornekrose-
faktoren, interkalierende Mittel, Mikrotubulin-Inhibitoren und Topoisomerase-Inhibitoren.

5

Zu den Zytotoxika zählen zum Beispiel Tirapazimin, Sertanef, Cachectin,
Ifosfamid, Tasonermin, Lonidamin, Carboplatin, Altretamin, Prednimustin,
Dibromdulcit, Ranimustin, Fotemustin, Nedaplatin, Oxaliplatin, Temozolomid,
Heptaplatin, Estramustin, Improsulfan-tosylat, Trofosfamid, Nimustin,
10 Dibrospidium-chlorid; Pumitepa, Lobaplatin, Satraplatin, Proflomycin,
Cisplatin, Irofulven, Dexifosfamid, cis-Amindichlor(2-methylpyridin)platin,
Benzylguanin, Glufosfamid, GPX100, (trans,trans,trans)-bis-mu-(hexan-
1,6-diamin)-mu-[diamin-platin(II)]bis[diamin(chlor)platin(II)]-tetrachlorid,
Diazidinylspermin, Arsentrioxid, 1-(11-Dodecylamino-10-hydroxyundecyl)-
15 3,7-dimethyloxanthin, Zorubicin, Idarubicin, Daunorubicin, Bisanren,
Mitoxantron, Pirarubicin, Pinafid, Valrubicin, Amrubicin, Antineoplaston, 3'-
Desamino-3'-morpholino-13-desoxo-10-hydroxycarminomycin, Annamycin,
Galarubicin, Ellnafid, MEN10755 und 4-Desmethoxy-3-desamino-3-
aziridinyl-4-methylsulfonyldaunorubicin (siehe WO 00/50032), was jedoch
20 keine Einschränkung darstellen soll.

20

Zu den Mikrotubulin-Inhibitoren zählen zum Beispiel Paclitaxel, Vindesin-
sulfat, 3',4'-Dideshydro-4'-desoxy-8'-norvincal leukoblastin, Docetaxol,
Rhizoxin, Dolastatin, Mivobullin-isethionat, Auristatin, Cemadotin,
RPR109881, BMS184476, Vinflunin, Cryptophycin, 2,3,4,5,6-pentafluor-N-
25 (3-fluor-4-methoxyphenyl)benzolsulfonamid, Anhydrovinblastin, N,N-
dimethyl-L-valyl-L-valyl-N-methyl-L-valyl-L-prolyl-L-prolin-t-butylamid,
TDX258 und BMS188797.

25

Topoisomerase-Inhibitoren sind zum Beispiel Topotecan, Hycaptamin,
Irinotecan, Rubitecan, 6-Ethoxypropionyl-3',4'-O-exo-benzyliden-
30 chartreusin, 9-Methoxy-N,N-dimethyl-5-nitropyrazolo[3,4,5-k]acridin-2-
(6H)propanamin, 1-Amino-8-ethyl-5-fluor-2,3-dihydro-9-hydroxy-4-methyl-
1H,12H-benzo[de]pyrano[3',4':b,7]indolizino[1,2b]chinolin-10,13(9H,15H)-

30

- dion, Lurtotecarin, 7-[2-(N-Isopropylamino)ethyl]-(20S)camptothecin, BNP1350, BNP11100, BN80915, BN80942, Etoposid-phosphat, Teniposid, Sobuzoxan, 2'-Dimethylamino-2'-desoxy-etoposid, GL331, N-[2-(Dimethylamino)ethyl]-9-hydroxy-5,6-dimethyl-6H-pyrido[4,3-b]carbazol-1-carboxamid, Asulacrin, (5a,5aB,8aa,9b)-9-[2-[N-[2-(Dimethylamino)ethyl]-N-methylamino]ethyl]-5-[4-hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl]-5,5a,6,8,8a,9-hexahydrofuro(3',4':6,7)naphtho(2,3-d)-1,3-dioxol-6-on, 2,3-(Methylenedioxy)-5-methyl-7-hydroxy-8-methoxybenzo[c]phenanthridinium, 6,9-Bis[(2-aminoethyl)amino]benzo[g]isochinolin-5,10-dion, 5-(3-Aminopropylamino)-7,10-dihydroxy-2-(2-hydroxyethylaminomethyl)-6H-pyrazolo[4,5,1-de]acridin-8-on, N-[1-[2-(Diethylamino)ethylamino]-7-methoxy-9-oxo-9H-thioxanthen-4-ylmethyl]formamid, N-(2-(Dimethylamino)-ethyl)acridin-4-carboxamid, 6-[[2-(Dimethylamino)-ethyl]amino]-3-hydroxy-7H-indeno[2,1-c]chinolin-7-on und Dimesna.
- Zu den „antiproliferativen Mitteln“ zählen Antisense-RNA- und -DNA-Oligonucleotide wie G3139, ODN698, RVASKRAS, GEM231 und INX3001, sowie Antimetaboliten wie Enocitabin, Carmofur, Tegafur, Pentostatin, Doxifluridin, Trimetrexat, Fludarabin, Capecitabin, Galocitabin, Cytarabin-ocfosfat, Fostecabin-Natriumhydrat, Raltitrexed, Palitrexed, Ermiterfur, Tiazofuridin, Decitabin, Nolatrexed, Pemetrexed, Nelzarabin, 2'-Desoxy-2'-methylidencytidin, 2'-Fluormethylen-2'-desoxycytidin, N-[5-(2,3-Dihydrobenzofuryl)sulfonyl]-N'-(3,4-dichlorphenyl)harnstoff, N6-[4-Desoxy-4-[N2-[2(E),4(E)-tetradecadienoyl]glycylamino]-L-glycero-B-L-mannoheptopyranosyl]adenin, Aplidin, Ecteinascidin, Troxacitabine, 4-[2-Amino-4-oxo-4,6,7,8-tetrahydro-3H-pyrimidino[5,4-b][1,4]thiazin-8-yl-(S)-ethyl]-2,5-thienoyl-L-glutaminsäure, Aminopterin, 5-Fluorouracil, Alanosin, 11-Acetyl-8-(carbamoyloxymethyl)-4-formyl-6-methoxy-14-oxa-1,11-diazatetracyclo(7.4.1.0.0)-tetradeca-2,4,6-trien-9-yllessigsäureester, Swainsonin, Lometrexol, Dexrazoxan, Methioninase, 2'-cyan-2'-desoxy-N4-palmitoyl-1-B-D-Arabinofuranosylcytosin und 3-Aminopyridin-2-carboxaldehydthiosemicarbazon. Die „antiproliferativen Mittel“ beinhalten auch andere monoklonale Antikörper gegen Wachstumsfaktoren als bereits unter den

„Angiogenese-Inhibitoren“ angeführt wurden, wie Trastuzumab, sowie Tumorsuppressorgene, wie p53, die über rekombinanten virusvermittelten Gentransfer abgegeben werden können (siehe z.B. US-Patent Nr. 6,069,134). Erfindungsgemäße Arzneimittel können auch in Kombination mit allen weiteren dem Fachmann bekannten therapeutischen Antikörpern oder im Zusammenhang mit obengenannter Krankheiten geeigneten pharmazeutischen Wirkstoffen verabreicht werden.

Weiterhin können erfindungsgemäße feste Formen erfindungsgemäßer Antikörper in präzipitierter, wiederaufgelöster oder suspendierter Form zur Isolierung und zur Untersuchung der Aktivität oder Expression von EGFR verwendet werden. Außerdem eignen sie sich insbesondere zur Verwendung in diagnostischen Verfahren zu Erkrankungen im Zusammenhang mit unregulierter oder gestörter EGFR-Aktivität. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist deshalb die Verwendung von erfindungsgemäßen festen Formen von anti-EGFR-Antikörpern in präzipitierter, wiederaufgelöster oder suspendierter Form als Aktivatoren oder Inhibitoren von EGFR, besonders bevorzugt als Inhibitoren von EGFR.

Für diagnostische Zwecke können erfindungsgemäße Antikörper beispielsweise radioaktiv markiert werden. Ein bevorzugtes Markierungsverfahren ist die Iodogen-Methode (Fraker et al., 1978). Für diagnostische Zwecke wird der Antikörper besonders bevorzugt als F(ab')₂ Fragment verwendet. Dadurch werden hervorragende Ergebnisse erzielt, so dass keine Hintergrund-Subtraktion notwendig ist. Solche Fragmente können nach bekannten Methoden hergestellt werden (e.g., Hertyn et al., 1983). Im Allgemeinen wird ein Pepsin-Verdau in bei saurem pH-Wert durchgeführt und die Fragmente durch Protein A-SepharoseTM Chromatographie von unverdaulichem IgG und Fragmenten schwerer Ketten getrennt.

Die erfindungsgemäßen Präzipitate und/oder Kristalle zeigen bevorzugt eine vorteilhafte biologische Aktivität, die in Enzym-Assays, wie in den

Beispielen beschrieben, leicht nachweisbar ist. In derartigen auf Enzymen basierenden Assays zeigen und bewirken die erfindungsgemäßen Antikörper bevorzugt einen inhibierenden Effekt, der gewöhnlich durch IC_{50} -Werte in einem geeigneten Bereich, bevorzugt im mikromolaren Bereich und bevorzugt im nanomolaren Bereich dokumentiert wird.

Nachweismethoden:

In Bezug auf Nachweismethoden umfasst die vorliegende Erfindung alle dem Fachmann oder aus der Literatur bekannten Nachweismethoden.

10

Kristalline Strukturen lassen sich beispielsweise anhand von Beugungsspektren in der Röntgendiffraktionsmessung nachweisen. Insbesondere lassen sich kristalline Strukturen erfindungsgemäßer Antikörper durch mikroskopische Untersuchungen unter Verwendung von Polarisationsfiltern nachweisen. Weitere Nachweismethoden umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, elektronenmikroskopische Aufnahmen.

15

Nachweise von Proteingröße, struktureller Integrität, Reinheit oder Glykosylierungsmuster der erfindungsgemäßen festen Formen in präzipitierter, wiederaufgelöster oder resuspendierter Form umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, SE-HPLC, Peptid-Mapping (Verdau), N-terminale Sequenzierung, SDS-Page, Tris-Glycin-Gradient-Gel (nicht-reduzierend), FTIR-Methode (Fourier transform infrared spectra), CD (circular dichroism), RAMAN Spektroskopie, Kohlenhydratfärbung (PAS-Methode), Oligosaccharid-Profilierung, Bestimmung der Monosaccharid-Zusammensetzung oder isoelektrische Fokussierung.

20

25

Die Stabilität erfindungsgemäßer fester Formen oder Formulierungen lässt sich beispielsweise, ohne darauf beschränkt zu sein, mithilfe von Stabilitätsprogrammen bestimmen, z.B. einer Lagerung bei 25°C und 60% relativer Luftfeuchte und bei 40°C und 70% relativer Luftfeuchte über einen längeren Zeitraum hinweg und Bestimmung der Stabilität oder

30

strukturellen Integrität des Proteins in regelmäßigen Intervallen beispielsweise durch obengenannte Nachweismethoden (SE-HPLC, FT-IR; SDS-PAGE (reduzierend oder nicht-reduzierend)) nachweisen.

5 Nachweismethoden zur biologischen Aktivität oder Wirksamkeit erfindungsgemäßer fester Formen in präzipitierter kristalliner, präzipitierter nicht-kristalliner, gelöster oder suspendierter Form umfassen beispielsweise, ohne darauf beschränkt zu sein, ELISA, biologische Zellassays, FTIR oder CD.

10 Nachweismethoden verminderter Aggregationstendenz erfindungsgemäßer fester Formen in präzipitierter kristalliner, präzipitierter nicht-kristalliner, gelöster oder suspendierter Form und damit der Möglichkeit hochkonzentrierte Formulierungen herzustellen, der Kristall- oder Präzipitatgröße umfassen beispielsweise, ohne darauf beschränkt zu
15 sein, visuelle Kontrolle, Sub-visible particles Analyse, Nephelometrie oder Turbidimetrie, Dynamic Light Scattering Characterization.

20 Vor- und nachstehend sind alle Temperaturen in °C angegeben. In den nachfolgenden Beispielen bedeutet "übliche Aufarbeitung": Man gibt, falls erforderlich, Wasser hinzu und stellt, falls erforderlich, je nach Konstitution des Endprodukts auf pH-Werte zwischen 2 und 10 ein.

25 **Beispiel 1: Erfindungsgemäß verwendbare Agenzien und Präzipitations- und/oder Kristallisationsbedingungen**

In nachfolgender Aufstellung sind jeweils alle denkbaren, dem Fachmann bekannten Hydrate, verwandten Salze und Derivate der genannten Verbindungen umfasst.

30 1. **Präzipitationsreagenzien:**

1.1 Salze:

z.B. Natriumacetat Trihydrat, Kaliumchlorid, Natriumchlorid, tri-Natriumcitrat Dihydrat, di-Kaliumhydrogenphosphat, di-Natriumhydrogenphosphat Dihydrat, Ammoniumsulfat, Ammoniumacetat, Ammoniumbromid, Ammoniumchlorid, tri-Ammoniumcitrat, di-Ammoniumhydrogencitrat, Ammoniumdihydrogenphosphat, di-Ammoniumhydrogenphosphat, di-Ammoniumtartrat, Citronensäure Monohydrat, Imidazol, Kaliumacetat, Kaliumbromid, tri-Kaliumcitrat Monohydrat, Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumsulfat, Magnesiumacetat Tetrahydrat, Magnesiumbromid Hexahydrat, Magnesiumchlorid Hexahydrat, Magnesiumsulfat Heptahydrat, Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, Natriumsulfat Decahydrat, Prolin, Succinsäure, Zinkacetat Dihydrat, Zinksulfat Heptahydrat

1.2 Polymere:

z.B. Polyethylenglykol (PEG):
Cyclodextrine, Dextran, Natriumcarboxymethylcellulose (Na-CMC), Poloxamer, Polyacrylsäure, Polyethylenglykolmonomethylether (mPEG), Polypropylenglykol (PPG), Polyvinylalkohol (PVA), Polyvinylpyrrolidon (PVP)

1.3 Organische Lösungsmittel:

z.B. Ethanol, Glycerol

2. Hilfestoffe:

z.B. Viskositätsändernde Stoffe, Detergenzien (z.B. Tween®, Solutol® HS 15, Pluronic®, Cremophor® EL, Avacel® 20, Polyoxyethylensorbitanmonooleat), Reduktionsmittel (Glutathion, 2-Mercaptoethanol, Dithiothreitol), Komplexbildner (EDTA, EGTA)

3. Puffer:

z.B. Phosphatpuffer: Na- (oder K-)Phosphat; auch mit Zusatz von Isotisierungsmittel (z.B. Na-(oder K-)Cl), möglicher pH ca 6,0 – 8,2

Citrat-Puffer: Na-Citrat oder Citronensäure, möglicher pH ca 2,2 – 6,5;
auch mit Zusatz von Isotonisierungsmitteln (z.B. NaCl); auch andere Salze
sind zur Isotonisierung denkbar.

Succinat-Puffer: pH ca 4,8 – 6,3

5 Acetat-Puffer : Natriumacetat, pH ca 2,5 – 6.

Histidin-Puffer: pH ca 6,0 – 7,8

Glutaminsäure: pH 8,0 bis 10,2

Glycin (N,N-bis(2-Hydroxyethyl)glycin): pH ca. 8,6 bis 10,6

Glycinat-Puffer: pH ca 6,5 – 7,5

10 Imidazol: pH 6,2 bis 7,8

Kalliumchlorid: pH ca. 1,0 bis 2,2

Lactat-Puffer: pH ca 3,0 – 6,0

Maleat-Puffer: pH ca 2,5 – 5,0

Tartrat-Puffer: pH ca 3,0 – 5,0

15 Tris: pH ca 6,8 – 7,7

Phosphat-Citrat-Puffer

4. pH Bereich:

Der theoretisch denkbare pH-Wert ist pH 4 – 10, bevorzugt ist pH 5 - 9

20

5. Temperaturbereich:

Der theoretisch denkbare Temperaturbereich ist die Temperatur von -10°C
bis 40°C; bevorzugt 0 – 25°C, besonders bevorzugt 4°C und 20°C.

25

6. Stabilisatoren:

6.1 Aminosäuren:

z.B. Arginin, Ornithin, Lysin, Histidin, Glutaminsäure, Asparaginsäure,
Isoleucin, Leucin, Alanin, Phenylalanin, Tyrosin, Tryptophan, Methionin,
30 Serin, Prolin

6.2 Zucker und Zuckeralkohole:

z.B. Saccharose, Lactose, Glucose, Mannose, Maltose, Galactose, Fructose, Sorbose, Raffinose, Trehalose, Glucosamin, N-Methylglucosamin, Galactosamin, Neuraminsäure

5 **6.3 Antioxidantien:**

z.B. Acetone sodium bisulfite, Ascorbinsäure, Ascorbinsäureester, Butylhydroxyanisol (BHA), Butylhydroxytoluen (BHT), Cystein, Nordihydroguaiaretinsäure (NDGA), Monothioglycerol, Sodlumbisulfit, Sodiummetabisulfit, Tocopherole, Glutathion

10

6.4 Konservierungsmittel:

z.B. m-cresol, Chlorocresol, Phenol, Benzylalcohol, Methylparaben, Propylparaben, Butylparaben, Chlorbutanol, Phenylmercurinitrat, Phenylmercuriacetat, Thimersal, Benzalkoniumchlorid, Benzethoniumchlorid

15

6.5 Cyclodextrine

z.B. Hydroxypropyl- β -cyclodextrin, Sulfobutylethyl- β -cyclodextrin, γ -Cyclodextrin, α -Cyclodextrin

20

6.6 Albumine:

z.B. Humanes Serum Albumin (HSA), Bovines Serum Albumin (BSA)

6.7 Polyhydric Alkohole:

25

z.B. Glycerol, Ethanol, Mannitol

6.8 Salze:

z.B. Acetat-Salze (z.B. Natriumacetat), Magnesiumchlorid, Calciumchlorid, Tromethamine, EDTA (z.B. Na-EDTA)

30

7. Isotonisierungsmittel:

68

z.B. Natriumchlorid, Kaliumchlorid, Glucose, Glycerin, Dextrose,
Natriumchlorid, Natriumsulfat

Beispiel 2: Kristallisation von Erbitux™ mit Ammoniumsulfat

- 5 500µL Protein (20 mg/mL in 10mM Phosphat, pH 8,0)
400µL Puffer (10mM Phosphat, pH 8,0)
100µL Präzipitans (gesättigte Ammoniumsulfatlösung in 10mM Phosphat,
pH 8,0)

- 10 Die Zugabe der Präzipitationsreagenzien zu der Proteinlösung erfolgt in
Lösung („batch-Verfahren“). Nach dem Pipetieren soll die Probe durch
„Handschütteln“ vermischt werden. Das Verfahren kann bei Raum-
temperatur oder 4° C durchgeführt werden.

15 **Beispiel 3: Kristallisation von Erbitux™ mit Ethanol**

- 500µL Protein (20 mg/mL in 10mM Citrat, pH 5,5)
400µL Puffer (10mM Citrat, pH 5,5)
100µL Präzipitans (50% (v/v) Ethanol in 10mM Citrat, pH 5,5)

- 20 oder

- 500µL Protein (20 mg/mL in 10mM Citrat, pH 5,5)
500µL Präzipitans (50% (v/v) Ethanol in 10mM Citrat, pH 5,5)

- 25 Die Zugabe der Präzipitationsreagenzien zu der Proteinlösung erfolgt in
Lösung („batch-Verfahren“). Nach dem Pipetieren soll die Probe durch
„Handschütteln“ vermischt werden. Das Verfahren kann bei Raum-
temperatur oder 4° C durchgeführt werden.

30 **Beispiel 4: Präzipitation von Erbitux™ mit Ammoniumsulfat**

- 500µL Protein (20 mg/mL in 10mM Phosphat, pH 8,0)

500µL Präzipitans (gesättigte Ammoniumsulfatlösung in 10mM Phosphat, pH 8,0)

oder

5

200µL Protein (20 mg/mL in 10mM Phosphat, pH 8,0)

800µL Präzipitans (gesättigte Ammoniumsulfatlösung in 10mM Phosphat, pH 8,0)

10

oder

500µL Protein (20 mg/mL in 10mM Citrat, pH 5,5)

500µL Präzipitans (gesättigte Ammoniumsulfatlösung in 10mM Citrat, pH 5,5)

15

oder

200µL Protein (20 mg/mL in 10mM Citrat, pH 5,5)

800µL Präzipitans (gesättigte Ammoniumsulfatlösung in 10mM Citrat, pH 5,5)

20

Die Zugabe der Präzipitationsreagenzien zu der Proteinlösung erfolgt in Lösung („batch-Verfahren“). Nach dem Pipetieren soll die Probe durch „Handschütteln“ vermischt werden. Das Verfahren kann bei Raumtemperatur oder 4°C durchgeführt werden.

25

Beispiel 5: Präzipitation von Erbitux™ mit PEG

500µL Protein (20 mg/mL in 10mM Phosphat, pH 8,0)

500µL Präzipitans (50% (w/v) PEG 4000 in 10mM Phosphat, pH 8,0)

30

oder

500µL Protein (20 mg/mL in 10mM Citrat, pH 5,5)

500µL Präzipitans (50% (w/v) PEG 4000 in 10mM Citrat, pH 5,5)

5 oder

500µL Protein (20 mg/mL in 10mM Phosphat, pH 8,0)

500µL Präzipitans (50% (w/v) PEG 8000 in 10mM Phosphat, pH 8,0)

10 oder

500µL Protein (20 mg/mL in 10mM Citrat, pH 5,5)

500µL Präzipitans (50% (w/v) PEG 8000 in 10mM Citrat, pH 5,5)

15 Die Zugabe der Präzipitationsreagenzien zu der Proteinlösung erfolgt in Lösung („batch-Verfahren“). Nach dem Pipetieren soll die Probe durch „Handschütteln“ vermischt werden. Das Verfahren kann bei Raumtemperatur oder 4°C durchgeführt werden.

20 **Beispiel 6: mikroskopische Untersuchung der Kristallform**

Die in den Beispielen 1 und 2 erhaltenen Kristalle wurden mikroskopisch untersucht. Dabei konnte sowohl die für Kristalle typische doppelbrechenden Eigenschaften als auch die für Proteine typische Anfärbbarkeit mit Coomassie Brilliant Blue detektiert werden.

25 Es wurden Kristalle von ca. 50-200 µm Größe gefunden.

Beispiel 7: Untersuchung auf Nativität der Präzipitate

Die in den Beispielen 4 und 5 erhaltenen Präzipitate wurden re-dispergiert und FT-IR-spektrometrisch untersucht. Dabei waren die Amid I-2.

30 Ableitung-Spektren des Ausgangsmaterials vor Präzipitation als auch des re-dispergierten Präzipitats kongruent.

Beispiel 8: Durchführung der in der WO02072636 beschriebenen Methode zur Kristallisation

Zur Überprüfung der Ergebnisse der Patent-Anmeldung WO02072636 wurde in einem Kontrollexperiment, wie in der WO02072636 beschrieben, 5
zuerst versucht, mittels des Wizard I-Screens Kristalle zu erhalten, die anschließend als Seed-Kristall verwendet werden können. Es wurden zwar bei den Präzipitationsbedingungen unter Verwendung von Calciumchlorid oder Calciumacetat nadelförmige Kristalle erhalten, die allerdings ebenso 10
in Citratpufferlösung ohne Protein entstanden. Somit werden mit dem in der WO02072636 beschriebenen Verfahren sowohl aus der Proteinlösung als auch aus der Negativkontrolle (ohne Protein) die beschriebenen nadelförmigen Kristalle erhalten werden. Daraus wird deutlich, dass es sich hier vermutlich allenfalls um Proteineinschlüsse in Kristalle des 15
Präzipitationsreagenzes handelt.

20

25

30

Patentansprüche

1. Feste Form eines anti-EGFR-Antikörpers und/oder einer seiner Varianten und/oder Fragmente, welche durch Auflösen oder Suspendieren in wässrigem Medium zu biologisch aktivem Antikörperprotein führt, erhältlich durch Ausfällung, des in wässrigem Medium gelösten oder suspendierten Antikörpers und/oder einer seiner Varianten und/oder Fragmente mittels eines Präzipitationsreagenzes.
2. Feste Form nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass als Präzipitationsreagenz Salze, Polymere und/oder organische Lösungsmittel verwendet wird.
3. Feste Form nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Präzipitationsreagenz Ammoniumsulfat, Natriumacetat, Natriumcitrat, Kaliumphosphat, PEG und/oder Ethanol verwendet wird.
4. Feste Form nach einem der Ansprüche 1 – 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich dabei um ein Präzipitat handelt.
5. Feste Form nach einem der Ansprüche 1 – 3, dadurch gekennzeichnet, dass es sich dabei um einen Kristall handelt.
6. Feste Form nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-EGFR-Antikörper monoklonal ist und muriner oder humaner Herkunft ist.
7. Feste Form nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-EGFR-Antikörper muriner Herkunft ist und chimär oder humanisiert ist.

- 5
8. Feste Form nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass der anti-EGFR-Antikörper Mab C225 (Cetuximab) oder Mab h425 (EMD72000) ist.
- 10
9. Verfahren zur Herstellung einer festen Form eines anti-EGFR Antikörpers und/oder einer seiner Varianten und/oder Fragmente, welche durch Auflösen oder Suspendieren in wässrigem Medium zu biologisch aktivem Antikörperprotein führt, dadurch gekennzeichnet, dass der in wässriger Lösung gelöste oder suspendierte Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente durch ein Präzipitationsreagenz ausgefällt werden und das Ausfällungsprodukt abgetrennt wird.
- 15
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Präzipitationsreagenz Ammoniumsulfat, PEG und/oder Ethanol verwendet wird.
- 20
11. Verfahren nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Verfahren im "batch"-Format durchgeführt wird.
- 25
12. Feste Form gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8 als lagerstabiles Arzneimittel.
- 30
13. Pharmazeutische Zubereitung enthaltend wenigstens eine feste Form nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8 in präzipitierter nicht-kristalliner, präzipitierter kristalliner oder in löslicher oder suspendierter Form, sowie gegebenenfalls Träger- und/oder Hilfsstoffe und/oder weitere pharmazeutische Wirkstoffe.
14. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörperkonzentration 10 – 200 mg/ml beträgt.

7/1

15. Pharmazeutische Zubereitung nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass die Antikörperkonzentration 50 – 150 mg/ml beträgt.
- 5 16. Verwendung einer festen Form eines anti-EGFR-Antikörpers und/oder einer seiner Varianten und/oder Fragmente nach einem oder mehreren der Ansprüche 1 bis 8 zur Herstellung eines Medikaments, welches den biologisch aktiven Antikörper und/oder eine seiner Varianten und/oder Fragmente in präzipitierter nicht-kristalliner, 10 präzipitierter kristalliner oder in gelöster oder suspendierter Form enthält.
17. Verwendung nach Anspruch 16 zur Herstellung eines Medikaments zur Behandlung und/oder Prophylaxe von Tumoren und/oder Tumor- 15 metastasen.
18. Verwendung nach Anspruch 17, wobei der Tumor aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Gehirntumor, Tumor des Urogenitaltrakts, Tumor des lymphatischen Systems, Magentumor, Kehlkopf- 20 tumor, Monozytenleukämie, Lungenadenokarzinom, kleinzelliges Lungenkarzinom, Bauchspeicheldrüsenkrebs, Glioblastom und Brustkarzinom.

25

30

+

Merck Patent Gesellschaft

mit beschränkter Haftung

5 64271 Darmstadt

10

FORMAS SÓLIDAS DE ANTICUERPOS ANTI-EGFR

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-

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.
10 (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
15 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 pro-
20 teína, 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-
25 tion of Biological Macromolecules, 1ª ed. Cold Spring Harbor

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. D50 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

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
5 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 farma-
10 cológicamente 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
15 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
20 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
25 (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-

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

15 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

20 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 orde-

25 nada.

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 "biólogicamente 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 consecuen-
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 epitopo, mientras que los anticuerpos policlonales cubren distintos anticuerpos, dirigidos contra diversos epitopos. 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 cuencia de aminoácidos), por glucoingeniería (variantes de 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 (Erbitux™), 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-

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).

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.

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.

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

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
5 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 prepa-
15 ración 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
20 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.

Las preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la invención
25 vención 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, polihid-
roxietilaspirtamidofenol o polilisina de óxido de polietil-
eno, sustituido con radicales palmitoílo. Las formas de an-
5 ticuerpos 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, poliortoés-
teres, poliacetales, polidihidroxipiranos, policianoacrilato-
10 tos, ácido poliláctico-co-glicólico, polímero tales como
conjugados entre dextrano y metacrilatos, polifosfoésteres,
diversos polisacáridos y poliaminas y poli-epsilon-caprolactona,
albúmina, quitosano, colágeno o gelatina modificada y copo-
límeros de hidrogeles con enlaces cruzados o de bloque anfi-
15 páticos.

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
20 emplaste mediante iontoforesis, como se describe en términos
generales en Pharmaceutical Research, 3(6), 318 (1986).

Los medicamentos adaptados para la administración tópi-
ca se pueden formular como ungüentos, cremas, suspensiones,
lociones, polvos, soluciones, pastas, geles, rocíos, aeroso-
25 les 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 busca-
20 da. No obstante, también se debe elegir la dosis más baja 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

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

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 incuba 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, 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 polarización de fluorescencia (FP) son útiles como métodos de ensayo (Sills et al., J. of Biomolecular Screening, 2002,
20 191-214).

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, enferme-
20 dad 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 de enfermedades seleccionadas del grupo formado por
25

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 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)
20 modulador de receptor de andrógeno, 3) modulador de receptor
25

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 radioter-
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.

25 "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, 5 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 10 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.

15 "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, 20 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 25 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-hidroxietilaminometil)-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, no-
10 latrexed, 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 suspendi-
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 Sepharose™.

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 microscopía 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 isoelectrico.

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, ditioneitol), 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 isotónicos (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, glutati6n.

6.4 Conservantes:

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

6.5 Ciclodextrinas:

por ejemplo, hidroxipropil-β-ciclodextrina, sulfobutiletíl-
10 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:

15 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).

20 7. Agentes isotónicos:

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

Ejemplo 2: Cristalización de Erbitux™ con sulfato de amonio

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

25 400 µl 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 Erbitux™ 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)

25 500 µl de precipitante (50% (p/v) de PEG 4000 en citrato 10 mM, pH 5,5)

o

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

500 µl de precipitante (50% (p/v) de PEG 8000 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 (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

15 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.

20 Se hallaron cristales con un tamaño de aproximadamente 50-200 µm.

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

Los precipitados obtenidos en los Ejemplos 4 y 5 se re-
25 dispersaron 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. Forma sólida de un anticuerpo anti-EGFR y/o una de sus variantes y/o fragmentos, que dan por resultado una proteína de anticuerpo biológicamente activa por disolución o
5 suspensión en medio acuoso, que se obtiene por precipitación del anticuerpo y/o una de sus variantes y/o fragmentos disueltos o suspendidos en medio acuoso mediante un reactivo de precipitación.

2. Forma sólida de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizada porque se usan sales, polímeros y/o solventes
10 orgánicos como reactivo de precipitación.

3. Forma sólida de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizada porque se usa sulfato de amonio, acetato de sodio, citrato de sodio, fosfato de potasio, PEG y/o etanol
15 como reactivo de precipitación.

4. Forma sólida de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3, caracterizada porque es un precipitado.

5. Forma sólida de acuerdo con una de las reivindicaciones 1-3, caracterizada porque es un cristal.

20 6. Forma sólida de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizada porque el anticuerpo anti-EGFR es monoclonal y de origen murino o humano.

7. Forma sólida de acuerdo con la reivindicación 6, caracterizada porque el anticuerpo anti-EGFR es de origen murino y es quimérico o humanizado.
25

8. Forma sólida de acuerdo con la reivindicación 7, caracterizada porque el anticuerpo anti-EGFR es Mab C225 (cetuximab) o Mab h425 (EMD 72000).

5 9. Procedimiento para la preparación de una forma sólida de un anticuerpo anti-EGFR y/o una de sus variantes y/o fragmentos que da como resultado una proteína de anticuerpo biológicamente activa por disolución o suspensión en medio acuoso, caracterizado porque el anticuerpo y/o una de sus variantes y/o fragmentos disueltos o suspendidos en solución
10 acuosa se precipita por medio de un reactivo de precipitación, y se separa el producto de precipitación.

10. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9, caracterizado porque se usa sulfato de amonio, PEG y/o etanol como reactivo de precipitación.

15 11. Procedimiento de acuerdo con la reivindicación 9 o 10, caracterizado porque el procedimiento se lleva a cabo de manera discontinua.

12. Forma sólida de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 8 como medicamento estable en almacenamiento.
20 miento.

13. Preparación farmacéutica que comprende al menos una forma sólida de acuerdo con una o varias de las reivindicaciones 1 a 8 en forma de precipitado no cristalino, precipitado cristalino o en forma soluble o suspendida, y opcionalmente
25 mente excipientes y/o coadyuvantes y/u otros ingredientes

150
activos farmacéuticos.

14. Preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 13, caracterizada porque la concentración de anticuerpos es de 10 - 200 mg/ml.

5 15. Preparación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 14, caracterizada porque la concentración de anticuerpos es de 50 - 150 mg/ml.

16. Uso de una forma sólida de un anticuerpo anti-EGFR y/o una de sus variantes y/o fragmentos de acuerdo con una o
10 varias de las reivindicaciones 1 a 8 para preparar un 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.

15 17. Uso de acuerdo con la reivindicación 16 para preparar un medicamento para el tratamiento y/o la prevención de tumores y/o metástasis tumorales.

18. Uso de acuerdo con la reivindicación 17, en donde el tumor se selecciona del grupo integrado por tumor cerebral, tumor del tracto urogenital, tumor del sistema linfático, tumor estomacal, tumor laríngeo, leucemia monocítica, adenocarcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, cáncer de páncreas, glioblastoma y carcinoma de ma-
20 ma.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts P03/221-rw/rg	WEITERES VORGEHEN siehe Formblatt PCT/ISA/220 sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/EP2004/012837	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 12/11/2004	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 29/11/2003
Anmelder MERCK PATENT GMBH		

Dieser Internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser Internationale Recherchenbericht umfasst insgesamt 5 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt für jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

a. Hinsichtlich der Sprache ist die Internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die Internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

b. ☐ Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten Nucleosid- und/oder Aminosäuresequenz siehe Feld Nr. 1.

2. ☐ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld II).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld III).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld Nr. IV angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Hinsichtlich der Zeichnungen

a. Ist folgende Abbildung der Zeichnungen mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ wie von der Behörde ausgewählt, weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ wie von der Behörde ausgewählt, weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

b. ☐ wird keine der Abbildungen mit der Zusammenfassung veröffentlicht.

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGEZEICHNETE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 96/40210 A1 (IMCLONE SYSTEMS INCORPORATED; MRC COLLABORATIVE CENTRE; GOLDSTEIN, NEI) 19. Dezember 1996 (1996-12-19) in der Anmeldung erwähnt Ansprüche 23-27, 48, 49, 91	1-8, 12-18
Y		9-11
X	EP 0 531 472 B (MERCK PATENT GESELLSCHAFT MIT BESCHRÄNKTER HAFTUNG; MERCK PATENT GMBH) 17. März 1993 (1993-03-17) in der Anmeldung erwähnt Absatz '0022! - Absatz '0047! Absatz '0082! - Absatz '0085! Ansprüche 1, 9, 10	1-8, 12-18
Y		9-11
X	BASELGA J: "The EGFR as a target for anticancer therapy-focus on cetuximab" EUROPEAN JOURNAL OF CANCER, PERGAMON PRESS, OXFORD, GB, Bd. 37, September 2001 (2001-09), Seiten 16-22, XP004307911 ISSN: 0959-8049 Tabelle 1	1-8, 12-18
X	ABOU-JAWDE RONY ET AL: "An overview of targeted treatments in cancer." CLINICAL THERAPEUTICS, Bd. 25, Nr. 8, August 2003 (2003-08), Seiten 2121-2137, XP002316108 ISSN: 0149-2918 Tabelle 1 Seite 2132, Absatz 2 - Seite 2133, Absatz 1	1-8, 12-18
X	WO 03/007988 A1 (MERCK PATENT GMBH; MAHLER, HANNS-CHRISTIAN; MUELLER, ROBERT; MARTINI-M) 30. Januar 2003 (2003-01-30) in der Anmeldung erwähnt Seite 4, Absatz 3 Ansprüche 1-10	13-18
Y		9-11
Y	HURRELL J.G.R.: "Monoclonal hybridoma antibodies: Techniques and Applications" 1982, CRC PRESS, BOCA RATON, FLORIDA, XP009043454 Seite 51, Absatz 3 - Absatz 7	9-11
Y	DEUTSCHER M.P.: "Guide to protein purification" 1990, ACADEMIC PRESS, SAN DIEGO, XP002316109 Seite 285 - Seite 306	9-11

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/012837

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
EP 0359282 A2	21-03-1990	AT 123070 T	15-06-1995
		AT 214943 T	15-04-2002
		AU 4128089 A	22-03-1990
		CA 1340417 C	02-03-1999
		DE 68922808 D1	29-06-1995
		DE 68922808 T2	21-09-1995
		DE 68929384 D1	02-05-2002
		DE 68929384 T2	21-11-2002
		EP 0667165 A1	16-08-1995
		ES 2075019 T3	01-10-1995
		ES 2174859 T3	16-11-2002
		JP 2291295 A	03-12-1990
		JP 3600617 B2	15-12-2004
		JP 2002114710 A	16-04-2002
		LU 91116 A9	29-12-2004
		LU 91117 A9	29-12-2004
		US 6217866 B1	17-04-2001
WO 03053465 A2	03-07-2003	DE 10163459 A1	03-07-2003
		AU 2002358533 A1	09-07-2003
		BR 0215266 A	07-12-2004
		CA 2470316 A1	03-07-2003
		EP 1455824 A2	15-09-2004
		HU 0402192 A2	28-01-2005
WO 9640210 A1	19-12-1996	AU 6267896 A	30-12-1996
		CA 2222231 A1	19-12-1996
		EP 0831880 A1	01-04-1998
		JP 11507535 T	06-07-1999
		US 2004006212 A1	08-01-2004
EP 0531472 B	17-03-1993	EP 0531472 A1	17-03-1993
		EP 1362868 A2	19-11-2003
		AT 247168 T	15-08-2003
		AU 658396 B2	13-04-1995
		AU 1340392 A	06-10-1992
		CA 2082160 A1	07-09-1992
		CZ 9203327 A3	16-02-1994
		CZ 9603337 A3	17-06-1998
		DE 69233153 D1	18-09-2003
		DE 69233153 T2	27-05-2004
		DK 531472 T3	01-12-2003
		WO 9215683 A1	17-09-1992
		ES 2204890 T3	01-05-2004
		HU 65687 A2	28-07-1994
		IE 920705 A1	09-09-1992
		JP 5506157 T	16-09-1993
		KR 240308 B1	15-01-2000
		MX 9201016 A1	01-08-1993
		PT 100195 A ,B	31-05-1993
		SK 281143 B6	11-12-2000
		SK 332792 A3	03-07-1996
		US 5558864 A	24-09-1996
		ZA 9201661 A	25-11-1992
WO 03007988 A1	30-01-2003	DE 10133394 A1	30-01-2003
		BR 0211060 A	20-07-2004
		CA 2453342 A1	30-01-2003

155

INTERNATIONALE RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/012837

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 03007988 A1		CZ 20040189 A3	12-05-2004
		EP 1406658 A1	14-04-2004
		JP 2004536129 T	02-12-2004
		MX PA04000340 A	04-05-2004
		SK 862004 A3	07-07-2004
		US 2004170632 A1	02-09-2004

Folio 156 extracto
as

156 157

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 36,150
FECHA : MAYO 15 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 06-050507- -00000-0000
Fec: 2006-05-25 16:47:46 Dep. 3020 NUECREACIONES
Tit. 11. PATENTE/YS
Eve: 376 FASE NACIONAL I
Act: 411 PRESENTACION Folios: 157

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CAVELIER ABOGADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	54982575	15/05/2006	47,972,500.00

***** C O N C E P T O *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	463,000.00
	TOTAL :	\$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

06 09266-841-014-2



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

REQUISITOS NECESARIOS PARA PRESENTACIÓN Y AGILIZACIÓN DEL TRAMITE

PATENTE DE INVENCION () **MODELO DE UTILIDAD** () **USUARIO** () **RADICADOR** ()

-Indicación de que se solicita la concesión de una patente. () ()

-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. () ()

-Descripción de la invención. () ()

-Dibujos de ser estos pertinentes. () ()

-Comprobante de Pago de las tasas establecidas. () ()

COMPLETA () **INCOMPLETA** () () ()

DISEÑO INDUSTRIAL ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial. () ()

-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. () ()

-Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del Material que incorpora el diseño. () ()

-Comprobante de Pago de las tasas establecidas. () ()

COMPLETA () **INCOMPLETA** () () ()

ESQUEMA DE TRAZADO ()

-Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial. () ()

-Datos de identificación del solicitante o de la persona que se presenta la solicitud. () ()

-Representación gráfica del Esquema Trazado. () ()

-Comprobante de Pago de las tasas establecidas. () ()

COMPLETA () **INCOMPLETA** () () ()

Firma Responsable:

Fecha:

Mayo 25/06

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Folio 158

2020
Bogotá D.C.,

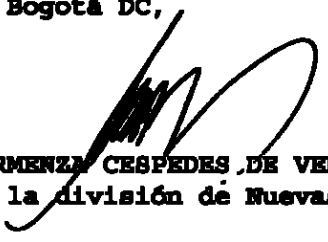
Doctor(a)
FERRERO EMILIO
Apoderado(a) y/o Representante de
MERCK PATENT GMBH

REFERENCIA	Radicación No.	06 50507
	Solicitud internacional	EP2004/012837
	Fecha inicio fase nacional	29/06/2006
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	416
	Oficio No.	1051
	Folios	1

Teniendo en cuenta que la solicitud de privilegio de patente que se tramita bajo el expediente indicado en la referencia, reúne los requisitos de forma establecidos en la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), el Reglamento y la Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se envía el extracto de la solicitud a la Oficina de Comunicaciones para efecto de su publicación en la Gaceta de Propiedad Industrial.

Cúmplase
Dado en Bogotá DC,

11 AGO. 2006


ALIX CARMONA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

adpa1