

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 637 854**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 16/28** (2006.01)

**C07K 16/06** (2006.01)

**C07K 16/30** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **12.08.2005 PCT/US2005/028861**

87 Fecha y número de publicación internacional: **23.02.2006 WO06020935**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **12.08.2005 E 05803522 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.05.2017 EP 1784219**

54 Título: **Formulaciones estabilizadoras**

30 Prioridad:

**13.08.2004 US 601311 P**

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

**17.10.2017**

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)  
235 East 42nd Street  
New York, NY 10017-5755, US**

72 Inventor/es:

**LI, LI;  
KANTOR, ANGELA y  
MACMILLAN, SHANNON B**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 637 854 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Formulaciones estabilizadoras

**Campo técnico**

5 La presente solicitud se refiere al campo de la formulación de proteínas, y más particularmente, a la formulación de anticuerpos.

**Referencia cruzada con las solicitudes relacionadas**

La presente solicitud reivindica la prioridad de la solicitud provisional de Estados Unidos número de serie 60/601311, depositada el 13 de agosto de 2004.

**Antecedentes**

10 Las proteínas, tales como anticuerpos, se suelen generar y almacenar para su uso posterior. Es importante que tales proteínas puedan almacenarse en condiciones que conserven la estabilidad de la proteína en diversas condiciones, incluyendo la temperatura y la concentración proteica. De este modo, las formulaciones utilizadas para el almacenamiento de proteínas contienen en general una variedad de sustancias estabilizadoras. No obstante, tales sustancias pueden afectar negativamente a los usos corriente abajo de la proteína almacenada, ya sea mediante la  
15 reducción del rendimiento de un procedimiento corriente abajo o porque necesita la eliminación de una o más sustancias estabilizadoras antes de que la proteína pueda utilizarse en un procedimiento corriente abajo.

Existe una necesidad de formulaciones de proteínas, tales como anticuerpos, que sean estables en una variedad de temperaturas y no contengan sustancias que puedan interferir con los procedimientos corriente abajo que utiliza las proteínas.

**Resumen**

20 La invención se refiere al hallazgo de que ciertas formulaciones se pueden utilizar para el almacenamiento de polipéptidos, tales como proteínas (p. ej., anticuerpos y fragmentos de los mismos) para formar una preparación que es relativamente estable y simple. Tales formulaciones reducen la probabilidad de que el procesamiento corriente abajo, o la actividad de la proteína, se vea afectado negativamente por un componente de la formulación y simplifican la preparación de muestras proteicas en un almacenamiento a corto o a largo plazo.  
25

La invención se refiere a una formulación que comprende

(a) un anticuerpo anti-CD22 monoclonal humanizado que comprende:

- una región variable de la cadena ligera gL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos:

1 DVQVTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSLA NSYGNTFLSW YLHKPGKAPQ LLIYGISNRF  
61 SGVPDRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQGTHQP YTFGQGGTKVE IKR

30 - una región constante de la cadena ligera de la cadena ligera kappa humana;  
- una región variable de la cadena pesada gH7 que consiste en la secuencia de aminoácidos

1 EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYRFT NYWIHWVRQA PGQGLEWIGG INPGNNYATY  
61 RRKFQGRVTM TADTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCTREG YGNYGAWFAY WGQGLTIVTS  
121 S;

y,

- una región constante de la cadena pesada de la cadena pesada gamma-4 humana;

35 en la que el anticuerpo está presente a una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml;

y

(b) una solución acuosa que comprende un tampón succinato y que tiene un pH 4,0 a pH 6,5, en la que la concentración del tampón es de 1 mM a 100 mM;

40 en la que la formulación no contiene crioprotector o tensioactivo, y el anticuerpo es estable durante al menos 3 semanas entre -80 °C a 8 °C, en la que la estabilidad se determina examinando al menos uno entre el porcentaje de especies de alto peso molecular, el porcentaje de especies de bajo peso molecular, o el porcentaje de especies ácidas en comparación con un control;

45 en la que el control es una réplica de la formulación que no se ha sometido a almacenamiento; en la que el porcentaje del componente proteico de la formulación en especies de alto peso molecular después del almacenamiento es de 10 % o menos de la proteína total;

en la que el porcentaje del componente proteico de la formulación en especies de bajo peso molecular después del almacenamiento es de 10 % o menos de la proteína total, y, en la que la formulación no muestra un aumento superior al 10 % en el porcentaje de especies ácidas después del almacenamiento.

5 En algunas realizaciones, el anticuerpo comprende

- una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos:

```

1  MKLPVRLVL LFWIPASRG DVQVTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSLA NSYGNTFLSW
61  YLHKPGKAPQ LLIYGISNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQGTHQP
121 YTFGQGTVKE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ
181 SGNQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC;
    
```

y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos:

```

1  MDFGFSVLFL ALILKGVQCE VQLVQSGAEV KKPGASVKVS CKASGYRFTN YWIHWVRQAP
61  GQGLEWIGGI NPGNNYATYR RKFQGRVTMT ADTSTSTVYM ELSSLRSEDV AVYYCTREGY
    
```

10

```

121 GNYGAWFAYW GQGLTLTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS
181 WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDPKPS NTKVDKRVES
241 KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSDQED PEVQFNWYVD
301 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK
361 GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDL
421 DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSLGK.
    
```

15

Por consiguiente, la divulgación incluye una formulación que contiene una proteína aislada y una solución acuosa que tiene un pH 4,0-8,0, de manera tal que la formulación no contiene ningún crioprotector o tensioactivo, y la proteína es estable durante al menos 3 semanas a -80 ° a 8 °C. En algunos casos, la formulación contiene menos de sal 150 mM, p. ej., sal 75 mM. La proteína puede ser un anticuerpo (un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal). Por ejemplo, la proteína puede ser un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-Lewis Y o un anticuerpo anti-5T4. La proteína puede ser una proteína recombinante (p. ej., un anticuerpo monoclonal humanizado). En algunos casos, la proteína es una proteína terapéutica.

20

La solución acuosa de la formulación puede ser agua (p. ej., filtrada o estéril) o puede incluir un tampón, tal como un tampón acetato, tampón succinato, tampón fosfato o tampón citrato. En general, la concentración del tampón es de aproximadamente 0 mM a aproximadamente 150 mM, p. ej., aproximadamente 50 mM, aproximadamente 100 mM, o aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM.

25

El componente proteico de la formulación es generalmente estable durante al menos 1 año a 5 °C, p. ej., la proteína es estable durante al menos 3 años a 5 °C. En algunas realizaciones, la proteína está presente a una concentración de desde aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, 25 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, o aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml. La proteína puede tener un pl de al menos 6,0, p. ej., al menos 7,0, o al menos 8,0. La proteína se puede purificar, p. ej., a al menos el 90 % o a al menos el 95 %.

30

En algunos casos, la formulación se almacena a aproximadamente 0 °C a aproximadamente 8 °C o de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 5 °C. El pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0, y en algunos casos, el pH de la formulación es de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0 y la formulación se almacena a aproximadamente -80 °C a aproximadamente 5 °C. Generalmente, la formulación es estéril.

35

En un ejemplo de la divulgación, la proteína de la formulación también puede ser, p. ej., un anticuerpo anti-CD22 humanizado y una solución acuosa con aproximadamente succinato 20 mM, pH 6,0. En otro ejemplo de la divulgación, la proteína es un anticuerpo anti-Lewis Y y la solución acuosa es de aproximadamente citrato Na 10 mM, pH 5,5 y aproximadamente NaCl 75 mM. En un tercer ejemplo de la divulgación, la proteína es un anticuerpo anti-5T4 y la solución acuosa es de aproximadamente acetato Na 10 mM, pH aproximadamente 5,5.

40

La estabilidad de la formulación puede determinarse, p. ej., examinando al menos uno entre el porcentaje de especies de alto peso molecular, el porcentaje de especies de bajo peso molecular, o el porcentaje de especies

ácidas, p. ej., en comparación con un control.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento de almacenamiento de una proteína. El procedimiento incluye proporcionar una formulación como se ha descrito *supra*, colocar la formulación a una temperatura seleccionada, y mantener la formulación a la temperatura (p. ej., congelada), de manera tal que la proteína en la formulación es estable durante al menos una semana, p. ej., durante al menos un mes, tres meses, un año, cinco años, siete años, o diez años. En algunos casos, la proteína se almacena y es estable a una temperatura de aproximadamente 2 °C a 8 °C. En ciertas realizaciones, la proteína se almacena a una temperatura de aproximadamente -80 °C y la proteína es estable durante al menos cinco años, siete años, o diez años. Cuando se congela la proteína, el procedimiento puede incluir una etapa en la que la proteína se descongela rápidamente. Cuando la proteína se va a congelar, p. ej., para su almacenamiento, la proteína se puede congelar utilizando congelación rápida. En algunos casos, se utiliza la congelación lenta. La proteína puede ser un anticuerpo (un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal). En un ejemplo, la proteína es un anticuerpo anti-CD22 humanizado, un anticuerpo anti-Lewis Y, o un anticuerpo anti-5T4. En ciertas realizaciones, el anticuerpo es una sustancia intermedia. En general, la proteína está presente en una concentración de al menos 1 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 20 mg/ml, o al menos 30 mg/ml. Después de la recuperación del almacenamiento, la proteína puede tener, p. ej., al menos el 70 % de la actividad de una referencia. En algunos casos, después de la recuperación del almacenamiento, la formulación contiene menos o igual al 5 % de productos de alto peso molecular en comparación con un control o después de la recuperación del almacenamiento, la formulación contiene menos o igual al 10 % de productos de alto peso molecular y agregados, p. ej., en comparación con un control. En algunas realizaciones, la formulación contiene menos o igual al 10 % de productos de alto peso molecular, p. ej., menos o igual al 5 % de productos de alto peso molecular.

En otro aspecto, la divulgación se refiere a un procedimiento de determinación de una formulación favorable para el almacenamiento de una proteína aislada seleccionada. El procedimiento incluye proporcionar una proteína aislada seleccionada, almacenar la proteína aislada seleccionada en una serie de formulaciones que comprenden una solución acuosa comprendida entre pH 4,0 y pH 8,0 y que comprende entre aproximadamente 0 mM a aproximadamente 150 mM de tampón, determinar al menos un parámetro de estabilidad, e identificar una formulación en la que la proteína es estable, de manera tal que una formulación en la que la proteína es estable es una formulación favorable para el almacenamiento de la proteína aislada seleccionada. En algunas realizaciones del procedimiento, una disminución en la estabilidad está indicada por al menos uno entre un aumento en la cantidad de proteína de alto peso molecular en la muestra, p. ej., en comparación con un control, un aumento en la cantidad de especies de bajo peso molecular en la muestra, p. ej., en comparación con un control, o un aumento en el porcentaje de especies ácidas en comparación con un control. En algunos casos, se seleccionó una condición en la que no más del 0,5 %, 0,2 %, o 0,1 % de la proteína es una especie de alto peso molecular. El parámetro de estabilidad puede ser la actividad examinada por el ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) y en una formulación estable, la actividad es al menos el 50 % de un control o es al menos el 80 % de un control. En un ejemplo del procedimiento, el parámetro de estabilidad es la presencia de especies de alto peso molecular y una formulación estable contiene no más del 5 % de especies de alto peso molecular. En otro ejemplo, el parámetro de la estabilidad es la presencia de especies de alto peso molecular y agregados proteicos, y una formulación estable incluye no más del 10 % de especies de alto peso molecular y agregados proteicos o no más del 15 % de especies de alto peso molecular y agregados proteicos combinados. En algunos casos, el porcentaje de especies de alto peso molecular se compara con la cantidad presente en una muestra de control (p. ej., una muestra antes del almacenamiento). En otra realización del procedimiento, el parámetro de estabilidad es la relación de proteínas ácidas y básicas, y la relación en una formulación estable es no más del 15 % diferente de un control.

La divulgación también se refiere a un polipéptido (una proteína o un péptido) producido por un procedimiento que incluye el almacenamiento del polipéptido en una formulación que incluye una solución acuosa que tiene un pH de 4,0 a pH 8,0, de manera tal que la formulación no contiene crioprotector del tensioactivo, y la proteína es estable durante al menos tres semanas a -80 °C a 8 °C. En algunas realizaciones, el polipéptido es un anticuerpo o un fragmento del mismo (p. ej., un anti-CD22, anti-Lewis Y, o un anti-5T4). El anticuerpo o fragmento del mismo puede conjugarse con una molécula o puede utilizarse para la conjugación con una molécula, por ejemplo, conjugación con una toxina, tal como ricina o caliqueamicina.

En algunas realizaciones, la divulgación se refiere a un polipéptido (una proteína o un péptido) para su uso en la fabricación de una proteína modificada, de manera tal que el polipéptido se almacena en una formulación que incluye una solución acuosa que tiene un pH de 4,0 a pH 8,0, la formulación no contiene crioprotector del surfactante, y la proteína es estable durante al menos tres semanas a -80 °C a 8 °C. En algunos casos, el polipéptido es un anticuerpo, p. ej., un anti-CD22, un anti-Lewis y, o un anti-5T4. El polipéptido puede utilizarse para fabricar una proteína conjugada, p. ej., para la conjugación con una toxina, tal como ricina o caliqueamicina. Tales proteínas conjugadas también se pueden almacenar en una formulación descrita en la presente memoria.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente memoria tienen el mismo significado que el comúnmente entendido por un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque los procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente memoria pueden utilizarse en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen a continuación procedimientos y materiales adecuados.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción detallada, los dibujos, y a partir de las reivindicaciones.

### **Descripción de los dibujos**

- 5 La Fig. 1A es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por cromatografía de exclusión por tamaños-cromatografía líquida de alto rendimiento (CET-HPLC) de 1 mg/ml de anti-Lewis Y a diversas temperaturas y diversos pHs. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de alto peso molecular (APM).
- 10 La Fig. 1B es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de 1 mg/ml de anti-Lewis Y a diversas temperaturas y diversos pHs. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de bajo peso molecular (BPM).
- La Fig. 2 es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CIC-HPLC de 1 mg/ml de anti-Lewis Y a diversas temperaturas y diversos pHs. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies ácidas.
- 15 La Fig. 3 es una representación de un SDS-PAGE de muestras de anti-Lewis Y almacenadas a 40 °C durante cuatro semanas a varios pH. La imagen de la izquierda es de un análisis en gel en condiciones no reductoras y la imagen de la derecha es de un análisis en gel en condiciones reductoras.
- La Fig. 4 es una representación de un isoelectroenfoque (IEE) en gel de muestras como se describe para la Fig. 3.
- 20 La Fig. 5 es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de 0,5 mg/ml de anti-CD22 incubados durante dos semanas a diversas temperaturas y diversos pHs. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de APM.
- La Fig. 6 es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de 25 mg/ml de anti-CD22 incubados durante dos semanas a diversas temperaturas y diversos pHs, en presencia o ausencia de NaCl 75 mM. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de APM.
- 25 La Fig. 7A es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de 1 mg/ml de anti-Lewis Y incubados durante cuatro semanas a diversos pHs a 40 °C, en varios tampones, y en presencia o ausencia de NaCl 75 mM. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de APM.
- La Fig. 7B es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de 1 mg/ml de anti-Lewis Y incubados durante cuatro semanas a diversos pHs a 40 °C, en varios tampones, y en presencia o ausencia de NaCl 75 mM. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de BPM.
- 30 La Fig. 8 es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CIC-HPLC de 1 mg/ml de anti-Lewis Y incubados durante cuatro semanas a diversos pHs a 40 °C, en varios tampones, y en presencia o ausencia de NaCl 75 mM. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies ácidas.
- La Fig. 9A es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CIC-HPLC de 30 mg/ml de anti-Lewis Y incubados durante cuatro semanas en citrato Na 10 mM, pH 5,5 a varias temperaturas y varias concentraciones de NaCl. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies ácidas.
- 35 La Fig. 9B es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de las muestras descritas para 9A. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de APM.
- La Fig. 9C es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de las muestras descritas para 9A. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de BPM.
- 40 La Fig. 10 es un gráfico de barras que representa los resultados de CET-HPLC de anti-Lewis Y a 1 mg/ml o 30 mg/ml en diferentes concentraciones de sal y se someten a sacudida. Los resultados se expresan como el porcentaje de recuperación de monómeros.
- La Fig. 11A es un gráfico de barras que representa los resultados de CET-HPLC de anti-Lewis Y a 1 mg/ml en citrato Na 10 mM, pH 5,5 en presencia o ausencia de NaCl 150 mM siguiendo diez ciclos de congelación-descongelación como se indica en la Fig. 11B. Los resultados se expresan como el porcentaje de recuperación de monómeros.
- 45 La Fig. 11B es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de anti-Lewis Y a 30 mg/ml en citrato Na 10 mM, pH 5,5 en presencia o ausencia de NaCl 150 mM siguiendo diez ciclos de congelación-descongelación como se ha indicado. Los resultados se expresan como el porcentaje de recuperación de monómeros.
- 50 La Fig. 12 es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de 25 mg/ml de anti-CD22 en succinato 50 mM, pH 6,0, incubados durante un mes a varias temperaturas en presencia o ausencia de NaCl 75 mM.
- 55 La Fig. 13 es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de 15 mg/ml de anti-CD22 en succinato 20 mM, pH 6,0, succinato más NaCl 75 mM, succinato más polisorbato 80 al 0,01 %, o succinato más NaCl 75 mM y polisorbato 80 (Tween). Las muestras se agitaron durante 24 horas antes del análisis. Se incluye un control sin sacudir de la proteína en tampón succinato. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de APM.
- 60 La Fig. 14A es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de anti-Lewis Y a 1 mg/ml o 30 mg/ml en citrato Na 10 mM, pH 5,5 incubados en presencia o ausencia de NaCl 75 mM durante cuatro semanas a 40 °C. Los resultados se expresan como un cambio en el porcentaje de especies de APM.
- La Fig. 14B es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de anti-Lewis Y a 1 mg/ml o 30 mg/ml en citrato Na 10 mM, pH 5,5 incubados en presencia o ausencia de NaCl 75 mM durante

cuatro semanas a 40 °C. Los resultados se expresan como un cambio en el porcentaje de especies de BPM.

La Fig. 14C es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CIC-HPLC de anti-Lewis Y a 1 mg/ml o 30 mg/ml en citrato Na 10 mM, pH 5,5 incubados en presencia o ausencia de NaCl 75 mM durante cuatro semanas a 40 °C. Los resultados se expresan como un cambio en el porcentaje de especies ácidas.

La Fig. 15A es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de anti-Lewis Y a 30 mg/ml en citrato Na 10 mM, pH 5,5 y NaCl 75 mM incubados a varias temperaturas durante varios momentos. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de APM.

La Fig. 15B es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de anti-Lewis Y a 30 mg/ml en citrato Na 10 mM, pH 5,5 y NaCl 75 mM incubados a varias temperaturas durante varios momentos. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de BPM.

La Fig. 15C es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CIC-HPLC de anti-Lewis Y a 30 mg/ml en citrato Na 10 mM, pH 5,5 y NaCl 75 mM incubados a varias temperaturas durante varios momentos. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies ácidas.

La Fig. 16A es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de anti-CD22 a 1 mg/ml en succinato 20 mM, pH 6,0 y se tratan en varios regímenes de congelación-descongelación para varios ciclos. CR es congelación rápida, DR es descongelación rápida, CL es congelación lenta, y DL es descongelación lenta. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de APM.

La Fig. 16B es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de anti-CD22 a 25 mg/ml en succinato 20 mM, pH 6,0 y se tratan en varios regímenes de congelación-descongelación para varios ciclos. CR es congelación rápida, DR es descongelación rápida, CL es congelación lenta, y DL es descongelación lenta. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de APM.

La Fig. 16C es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de anti-CD22 a 1 mg/ml en succinato 20 mM, pH 6,0 que contiene polisorbato 80 y se tratan en varios regímenes de congelación-descongelación para varios ciclos. CR es congelación rápida, DR es descongelación rápida, CL es congelación lenta, y DL es descongelación lenta. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de APM.

La Fig. 16D es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de anti-CD22 a 25 mg/ml en succinato 20 mM, pH 6,0 que contiene polisorbato 80 y se tratan en varios regímenes de congelación-descongelación para varios ciclos. CR es congelación rápida, DR es descongelación rápida, CL es congelación lenta, y DL es descongelación lenta. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de APM.

La Fig. 17A es un gráfico de barras que representa los resultados de estudios de sacudida, analizados utilizando CET-HPLC, en el que se agitaron 1 mg/ml o 30 mg/ml de anti-Lewis Y en citrato Na 10 mM, pH 5,5 en presencia o ausencia de polisorbato 80 a 360 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente. Los resultados se expresan como el porcentaje de recuperación de monómeros.

La Fig. 17B es un gráfico de barras que representa los resultados de estudios de sacudida, analizados utilizando CET-HPLC, en el que se agitaron 30 mg/ml de anti-Lewis Y en citrato Na 10 mM, pH 5,5 en varias concentraciones de polisorbato 80 a 360 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente. Los resultados se expresan como el porcentaje de recuperación de monómeros.

La Fig. 18A es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de anti-Lewis Y a 1 mg/ml en citrato Na 10 mM, pH 5,5 en presencia o ausencia de polisorbato 80 al 0,01 % siguiendo diez ciclos de congelación-descongelación como se indica en la Fig. 18B. Los resultados se expresan como el porcentaje de recuperación de monómeros.

La Fig. 18B es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de anti-Lewis Y a 30 mg/ml en citrato Na 10 mM, pH 5,5 en presencia o ausencia de polisorbato 80 al 0,01 % siguiendo diez ciclos de congelación-descongelación como se ha indicado. Los resultados se expresan como el porcentaje de recuperación de monómeros.

La Fig. 19A es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de 30 mg/ml de anti-Lewis Y en citrato Na 10 mM, pH 5,5 y NaCl 75 mM en presencia o ausencia de polisorbato 80 después de la incubación a diversas temperaturas y durante diversos momentos. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de APM.

La Fig. 19B es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de 30 mg/ml de anti-Lewis Y en citrato Na 10 mM, pH 5,5 y NaCl 75 mM en presencia o ausencia de polisorbato 80 después de la incubación a diversas temperaturas y durante diversos momentos. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de BPM.

La Fig. 19C es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de 30 mg/ml de anti-Lewis Y en citrato Na 10 mM, NaCl 75 mM, pH 5,5 en presencia o ausencia de polisorbato 80 después de la incubación a diversas temperaturas y durante diversos momentos. Los resultados se expresan como el porcentaje de especies ácidas.

La Fig. 20A es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de la estabilidad de almacenamiento de anti-CD22 durante seis meses. Las soluciones contienen succinato 20 mM, pH 6,0 (S); succinato 20 mM, metionina 10 mM, pH 6,0 (SM); succinato 20 mM, polisorbato 80 al 0,01, pH 6,0 (ST); o succinato 20 mM, metionina 10 mM, polisorbato 80 al 0,01, pH 6,0 (SMT). Los resultados se expresan como el porcentaje de especies de APM.

La Fig. 20B es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de la estabilidad de almacenamiento de anti-CD22 durante seis meses. Las soluciones contienen succinato 20 mM, pH 6,0 (S); succinato 20 mM, metionina 10 mM, pH 6,0 (SM); succinato 20 mM, polisorbato 80 al 0,01, pH 6,0 (ST); o succinato 20 mM, metionina 10 mM, polisorbato 80 al 0,01, pH 6,0 (SMT). Los resultados se expresan como el

porcentaje del área del pico total.

La Fig. 20C es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CIC-HPLC de estabilidad de almacenamiento de anti-CD22. Las condiciones son como se describen en la Fig. 20A y 20B. Los resultados se expresan como el porcentaje de las especies completamente activas (% de pico 5).

La Fig. 21 es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC de los productos de alto peso molecular (APM) de anti-5T4 almacenados a diferentes pHs y temperaturas durante dos semanas. Los resultados se expresan como el porcentaje medio de los productos de alto peso molecular.

La Fig. 22 es un gráfico de barras que representa los resultados del análisis por CET-HPLC del porcentaje de productos de alto peso molecular (APM) o productos de bajo peso molecular (BPM) en muestras de anti-5T4 inicialmente o después de cuatro semanas a 40 °C en tampón acetato (Ace), tampón citrato (Cit), tampón fosfato (Fos), o tampón succinato (Suc), con o sin sal (NaCl), a varios pHs.

La Fig. 23A es un termograma que muestra los resultados de calorimetría diferencial de barrido (CDB) de anti-5T4 en tampón citrato (pH 5,5).

La Fig. 23B es un termograma que muestra los resultados de calorimetría diferencial de barrido (CDB) de anti-5T4 en tampón succinato (pH 6,0).

La Fig. 24A es un gráfico de barras que representa los resultados de CDB de anti-5T4 en diversas formulaciones, sin NaCl, y a diversos pHs.

La Fig. 24B es un gráfico de barras que representa los resultados de CDB de anti-5T4 en diversas formulaciones que contienen NaCl 150 mM a diversos pH.

La Fig. 25 es un gráfico de barras que representa los resultados de CIC-HPLC de anti-5T4 en formulaciones que contienen diversos tampones, con o sin NaCl 150 mM, a diversos pHs después de cuatro semanas a 40 °C.

La Fig. 26A es un gráfico de barras que representa los resultados de CET-HPLC de anti-5T4 (2 mg/ml) en diversos tampones a diversos pHs después de seis semanas a -80 °C o 40 °C.

La Fig. 26B es un gráfico de barras que representa los resultados de CET-HPLC de anti-5T4 (30 mg/ml) en tampón citrato o succinato a pH 6 después de seis semanas a -80 °C o 40 °C.

La Fig. 27A es un gráfico de barras que representa los resultados de CIC-HPLC de anti-5T4 (2 mg/ml) en diversas formulaciones de tampones a diversos pHs después de seis semanas a 40 °C.

La Fig. 27B es un gráfico de barras que representa los resultados de CIC-HPLC de anti-5T4 (30 mg/ml) en un tampón succinato o citrato a pH 6 después de seis semanas a 40 °C.

La Fig. 28 es una reproducción de un conjunto de electroferogramas superpuestos que representan los resultados de la electroforesis capilar en geles de SDS de anti-5T4 en diversas formulaciones de tampón a diversos pHs después de seis semanas a 40 °C.

La Fig. 29A es un gráfico de barras que representa el valor  $A_{400}$  de anti-5T4 a 1 mg/ml en formulaciones que contienen diversos tampones (pH 5,5) y con o sin polisorbato 80 (P80), y con o sin sacarosa en diferentes regímenes de congelación y descongelación. CR es congelación rápida, CL es congelación lenta, DR es descongelación rápida, y DL es descongelación lenta.

La Fig. 29B es un gráfico de barras que representa el porcentaje de especies de alto peso molecular (APM) de anti-5T4 a 1 mg/ml en formulaciones que contienen diversos tampones (pH 5,5) y con o sin polisorbato 80 (P80), y con o sin sacarosa en diferentes regímenes de congelación y descongelación. CR es congelación rápida, CL es congelación lenta, DR es descongelación rápida, y DL es descongelación lenta.

La Fig. 30A es un gráfico de barras que representa el valor  $A_{400}$  de anti-5T4 a 25 mg/ml en formulaciones que contienen diversos tampones (pH 5,5) y con o sin polisorbato 80 (P80), y con o sin sacarosa en diferentes regímenes de congelación y descongelación. CR es congelación rápida, CL es congelación lenta, DR es descongelación rápida, y DL es descongelación lenta.

La Fig. 30B es un gráfico de barras que representa el porcentaje de especies de alto peso molecular (APM) de anti-5T4 a 25 mg/ml en formulaciones que contienen diversos tampones (pH 5,5) y con o sin polisorbato 80 (P80), y con o sin sacarosa en diferentes regímenes de congelación y descongelación. CR es congelación rápida, CL es congelación lenta, DR es descongelación rápida, y DL es descongelación lenta.

La Fig. 31A es un gráfico de barras que representa el valor  $A_{400}$  de anti-5T4 a 1 mg/ml o 25 mg/ml en varias formulaciones con o sin polisorbato 80 (P80), y con o sin sacarosa. Las muestras se sacudieron o no se sacudieron. "\*" indica que la turbidez excede el límite superior del instrumento.

La Fig. 31B es un gráfico de barras que representa el porcentaje de especies de alto peso molecular (APM) de anti-5T4 a 1 mg/ml o 25 mg/ml en varias formulaciones con o sin polisorbato (P80) y con o sin sacarosa. Las muestras se sacudieron o no se sacudieron.

## 55 **Descripción detallada**

Se proporciona una formulación relativamente simple para el almacenamiento de una proteína, tal como un anticuerpo monoclonal, un fármaco que contiene un anticuerpo monoclonal, o una sustancia intermedia en la producción de un producto proteico, tal como un fármaco que contiene un anticuerpo. La formulación contiene generalmente concentraciones con una cantidad escasa a nula de tensioactivo, concentraciones con una cantidad nula o relativamente baja en sal, y requiere una concentración de tampón relativamente baja. La formulación es eficaz para el almacenamiento estable de ciertas proteínas, tales como anticuerpos, a través de un intervalo relativamente amplio de concentraciones proteicas, pH, y tipos de tampón. Dichas formulaciones proporcionan una gran flexibilidad para su posterior procesamiento, p. ej., haciendo que la proteína se ajuste con facilidad a un pH deseado, adición excipiente, modificación química, o liofilización. Las formulaciones también se pueden utilizar para

el almacenamiento de péptidos y proteínas procesadas, p. ej., proteínas, tales como anticuerpos que se conjugan con otro péptido o fragmentos no peptídicos.

- 5 También se proporcionan ejemplos específicos no limitativos que ilustran procedimientos de identificación de una formulación favorable para el almacenamiento de tres anticuerpos diferentes, un anti-CD22, un anti-Lewis Y, y un anti-5T4, que se pueden utilizar, p. ej., como sustancias intermedias para la fabricación de fármacos elaborados por la conjugación de los anticuerpos con un compuesto, tal como una citotoxina. Una sustancia intermedia es una sustancia, generalmente una proteína (p. ej., un anticuerpo) que se utiliza en la fabricación de un compuesto, tal como un fármaco.

### **Formulaciones**

- 10 Las formulaciones descritas en la presente memoria incluyen generalmente una proteína aislada en una solución acuosa de un pH aproximadamente 3,0 a 9,0, p. ej., un pH de aproximadamente 4,0-8,0, un pH de aproximadamente 5,0-6,5, o un pH de aproximadamente 5,5-6,0. Las formulaciones no contienen crioprotectores o tensioactivos. En general, las formulaciones no contienen conservantes.

- 15 Una formulación que se describe en la presente memoria no contiene crioprotector alguno. Los crioprotectores se conocen por los expertos en la materia, e incluyen, por ejemplo, monosacáridos (p. ej., glucosa, fructosa, maltosa, ribosa, manosa, y xilosa); disacáridos (p. ej., trehalosa, sacarosa, celobiosa y lactosa); trisacáridos (p. ej., rafinosa); alcoholes de azúcar (p. ej., manitol, sorbitol, mio-inositol, inositoles fosforilados, y glicerol); polisacáridos (p. ej., almidón de hidroxietilo (AHE), dextrano, dextrano fosforilado, heparina, sulfato de heparina, ácido hialurónico, sulfato de dermatano, sulfato de condroitina, y agarosa); ácidos carboxílicos (p. ej., piruvato y 2,3,-difosfoglicerato); y proteínas o mezclas de proteínas utilizadas para un efecto protector (p. ej., sangre, suero animal, plasma, albúmina humana, albúmina bovina, gelatina bovina y gelatina de pescado).

Las nuevas formulaciones no contienen tensioactivo (un reactivo que puede reducir la tensión superficial del agua cuando se utiliza en concentraciones muy bajas). Los surfactantes se conocen en la materia e incluyen, p. ej., polisorbato 80, polisorbato 20, y tensioactivos Pluronic®.

- 25 En general, las nuevas formulaciones no contienen conservantes. Los conservantes se conocen por los expertos en la materia e incluyen agentes antibacterianos y antifúngicos, tales como, por ejemplo, azida de sodio, compuestos que contienen mercurio, tales como timerosal, xilenoles, antibióticos, isotiazolonas, y anfotericina.

### **Tampones**

- 30 Las formulaciones pueden estar en un tampón, lo que significa un agente que mantiene el pH de una solución en un intervalo aceptable. Un tampón puede incluir, por ejemplo, citrato, acetato, histidina, gluconato, succinato, fosfato, Tris (tris (hidroximetilaminometano)), dietanolamina, HEPES u otros tampones ácidos orgánicos. Otros tampones adecuados para su uso con una proteína se conocen por los expertos en la materia. Ciertas formulaciones excluyen el uso de tampones amina. En formulaciones que contienen un tampón, el tampón está presente generalmente en una concentración que oscila desde más de 0 mM a 150 mM. En algunos casos, la concentración del tampón es de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM o de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM. Por ejemplo, la concentración de tampón puede ser de aproximadamente 10 mM a 20 mM. En algunos casos, puede utilizarse una combinación de tampones, por ejemplo, tampones HEPES y Tris pueden utilizarse en combinación.

- 40 Otras consideraciones pueden aplicarse a la selección de un tampón. Por ejemplo, tampones amina, tales como tampones Tris o histidina no son adecuados para ciertos procedimientos de conjugación y por lo tanto no son adecuados para una formulación que contiene una proteína que se va a utilizar en un procedimiento de conjugación de este tipo.

En general, la concentración de sal utilizada en una formulación se expresa como sal añadida y no tienen en cuenta, p. ej., sodio aportado por tampón o sal que estaba presente en la muestra proteica antes de su dilución en la formulación.

- 45 Las formulaciones pueden prepararse utilizando procedimientos conocidos en la materia. Por ejemplo, la diálisis puede utilizarse para introducir un tampón de pH deseado y, opcionalmente, una sal a una formulación que contiene la proteína de interés. Generalmente, se proporciona una muestra inicial que contiene una proteína de interés aislada. En algunos casos, tales como cuando la muestra inicial está a una concentración alta de proteínas antes de su dilución en la formulación, no es necesario tener en cuenta el pH o la cantidad de sal de la muestra inicial. Al preparar una formulación utilizando una muestra inicial que contiene concentraciones muy altas de sal o altas concentraciones de tampón, se utiliza un procedimiento para preparar la proteína generalmente para eliminar o reducir los componentes no proteicos de la muestra inicial (p. ej., diálisis).

Estabilidad

Es una característica de las formulaciones descritas en la presente memoria que el componente proteico (p. ej., anticuerpo) de la formulación sea estable durante al menos un periodo de tiempo especificado que no sea menos de tres semanas cuando la formulación se almacene a una temperatura de -80 °C a 8 °C. En general, un componente proteico en una formulación es estable durante al menos un año a 5 °C. La estabilidad se refiere generalmente a la estabilidad conformacional de una proteína y/o la estabilidad de la actividad. Con respecto a una formulación, una proteína es estable si cumple con al menos uno de los parámetros para la estabilidad que se proporcionan en la presente memoria. En general, es deseable minimizar la formación de especies de alto peso molecular que se acumulan durante el almacenamiento de una proteína. De este modo, un parámetro para la estabilidad es que el aumento, si lo hubiere, en la cantidad de especies de alto peso molecular en una formulación sometida a almacenamiento es menor que en un control. Por ejemplo, el porcentaje de especies de alto peso molecular en una muestra después de un almacenamiento en una formulación no aumenta significativamente en comparación con un control. En general, un control es una réplica de la formulación que no se ha sometido a almacenamiento en las condiciones experimentales (p. ej., durante tres semanas a -80 ° a 8 °C). En algunos casos, el porcentaje del componente proteico de una formulación en especies de alto peso molecular después del almacenamiento es de 10 % o menos de la proteína total, 5 % o menos de la proteína total, es 3 % o menos de la proteína total, o es 2 % o menos de la proteína total. Los procedimientos de análisis de especies de alto peso molecular se conocen en la técnica e incluyen SEC-HPLC, SDS-PAGE, electroforesis capilar, y cromatografía de exclusión por tamaños.

Otro parámetro que puede analizarse es el aumento, si lo hubiere, en la cantidad de especies de bajo peso molecular en una formulación sometida a almacenamiento. En general, es deseable minimizar la acumulación de especies de bajo peso molecular durante el almacenamiento. Por ejemplo, el porcentaje de especies de bajo peso molecular en una muestra después de un almacenamiento de una formulación no aumenta significativamente en comparación con un control. En algunos casos, el porcentaje del componente proteico de una formulación en especies de alto peso molecular después del almacenamiento es de 10 % o menos de la proteína total, 5 % o menos de la proteína total, es 3 % o menos de la proteína total, o es 2 % o menos de la proteína total. Las especies de bajo peso molecular se pueden analizar utilizando procedimientos conocidos en la materia, p. ej., SEC-HPLC.

La relación de especies ácidas y básicas en una formulación después del almacenamiento en diversas condiciones puede compararse a la relación en un control. En general, se determina el porcentaje de especies ácidas, indicativo de desamidación. Un aumento en el porcentaje de especies ácidas es indicativo de estabilidad disminuida. Por ejemplo, una formulación estable no muestra generalmente un aumento superior al 10 % en el porcentaje de especies ácidas en comparación con un control en una condición seleccionada. Los procedimientos para determinar el porcentaje de especies ácidas en una muestra se conocen en la materia, p. ej., CIC-HPLC. En algunos casos, la presencia de especies básicas se analiza utilizando procedimientos conocidos en la materia. Un cambio en el porcentaje o tipo de especies básicas presentes en una proteína almacenada en una formulación es indicativo del grado de estabilidad de las especies proteicas en la formulación.

Otro parámetro para la estabilidad puede ser un aumento de los agregados y las especies de APM, si los hubiere, que es menor o igual al 10 % de la cantidad de agregados y especies de alto peso molecular en un control. Los agregados son generalmente aquellos materiales en una muestra que no entran en un gel, columna, u otro medio de separación que puede utilizarse para separar los componentes proteicos de una formulación. Los procedimientos para determinar las especies de alto peso molecular además de los agregados en una formulación se conocen en la materia e incluyen electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía de exclusión por tamaños, electroforesis capilar, y dispersión de luz.

La potencia o actividad de una proteína puede determinarse y utilizarse como un parámetro para establecer la estabilidad de una formulación. En el caso de un anticuerpo, puede utilizarse un inmunoensayo (p. ej., un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA)). Cuando se utiliza un inmunoensayo u otro ensayo de actividad, un anticuerpo en una formulación es estable si retiene al menos el 50 % de su actividad en el inmunoensayo en comparación con la actividad de un control. En algunos casos, la formulación es estable si la proteína retiene al menos el 20 % de su actividad.

Otros parámetros de estabilidad también pueden medirse y utilizarse para evaluar una formulación. Por ejemplo, se puede analizar la estabilidad de una proteína en una formulación después de la agitación (sacudida). Esto puede ser un parámetro importante ya que es deseable que las muestras se mantengan estables durante el transporte. La estabilidad de una formulación con respecto a la agitación se analiza sometiendo generalmente la muestra a sacudidas (p. ej., 360 rpm) durante un periodo de tiempo (p. ej., 12 horas, 24 horas, 48 horas, o más), determinando entonces si se produce un aumento en los productos indicativos de inestabilidad (p. ej., especies de alto peso molecular, especies de bajo peso molecular, o especies ácidas) con relación a un control.

Otros procedimientos conocidos en la materia pueden utilizarse para evaluar la estabilidad de una proteína en una formulación. Ejemplos de tales procedimientos incluyen dicroísmo circular, que proporciona tanto información estructural secundaria como terciaria, espectroscopia de fluorescencia (p. ej., en presencia de Bis-ANS, que se une a parches hidrófobos como una indicación de despliegue), calorimetría diferencial de barrido (CDB, que supervisa el despliegue térmico general), y ultrafiltración/diafiltración.

Se puede utilizar más de un parámetro para evaluar la estabilidad de una proteína.

### Temperatura

Es una ventaja de ciertas formulaciones descritas en la presente memoria que proporcionen un procedimiento de almacenamiento de una proteína en una solución mínima, tal que la proteína no muestra degradación o agregación significativa en el tiempo y en un intervalo de temperaturas. En general, una proteína o péptido en la formulación es estable durante al menos tres días (p. ej., dos semanas o cuatro semanas) a temperaturas que oscilan desde aproximadamente -80 °C a aproximadamente 40 °C o desde aproximadamente -80 °C a aproximadamente 8 °C (p. ej., a aproximadamente 5 °C). En algunos casos, es deseable que una formulación sea estable durante largos periodos de tiempo, p. ej., durante al menos 2 meses, tres meses, seis meses, nueve meses, un año, tres años, cinco años, siete años, o diez años.

Además, una proteína incluida en una formulación puede mostrar estabilidad significativa sobre ciclos de congelación-descongelación repetidos, y después de tal tratamiento puede permanecer estable después de ser descongelada. En general, una formulación a congelar es congelada rápidamente, por ejemplo, congelada en nitrógeno líquido. La descongelación puede encontrarse en un intervalo de temperaturas, p. ej., de aproximadamente 0 °C a aproximadamente 25 °C, que es una descongelación lenta; o de aproximadamente 26 °C a 40 °C, que es una descongelación rápida. Un ejemplo de descongelación rápida es descongelar la formulación en un baño de agua a 37 °C. Una proteína en una formulación puede ser estable durante al menos un ciclo de congelación-descongelación, al menos cinco ciclos de congelación-descongelación, o al menos diez ciclos de congelación-descongelación.

Puede ser deseable determinar un régimen óptimo para congelar-descongelar una formulación para conservar la estabilidad, o puede ser deseable identificar una formulación que proporciona la mayor estabilidad para una proteína que se someterá a un ciclo de congelación-descongelación particular. Por consiguiente, en algunas realizaciones, se evalúa este parámetro. Por ejemplo, una formulación de ensayo puede analizarse para la estabilidad en una variedad de condiciones de congelación-descongelación, tales como congelación rápida, congelación lenta, descongelación rápida, descongelación lenta en diversas combinaciones para determinar el procedimiento que produce los productos de menor degradación (p. ej., que tiene la mayor estabilidad).

### Polipéptidos

Los polipéptidos utilizados en las formulaciones descritas en la presente memoria son proteínas generalmente aisladas. Una proteína "aislada" está esencialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente celular o tisular de la que deriva la proteína, o esencialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La expresión "esencialmente libre" significa una preparación de proteína aislada que tiene menos de aproximadamente 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (en peso seco), de otras proteínas (también denominada en la presente memoria como una "proteína contaminante"), o de precursores químicos. Cuando la proteína aislada se produce por recombinación, también es generalmente esencialmente libre de medio de cultivo, es decir, un medio de cultivo representa menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 10 %, o menos de aproximadamente 5 % del volumen de la preparación proteica.

En algunos casos, las combinaciones de proteínas se utilizan en una formulación. Por ejemplo, dos anticuerpos diferentes que se van a preparar como un medicamento pueden almacenarse juntos en la misma formulación. Un anticuerpo también se puede utilizar con una formulación en combinación con otros tipos o proteínas o péptidos, incluyendo péptidos tóxicos. Los péptidos o fragmentos proteicos pueden utilizarse con las formulaciones, p. ej., se puede utilizar un fragmento de anticuerpo, tal como un fragmento Fab.

En general, "proteína" se refiere a una proteína de longitud completa o un fragmento de la misma. Una proteína puede corresponder a una proteína de origen natural o fragmento de la misma, o una proteína modificada por ingeniería genética procedente de, p. ej., mutagénesis o técnicas recombinantes, o un fragmento de la misma. Una proteína puede, en algunos casos incluir un resto no proteínico, tal como una molécula detectable (p. ej., una molécula fluorescente o un radioisótopo), una toxina, un fármaco, o una molécula pequeña. Las proteínas pueden contener, p. ej., aminoácidos de origen no natural. La proteína puede ser una proteína híbrida. La proteína puede incluir más de un tipo de proteína distinta como en un anticuerpo (p. ej., que contiene cadenas tanto pesadas como ligeras) o una proteína de la insulina madura. Un ejemplo de un fragmento proteico que puede utilizarse incluye un fragmento Fab o un fragmento Fc. En algunos casos, un péptido se utiliza con una formulación, o, como se ha descrito anteriormente, una combinación de al menos una proteína y al menos un fragmento peptídico o proteico. Las toxinas proteínicas también se pueden almacenar en las formulaciones, p. ej., solas, conjugadas con otra proteína o péptido, o como una entidad distinta con otra proteína o péptido. En general, las formulaciones proporcionadas en la presente memoria son útiles para cualquier polipéptido (proteína o péptido) como se describe en la presente memoria para las proteínas.

Un péptido es un compuesto que tiene dos o más aminoácidos unidos covalentemente (p. ej., 5, 10, 15, 20, 30, o 50 aminoácidos). En general, una proteína es un polipéptido o múltiples polipéptidos (p. ej., una molécula de anticuerpo que contiene cadenas pesadas y ligeras, o porciones de los mismos) que son al menos 50 aminoácidos de longitud.

Las formulaciones también se pueden utilizar para almacenar polipéptidos que se conjugan con un resto peptídico o no peptídico. Ejemplos de tales restos incluyen, sin limitación, una molécula fluorescente (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, proteína verde fluorescente (PVF), proteína roja fluorescente (PRF), Cy3, Cy3.5, Cy5, o Cy5.5), un resto elemental (p. ej., partículas de oro), un fármaco, o una toxina. Los procedimientos de conjugación de dichas moléculas con un polipéptido se conocen en la materia. Los ejemplos de moléculas incluyen, sin limitación, ricina (Mansfield y col., 1997, *Blood* 90: 2020-2026; Ghetie y col., 1991, *Cancer Res.* 51:5876; Conry y col., 1995, *J. Immunother. Emphas. Tumor Immunol.* 18:231-241), exotoxina A *Pseudomonas* (EP) (Smith, 2001, Seattle Genetics *Curr. Opin. Investig. Drugs* 2(9):1314-1319; Mansfield y col., 1996, *Bioconjug. Chem.* 7:557), taxano (es decir, paclitaxel) (Guillemard y col., 2001, *Cancer Res.* 61: 694-699), doxorubicina (Shouval y col., 1988, *Proc. Nat. Acad. Sci. EE. UU.* 85:8276-8280; Takahashi y col., 1996, *Anticancer Drugs* 7(6):687-696; Shih y col., 1991, *Cancer Res.* 51(16):4192-4198; Shih y col., 1994, *Cancer Immunol. Immunother.* 38(2):92-98; Alexandru y col., 1999, *Cancer Res.* 59:115-121; Trail y col., 1993, *Science* 261:212-215), antracenos (Dias y col., 2005, *Bioconjugate Chem.* 16:949-958), maitansinoide (Tassone y col., 2004, *Cancer Res.* 64:4629-4636; Tolcher y col., 2003, *J. Clin. Oncol.* 21(2):211-222), adriamicina (Hurwitz y col., 1983, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 417:125-36; Takahashi y col., 1988, *Gan No Rinsho* 34:847-50; Deguchi y col., 1987, *J. Urol.* 137(2):353-358), radioisótopos (Karube y col., 1996, *Nuclear Med. Biol.* 23:753-759; Mishra y col., 2004, *J. Drug Target.* 12(9-10):559-567; Lee y col., 2001, *Cancer Res.* 61:4474-4482), metotrexato (Ryser y col., 1988 *J. Cell Physiol.* 135(2):277-284; Mandel y col., 1991, *J. Cell Physiol.* 149(1):60-65), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-*N, N', N'', N'''*-tetraacético (DOTA), p. ej., conjugado con otro resto, tal como itrio 90 (Lu y col., 2005, *J. Pharm. Sci.* 94(4):788-797), estreptavidina (Ngai y col., 1995, *Nucl. Med. Biol.* 22(1), 77-86), productos conjugados con radioisótopos (p. ej., los que figuran en *Biopharmaceutical Products in the U.S. market*, 4ª edición, Rader, ed., Biotechnology Information Institute, Rockville, MD, 2005), incluyendo tecnecio (Tc) 99m, itrio, y radioconjugados In111.

En general, el componente proteico de una formulación es una proteína que tiene un pI relativamente alto, por ejemplo, un pI de al menos 6,0, 7,0, 8,0, u 8,5. La proteína puede tener más de una cadena peptídica al igual que en un anticuerpo. Cuando el componente proteico de una formulación es un anticuerpo, el anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, o un fragmento del mismo (p. ej., un fragmento Fab). Una proteína puede estar presente en una formulación a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml, o aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml. Los anticuerpos específicos utilizados en las formulaciones descritas en la presente memoria son un anticuerpo anti-CD22 monoclonal humanizado, un anticuerpo anti-Lewis Y monoclonal, y un anticuerpo anti-5T4.

Una proteína aislada utilizada en una formulación es generalmente una proteína que tiene potencial como agente terapéutico o potencial para formar parte de un agente terapéutico. Tales proteínas se denominan en la presente memoria como una proteína terapéutica e incluyen anticuerpos.

Los ejemplos de proteínas específicas que se pueden utilizar como se describe en la presente memoria incluyen anticuerpos, tales como anti-CD-22 (véase los documentos US20040082764A1 y US20040192900A1), anti-Lewis Y (documento WO 05/019271A1), y anti-5T4 (véase el documento US n.º de serie 60/608494).

#### pH

Condiciones de pH favorables para una formulación se comprenden entre aproximadamente un pH 4,0 a pH 8,0. En general, el pH es de aproximadamente 5,5-6,0. A un pH de aproximadamente 5,5-6,0, una formulación que contiene un anticuerpo monoclonal puede almacenarse y retener la estabilidad durante al menos tres meses, p. ej., seis meses, un año, o dos años a 0 °C a aproximadamente 8 °C (generalmente a aproximadamente 1 °C a aproximadamente 5 °C), y para el almacenamiento a largo plazo (durante al menos tres años, cinco años, siete años, o diez años), p. ej., a -80 °C.

#### **Identificación de las formulaciones favorables**

En algunos procedimientos descritos en la presente memoria, se identifica una formulación favorable para una proteína de interés específica. En estos procedimientos, una proteína aislada, p. ej., una proteína terapéutica, tal como un anticuerpo, se identifica para almacenarse en una formulación, tal como la descrita en la presente memoria. La proteína puede ser un anticuerpo que se va a almacenar hasta que se pueda utilizar para el procesamiento corriente abajo, tal como para la fabricación de un anticuerpo conjugado con una citotoxina (p. ej., caliqueamicina) para su uso como agente terapéutico. Otros ejemplos incluyen el almacenamiento de un anticuerpo que se va a conjugar con un marcador detectable, tal como fluoresceína, rodamina, o la conjugación con polietilenglicol seguido por liofilización para un almacenamiento mayor del anticuerpo.

Para identificar una formulación favorable para el almacenamiento de la proteína aislada, la proteína se suspende en general en una serie de soluciones de ensayo a un pH que oscila de aproximadamente 4,0-8,0 (p. ej., pH 5,0-6,0) y concentraciones de sal que oscilan de aproximadamente 0 mM-150 mM. Estas soluciones de ensayo se almacenan

a diversas temperaturas durante un periodo de tiempo especificado o por varios momentos diferentes (p. ej., tres días, dos semanas o cuatro semanas). Las muestras se evalúan a continuación para al menos un parámetro de estabilidad, tal como especies de alto peso molecular, especies de bajo peso molecular, un cambio en el porcentaje de especies ácidas, o un cambio en la cantidad de agregados y especies de alto peso molecular. Las muestras en las que el componente proteico de la formulación es estable se seleccionan entonces como formulaciones favorables para el almacenamiento de las especies. Evaluaciones adicionales pueden llevarse a cabo para evaluar otros parámetros de estabilidad, tales como la estabilidad después de ciclos de congelación-descongelación o después de la agitación (sacudida). Los ejemplos proporcionados *supra* proporcionan una guía adicional para procedimientos de identificación de una formulación favorable para el almacenamiento de una proteína aislada específica.

### **Procedimientos de almacenamiento de una proteína**

Los procedimientos de almacenamiento de proteínas o péptidos (p. ej., anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, o proteínas conjugadas con un péptido o resto no peptídico) se proporcionan en la presente memoria. Los procedimientos son particularmente útiles para el almacenamiento de una proteína, tal como un anticuerpo hasta que sean necesarios para la fabricación adicional, p. ej., para la fabricación de un fármaco conjugado con una citotoxina o para la fabricación de un reactivo marcado de forma detectable, o para el almacenamiento de una proteína que se ha modificado, por ejemplo, por conjugación con un péptido o resto no peptídico.

El almacenamiento de una proteína (p. ej., anticuerpo) como parte de una formulación reivindicada proporciona una mayor flexibilidad para el procesamiento corriente abajo en comparación con formulaciones que contienen agentes estabilizadores y/o crioprotectores.

Una formulación también puede utilizarse para proporcionar, p. ej., una sustancia de fármaco de anticuerpo monoclonal estable, o formulación intermedia de sustancia de fármaco para un procesamiento adicional, tal como por conjugación con potentes agentes anti-cáncer, liofilización, o formulación líquida para administración parental. En general, el procedimiento incluye el almacenamiento de una proteína aislada seleccionada como parte de una solución acuosa que no incluye un tensioactivo, no incluye un crioprotector, y tiene una concentración de tampón relativamente baja (p. ej., aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM). En general, la concentración de sal de la formulación es relativamente baja, generalmente menos de aproximadamente 100 mM, p. ej., aproximadamente 0 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 1 mM a aproximadamente 10 mM, o aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM.

Además de las ventajas descritas *supra* y aquellas que resultan de las reivindicaciones, las proteínas almacenadas que se describen en la presente memoria tienen una buena reproducibilidad entre las muestras (p. ej., muestras proteicas a partir de una sola preparación que se alícuota y las alícuotas se almacenaron utilizando una formulación descrita en la presente memoria). Además, las proteínas almacenadas como se describe en la presente memoria son generalmente procesadas posteriormente de manera eficiente al almacenamiento, por ejemplo se conjugan más eficientemente que las proteínas almacenadas con crioprotectores y/o tensioactivos.

### **Ejemplos**

La divulgación se ilustra adicionalmente mediante los siguientes ejemplos. Los ejemplos se proporcionan solamente con fines ilustrativos. No deben interpretarse como limitantes del ámbito o contenido de la invención de modo alguno.

#### **Ejemplo 1: pH**

*Anti-Lewis Y* (ejemplo de referencia)

Para investigar el intervalo de pH en el que un anticuerpo es estable, las muestras de 1 mg/ml de anti-Lewis Y se prepararon en un intervalo de pH de 4 a 8, específicamente a pH 4,0, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, y 8,0. En este Ejemplo y los descritos a continuación, las muestras se preparan generalmente en viales PFA de 5 ml de Teflon® (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL), p. ej., con un volumen total de muestra de 2 ml. Las concentraciones proteicas se determinaron utilizando absorbancia UV a 280 nm medida con un espectrofotómetro Spectra Max® PLUS (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA) para analizar las muestras en placas de UV de 96 pocillos Costar® (Corning, Corning, NY). La concentración proteica se calculó utilizando el coeficiente de absorbancia específica de  $1,36 \text{ (mg/ml)}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Las muestras se prepararon por diálisis en tampones pH que contienen tampón fosfato de potasio 10 mM del pH seleccionado. Cada muestra también contenía NaCl 75 mM. Las muestras preparadas se filtraron de forma estéril y se colocaron en un congelador a  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  o en una cámara de estabilidad mantenida a  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  o  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Después de cuatro semanas, las muestras se analizaron para la presencia de especies de alto peso molecular y especies de bajo peso molecular utilizando CET-HPLC (cromatografía de exclusión por tamaños-cromatografía líquida de alta resolución). El análisis por CET-HPLC se realizó utilizando TosoHaas (Montgomeryville, PA) BIOSEP G3000SW<sub>XL</sub> como la columna de separación utilizando procedimientos conocidos en la materia.

Las muestras congeladas se descongelaron en un baño de agua a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  antes de análisis.

El surgimiento de especies de alto peso molecular aumenta con el pH, pero las especies de alto peso molecular no fueron un producto principal de degradación como función del pH (Fig. 1A). El perfil de pH de las especies de bajo peso molecular para las muestras almacenadas a 40 °C tenía forma de V, con el mínimo de especies de bajo peso molecular a pH 5,5 (Fig. 1B). Por lo tanto, el anticuerpo anti-Lewis Y era estable a un intervalo de temperatura de -80 °C a 5 °C y durante un intervalo de pH de aproximadamente pH 4,0 a 8,0.

CIC-HPLC (cromatografía de intercambio catiónico-HPLC) se utilizó para evaluar aún más la estabilidad de las muestras. Estos análisis se realizaron empleando una columna Dionex ProPac WCX-10 (Sunnyvale, CA). Se descubrió que la concentración de especies ácidas aumentó a un pH alto en las muestras almacenadas a 40 °C. (Fig. 2). No obstante, para las muestras almacenadas a 5 °C y -80 °C, el anti-Lewis Y era estable en todo el intervalo de pH, lo que confirma las conclusiones extraídas de los datos de CIC-HPLC.

Como otro procedimiento para evaluar la estabilidad, se utilizó SDS-PAGE para analizar más a fondo las muestras almacenadas a 40 °C utilizando geles al 4-20 % ejecutados en condiciones reducidas o no reducidas. En estos experimentos, se demostró que la menor cantidad de cambio en el peso molecular, y por lo tanto la mayor parte de la estabilidad, era de esas muestras en el intervalo de pH de 5,0-6,0 (Fig. 3). Por lo tanto, las muestras (p. ej., anticuerpos) que se van a almacenar a 40 °C se mantienen mejor a un pH comprendido entre aproximadamente 5,0 y 6,0.

La electroforesis por isoelectroenfoque (IEE) se utilizó para evaluar aún más las muestras almacenadas a 40 °C. La electroforesis por IEE se utilizó para supervisar los cambios en pI de las muestras de anticuerpos debido a la producción de especies ácidas como resultado de la degradación de proteínas.

Acorde con los resultados del análisis por SDS-PAGE de las muestras de anticuerpo, esas muestras en el intervalo de pH de 5,0-5,5 mostraron la menor cantidad de cambio en la carga general de proteínas (Fig. 4).

Un aspecto importante de almacenamiento es la estabilidad del pH de una formulación con el tiempo. Por lo tanto, el pH de las muestras se analizó al inicio del experimento, después de dos semanas, y después de cuatro semanas de almacenamiento en tres temperaturas. No había desviación alguna significativa del pH de partida en ninguna de las muestras (Tabla 1).

Tabla 1: medición del pH de las muestras de estabilidad por detección del pH de anti-Lewis Y

pH diana	pH medido						
	Tiempo 0	2 semanas			4 semanas		
		-80 °C	5 °C	40 °C	-80 °C	5 °C	40 °C
4,00	4,01	4,01	4,02	4,02	4,05	4,07	4,03
5,00	5,01	5,02	5,01	5,02	5,07	5,06	5,02
5,50	5,51	5,52	5,52	5,52	5,55	5,57	5,54
6,00	6,00	5,99	5,99	6,00	6,04	6,06	6,02
6,50	6,51	6,51	6,51	6,50	6,55	6,56	6,53
7,00	7,03	7,03	7,00	6,99	7,04	7,05	7,01
8,00	8,01	7,97	7,96	7,92	7,97	7,97	7,91

Juntos, los datos presentados *supra* demuestran que el anti-Lewis Y es estable en un intervalo de temperatura de -80 °C a 5 °C y en un intervalo de pH de 4-8. En general, un pH favorable para el almacenamiento de este anticuerpo es de aproximadamente 5,5. Esto también proporciona condiciones relativamente favorables para el almacenamiento del anticuerpo a 40 °C.

En general, se selecciona un pH para el almacenamiento de proteínas que resulta en la estabilidad en un intervalo de dos o más temperaturas, por ejemplo, cuando la muestra se almacena por debajo de 0 °C, cuando la muestra se almacena entre aproximadamente 0 °C y 15 °C, y cuando la muestra se almacena entre aproximadamente 15 °C y 40 °C. En otro ejemplo no limitativo, cuando la muestra se almacena a aproximadamente -80 °C, 5 °C, y 40 °C.

Anti-CD22

Los efectos del pH sobre el almacenamiento de un segundo anticuerpo (anti-CD22), un anticuerpo IgG4 humanizado que se orienta selectivamente a CD22, que se expresa en la superficie de linfocitos B maduros normales y malignos, se ensayaron también. El pI teórico del anti-CD22 es de aproximadamente 8,5. Considerando que es probable que la hidrólisis se produzca a pH 5,0 y por debajo, la desamidación es probable a un pH superior a 7,5. Por lo tanto, se diseñaron experimentos para abarcar un intervalo de pH de 4 a 8 para ensayar el efecto del pH sobre la estabilidad de la proteína, para evaluar la capacidad de indicador de la estabilidad de los procedimientos analíticos, y para proporcionar un fundamento para la selección del pH apropiado para una formulación de almacenamiento proteico.

Las muestras que contienen anti-CD22 se prepararon con un contenido de 0,5 mg/ml de anti-CD22 en diversos tampones a los valores de pH a ensayar. Las muestras se almacenaron durante dos semanas a 5 °C, 25 °C, o 40 °C, a un pH de 4,0 (succinato 10 mM), 5,0 (citrato 10 mM), 5,5 (succinato 10 mM), 6,0 (histidina 10 mM), 6,5 (histidina 10 mM), 7,0 (fosfato 10 mM), u 8,0 (Tris 10 mM). Las muestras se analizaron para el porcentaje de especies de alto peso molecular presentes utilizando CET-HPLC. En estas muestras (que contienen cada una 0,5 mg/ml de anti-CD22), no hubo aumento significativo en el porcentaje de especies de alto peso molecular en las muestras en el intervalo de pH de 5,0 a 8,0 en comparación con la cantidad presente en las condiciones iniciales después de dos semanas (Fig. 5).

Cuando un anticuerpo, tal como un anticuerpo anti-CD22 se utiliza para un procesamiento adicional (corriente abajo), se ha de prestar atención a la presentación de la sustancia intermedia en un tampón apropiado para el procesamiento adicional. Por ejemplo, la conjugación de caliqueamicina con un anticuerpo anti-CD22 puede realizarse en un tampón que no contiene amina primaria a un pH 7 a 8,5. Sin embargo, puede que no sea necesario para la sustancia intermedia que se proporciona en el tampón de conjugación. En este ejemplo, la formulación de la sustancia intermedia se verá limitada en que las aminas primarias en los componentes del tampón podrían interferir con el procedimiento de conjugación. Para investigar el almacenamiento de proteínas en una solución que no contiene aminas primarias, se llevaron a cabo experimentos en los que anti-CD22 se concentró a 25 mg/ml y se diafiltró o dializó en cualquiera de HEPES 50 mM (pH 7,6), succinato 50 mM (pH 6,0), o succinato 50 mM + HEPES 50 mM (pH 7,0). Cada muestra se ensayó durante hasta dos semanas para la estabilidad. Las muestras se prepararon con o sin NaCl 75 mM y se almacenaron a -80 °C, 4 °C, o 40 °C. Las muestras se analizaron en el tiempo = 0, una semana, y dos semanas por  $A_{280}/A_{320}$ , CET-HPLC, SDS-PAGE, e IEE (en dos semanas).

Los datos de estos experimentos demostraron que el pH 6,0 (tampón succinato) proporciona una mayor estabilidad que pH 7,0 (HEPES) o una combinación a pH 7,6 (HEPES y succinato) (Fig. 6).

CET-HPLC también se utilizó para evaluar el porcentaje de especies de alto peso molecular en muestras que contenían 25 mg/ml de anti-CD22 a pH 6,0, 7,0, o 7,6 en succinato, HEPES, o una combinación (como se ha descrito *supra*) que se almacenó durante dos semanas a -80 °C, 5 °C, o 40 °C, en presencia o ausencia de NaCl 75 mM. Estos datos demostraron que la sal (NaCl) no tuvo ningún efecto significativo sobre la formación de especies de alto peso molecular en estas muestras (Fig. 6). Por lo tanto, la presencia de sal no es una condición esencial para el almacenamiento de anticuerpos.

### Ejemplo 2: pH/tampones (ejemplo de referencia)

Para determinar si diferentes tampones proporcionan condiciones de almacenamiento favorables a diferentes pH, tampones se ensayaron a un pH de 0,5 unidades por encima y por debajo del pH "óptimo" tentativo utilizando el anticuerpo anti-Lewis Y como la muestra almacenada. En estos experimentos, cuatro sistemas tampón diferentes se ensayaron en el intervalo de pH de 5,0 a 6,0. También se evaluó el efecto de varias fuerzas iónicas sobre la estabilidad. Los tampones utilizados en estos experimentos fueron acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, 5,5, y 6,0; 10 mM de acetato de sodio, NaCl 75 mM, pH 5,0, 5,5 y 6,0; citrato de sodio 10 mM, pH 5,0, 5,5, y 6,0; citrato de sodio 10 mM, NaCl 75 mM, pH 5,0, 5,5 y 6,0; fosfato de sodio 10 mM, pH 5,0, 5,5, y 6,0; fosfato de sodio 10 mM, NaCl 75 mM, pH 5,0, 5,5, y 6,0; succinato de sodio 10 mM, pH 5,0, 5,5, y 6,0; y succinato de sodio 10 mM, NaCl 75 mM, pH 5,0, 5,5, y 6,0. En estos experimentos, anti-Lewis Y se dializó en los tampones anteriores y se diluyó a una concentración final de 1 mg/ml. Las muestras se almacenaron a -80 °C o 40 °C durante hasta 4 semanas, y luego se analizaron para el porcentaje de especies de alto peso molecular y el porcentaje de especies de bajo peso molecular utilizando CET-HPLC. En estos experimentos, se descubrió que las especies de alto peso molecular no eran el principal producto de degradación, y la diferencia en el nivel de especies de alto peso molecular entre las diferentes formulaciones fue insignificante (Fig. 7A). A un pH 5,5, la muestra de citrato de sodio demostró el nivel más bajo de las especies de bajo peso molecular entre todos los tampones (con o sin adición de NaCl) (Fig. 7B).

Las muestras se analizaron adicionalmente utilizando CIC-HPLC. Estos datos confirmaron las observaciones generales de los datos de CET-HPLC en que no hubo un aumento del porcentaje de especies ácidas presentes en el de las muestras de pH mayores en los cuatro tampones ensayados (Fig. 8), Es decir, hay una tendencia al alza de especies ácidas para todos los tampones en el intervalo de pH de 5,0 a 6,0.

Estos datos demuestran que, en general, la estabilidad de anti-Lewis Y fue similar en los cuatro tampones ensayados (acetato, citrato, fosfato y succinato Na) en un intervalo de pH de 5,0 a 6,0. Además, en el estudio de estabilidad acelerada (examen de la estabilidad a 40 °C; Fig. 7B), la cantidad inferior de formación de especies de bajo peso molecular estaba en la muestra que contenía tampón citrato Na. Por lo tanto, un tampón favorable para el anti-Lewis Y es citrato Na 10 mM, pH 5,5. Estos datos también demuestran un procedimiento de identificación de una formulación favorable para el almacenamiento de una proteína, tal como un anticuerpo.

### Ejemplo 3 Concentración de sal y concentración de proteínas (ejemplo de referencia)

La concentración de sal se examinó como un parámetro que puede tener un efecto sobre la estabilidad de una proteína en una formulación de almacenamiento. La estabilidad de almacenamiento a una baja concentración de proteínas se evaluó también en el protocolo de degradación acelerada descrito en el Ejemplo 2. En estos

experimentos, se descubrió que a una concentración de proteínas de 1 mg/ml, la adición de NaCl promovió ligeramente la formación de especies de bajo peso molecular (Fig. 7B) mientras se suprime la formación de especies ácidas (Fig. 8) en todos los búferes sometidos a ensayo.

5 CIC-HPLC y CET-HPLC se utilizaron para evaluar la estabilidad de anti-Lewis Y en citrato Na 10 mM, pH 5,5 que contenía diferentes molaridades de NaCl. Estos datos demostraron que el anti-Lewis Y era estable a 5 °C y -80 °C en citrato Na 10 mM, pH 5,5 que contenía NaCl 0-150 mM (Fig. 9A). La degradación acelerada muestra a 30 mg/ml la concentración de proteínas, NaCl suprime la aparición de especies ácidas (Fig. 9A) pero la formación elevada de especies de bajo peso molecular (Fig. 9C) y la formación de especies de alto peso molecular eran relativamente estables en las diferentes condiciones (Fig. 9B), lo que confirma la observación de las muestras que contienen 10 mg/ml de proteínas (Figs. 7 y 8). De este modo, se descubrió que una concentración de sal de NaCl 75 mM era la más favorable para minimizar la degradación general.

#### Estabilidad con sacudida (ejemplo de referencia)

15 Otra condición que puede afectar a la estabilidad de una proteína es la cantidad de agitación experimentada por la muestra. Por lo tanto, es deseable que una formulación de almacenamiento conserve una cierta cantidad de estabilidad cuando se agite la muestra. Se realizaron experimentos para ensayar la estabilidad de anti-Lewis Y en una formulación en diversas condiciones y se incubó con agitación. En estos experimentos, las formulaciones que contenían o bien 1 mg/ml o bien 30 mg/ml de anti-Lewis Y en citrato Na 10 mM, pH 5,5 en presencia o ausencia de NaCl 150 mM se ensayaron mediante sacudidas a 360 rpm durante 24 horas a temperatura ambiente y el porcentaje de recuperación de monómeros se ensayó utilizando CET-HPLC.

20 Estos experimentos demostraron que el anticuerpo era estable cuando está presente a una concentración de 30 mg/ml cuando se somete a sacudida (Fig. 10). Se descubrió también que a 1 mg/ml, NaCl redujo ligeramente la recuperación de monómeros.

Por consiguiente, la formulación de almacenamiento simple puede proporcionar una protección suficiente del esfuerzo a la muestra inducida por sacudida.

#### Estabilidad bajo congelamiento/descongelamiento (ejemplo de referencia)

30 Las proteínas que se utilizan para diversos procedimientos de fabricación pueden someterse necesariamente a ciclos de congelación-descongelación, de hecho, a veces a múltiples ciclos de congelación-descongelación. Resulta, por lo tanto, ventajoso para una formulación de almacenamiento proporcionar condiciones en las que hay una mínima degradación causada por los ciclos de congelación-descongelación. Además, es útil para determinar qué condiciones de congelación y descongelación proporcionan una conservación óptima de la proteína. Para ensayar estos parámetros, se prepararon muestras que contenían anti-Lewis Y a 1 mg/ml o 30 mg/ml en citrato Na 10 mM, pH 5,5, en presencia o ausencia de NaCl 150 mM. Estas muestras se sometieron después a diez ciclos de congelación-descongelación con condiciones de congelación rápida/descongelación rápida, congelación rápida/descongelación lenta, congelación lenta/descongelación rápida, o congelación lenta/descongelación lenta. La congelación rápida se realizó por congelación de la muestra en nitrógeno líquido y la congelación lenta se realizó colocando la muestra a -80 °C. La descongelación rápida se realizó descongelando la muestra en un baño de agua a 37 °C y la descongelación lenta se realizó colocando la muestra a temperatura ambiente. Se evaluó entonces la cantidad de monómeros en cada muestra utilizando CET-HPLC.

40 Los resultados de estos experimentos mostraron que el anti-Lewis Y era estable en una alta concentración de proteínas (30 mg/ml) independientemente de las condiciones de congelación/descongelación o la concentración de NaCl (Fig. 11A y Fig. 11B). El anti-Lewis Y era estable en condiciones de congelación lenta, independientemente de la concentración de proteínas, las condiciones de descongelación, o la concentración de NaCl. No obstante, a 1 mg/ml, NaCl en la formulación reduce ligeramente la recuperación en condiciones de congelación rápida.

45 En vista de lo anterior, se puede concluir que el anti-Lewis Y es estable a -80 °C y 5 °C en una concentración de NaCl que oscila de 0 mM-150 mM. Además, un estudio de estabilidad acelerada (un estudio de formulaciones a 40 °C) mostró que NaCl redujo ligeramente la formación de especies ácidas, mientras que promovió una aparición de especies de bajo peso molecular. En vista de estos resultados, se descubrió que NaCl 75 mM era óptimo para minimizar la degradación general del anti-Lewis Y.

50 Estos experimentos demuestran también procedimientos para identificar condiciones favorables para una proteína específica que se almacena en una formulación descrita en la presente memoria.

#### Anti-CD22

55 Para examinar la variabilidad de las condiciones de almacenamiento entre diferentes proteínas y validar aún más los procedimientos de identificación de formulaciones de almacenamiento para una proteína específica, se investigó la estabilidad de almacenamiento de un anti-CD22. En estos experimentos, las formulaciones que contienen 25 mg/ml de anti-CD22 (Fig. 6) se prepararon en diversos tampones para conseguir el pH deseado; pH 6,0 (succinato 50 mM); pH 7,0 (succinato 50 mM y HEPES 50 mM); pH 7,6 (HEPES 50 mM), y se almacenaron durante un mes a -80 °C,

5 °C, 25 °C, o 40 °C, después se evaluaron para el porcentaje de especies de alto peso molecular.

Se descubrió que NaCl no tuvo efecto alguno sobre la estabilidad de almacenamiento de anti-CD22 en altas concentraciones de proteínas (Fig. 6 y Fig. 12) en cualquiera de las temperaturas ensayadas.

#### Estabilidad bajo tensión por sacudida

5 Un estudio de sacudida se realizó para determinar los efectos de interacción de superficie/aire en anti-CD22 en presencia de NaCl y polisorbato 80. Este estudio también se realizó para evaluar la estabilidad de anti-CD22 como un líquido durante el envío y la fabricación. En estos experimentos, se prepararon muestras que contenían 15 mg/ml de anti-CD22 en tampón succinato 20 mM, pH 6,0, una adición de NaCl 75 mM, polisorbato 80 al 0,1 %, o NaCl 75 mM más polisorbato 80 al 0,1 %. (Tween) Las muestras se sacudieron a 300 rpm durante 24 horas. Asimismo se preparó un control que contenía sólo el anti-CD22 en tampón succinato. A continuación, se analizó el porcentaje de especies de alto peso molecular. Estos datos demuestran que ni NaCl ni polisorbato 80 son beneficiosos para la estabilidad de anti-CD22 durante la sacudida (Fig. 13).

10 En general, los datos presentados anteriormente para anti-CD22 en una formulación de almacenamiento demuestran que NaCl no tiene efecto alguno sustancial sobre la estabilidad general de anti-CD22. Por lo tanto, NaCl no es necesario en la formulación con anti-CD22.

#### **Ejemplo 4: Concentración de anticuerpos (ejemplo de referencia)**

Se examinaron los efectos de la concentración de proteínas en la estabilidad de almacenamiento de una formulación. La determinación de una concentración de proteínas favorable es deseable cuando se identifica una formulación de almacenamiento para una proteína específica, así como el descubrimiento de los principios generales relativos a la importancia de este parámetro en una formulación.

20 En estos experimentos, se prepararon muestras que contenían anti-Lewis Y en citrato 10 mM, pH 5,5 a una concentración de 1 mg/ml o 30 mg/ml y que contenía o bien muestras sin NaCl o NaCl 75 mM. Las muestras se almacenaron durante cuatro semanas a 40 °C, después se analizaron para el cambio en el porcentaje de especies de alto peso molecular (Fig. 14A), para el cambio en el porcentaje de especies de bajo peso molecular (Fig. 14B), y para el cambio en el porcentaje de especies ácidas (Fig. 14C).

25 Los resultados de estos experimentos revelaron estabilidad comparable para formulaciones que contenían 1 mg/ml y 30 mg/ml, con la concentración más baja (1 mg/ml) sólo ligeramente más sensible a la presencia de NaCl.

30 La estabilidad sostenida es particularmente deseable en una formulación de almacenamiento. Por consiguiente, se llevó a cabo un estudio para determinar la estabilidad de formulaciones de 30 mg/ml de anti-Lewis Y que contenían 30 mg/ml de anti-Lewis Y en citrato Na 10 mM, pH 5,5 y NaCl 75 mM a diversas temperaturas: -80 °C, -20 °C, 5 °C, 25 °C, y 40 °C. Las muestras se ensayaron en un mes, dos meses, tres meses, seis meses, y nueve meses para el porcentaje de especies de alto peso molecular (Fig. 15A), el porcentaje de especies de bajo peso molecular (Fig. 15B), y el porcentaje de especies ácidas (Fig. 15C). El análisis de estos datos demostraron que había una buena estabilidad de proteínas de anti-Lewis Y después de 9 meses de almacenamiento a un intervalo de temperatura de -80 °C a 5 °C en la formulación de citrato Na 10 mM, NaCl 75 mM, pH 5,5.

#### Congelación/descongelación y estabilidad a las sacudidas (ejemplo de referencia)

40 Como se ha mostrado anteriormente, (Fig. 10 y Fig. 11), parecía que anti-Lewis Y no era sensible a la tensión por sacudidas y por congelación/descongelación a una concentración de 30 mg/ml. Además, el anti-Lewis Y no fue sensible en la reducción de la congelación lenta a una concentración de 1 mg/ml independientemente de la velocidad de descongelación, pero la pérdida de la proteína se descubrió a una concentración de 1 mg/ml de anti-Lewis Y con agitación así como cuando se coloca en condiciones de congelación rápida.

#### Anti-CD22/congelación/descongelación

45 Para investigar más los efectos de los ciclos de congelación-descongelación, anti-CD22 a una concentración de 1 mg/ml o 25 mg/ml en succinato 20 mM, pH 6,0 y, opcionalmente, que contiene polisorbato 80 (0,001 %), se sometió a varios regímenes de congelación-descongelación y cero, uno, cinco, o 10 ciclos del régimen. Los regímenes eran congelación rápida/descongelación rápida (CR/DR), congelación rápida/descongelación lenta (CR/DL), congelación lenta/descongelación rápida (CL/DR), y congelación lenta/descongelación lenta (CL/DL). A continuación, se analizó el porcentaje de especies de APM.

50 Estos datos demuestran que a 25 mg/ml, anti-CD22 no es sensible a tensión por congelación/descongelación, independientemente de la presencia de polisorbato 80 (Fig. 16B y Fig. 16D). No obstante, a una concentración de 1 mg/ml, anti-CD22 es sensible a una congelación rápida (Fig. 16A y Fig. 16C). De este modo, para este anticuerpo, si la muestra se somete a ciclos de congelación-descongelación, una concentración de almacenamiento superior ha de seleccionarse aunque no es necesario incluir un tensioactivo.

#### Estabilidad de almacenamiento

Las Figs. 5 y 6, muestran los resultados de experimentos que demuestran que anti-CD22 es estable a -80 °C a 5 °C a 0,5 mg/ml y a 30 mg/ml. A 40 °C, el porcentaje de especies de alto peso molecular aumentó en la muestra que contiene la concentración de proteína más alta después de dos semanas de almacenamiento (Fig. 6), mientras que no se detectó cambio alguno en el porcentaje de especies de alto peso molecular en muestras que contienen concentraciones bajas de proteína (Fig. 5).

#### **Ejemplo 5: Efectos del tensioactivo (ejemplo de referencia)**

Muchos protocolos para el almacenamiento de muestras de proteínas requieren la inclusión de un tensioactivo. Por lo tanto, se investigó la necesidad de incluir tensioactivo en una formulación de almacenamiento. En estos experimentos, el anticuerpo anti-Lewis Y a una concentración de 1 mg/ml o 30 mg/ml en un tampón de citrato Na 10 mM y, opcionalmente, que contiene polisorbato 80 al 0 %, 0,001 %, 0,005 % o 0,01 %, se incubó con sacudida a 360 rpm a temperatura ambiente durante 24 horas. A continuación, el porcentaje de recuperación de monómeros se analizó utilizando CET-HPLC.

Los datos demostraron que no se requiere polisorbato 80 cuando está presente en la proteína de la formulación a una concentración relativamente alta de 30 mg/ml de la proteína. A 1 mg/ml, polisorbato 80 proporcionó una cierta protección de anti-Lewis Y contra la tensión por agitación (Fig. 17A y Fig. 17B).

#### Estabilidad por congelación/descongelación (ejemplo de referencia)

Se examinó el efecto de polisorbato 80 en la estabilidad de anti-Lewis Y durante las diversas condiciones de congelación/descongelación. En estos experimentos, se prepararon muestras que contienen o bien 1 mg/ml o bien 30 mg/ml de anticuerpo anti-Lewis Y en citrato Na 10 mM, pH 5,5, y que no contiene polisorbato 80 o polisorbato 80 al 0,01 %. Las muestras se sometieron a continuación a 10 ciclos de congelación/descongelación como se ha descrito anteriormente.

A 30 mg/ml, anti-Lewis Y no fue sensible a tensión por congelación/descongelación independientemente de la presencia de tensioactivo (Fig. 18B). Anti-Lewis Y también era estable en condiciones de congelación lenta, independientemente de la concentración de proteína o condiciones de descongelación (Fig. 18A y Fig. 18B). Polisorbato 80 no afectó a los resultados a 30 mg/ml de concentración proteica o si se utilizó congelación lenta. En las muestras que contienen 1 mg/ml de anticuerpo, polisorbato 80 protegió anti-Lewis Y en condiciones de congelación rápida (Fig. 18A).

#### Estabilidad de almacenamiento (ejemplo de referencia)

Se investigó el efecto del surfactante sobre la estabilidad de almacenamiento de anti-Lewis Y. En estos experimentos, se prepararon muestras que contenían 30 mg/ml de anti-Lewis Y en citrato Na 10 mM, pH 5,5 y NaCl 75 mM. Además, las muestras o bien tenían polisorbato 80 al 0,001 % o no tenían polisorbato 80. Las muestras se incubaron a -80 °C, -20 °C, 5 °C, 25 °C, o 40 °C durante un mes, dos meses, tres meses, seis meses, o nueve meses y se analizó el porcentaje de especies de alto peso molecular, el porcentaje de especies de bajo peso molecular, y el porcentaje de especies ácidas como se describe en la presente memoria.

En general, estos experimentos demostraron que el polisorbato 80 no tuvo ningún efecto significativo sobre la estabilidad de anti-Lewis Y en condiciones de ensayo sobre el intervalo completo de temperaturas, -80 °C a 40 °C. (Figs. 19A, 19B, y 19C).

En general, los resultados de experimentos con anti-Lewis Y demuestran que a una concentración de 30 mg/ml, anti-Lewis Y es estable en condiciones de agitación y condiciones de tensión por congelación/descongelación. El surfactante no es necesario para efectuar esta estabilidad. A una concentración de 1 mg/ml, anti-Lewis es estable en condiciones de congelación lenta. El surfactante no es necesario para efectuar esta condición. Además, en una concentración de anticuerpo de 1 mg/ml, polisorbato 80 protege al anti-Lewis Y contra la agitación y la congelación rápida inducida por la desnaturalización y, en general, el tensioactivo no tiene ningún efecto significativo sobre la estabilidad de la proteína durante el almacenamiento.

#### Estabilidad de almacenamiento, CD22

En contraste con los resultados con anti-Lewis Y, polisorbato 80 no es totalmente protector con respecto a anti-CD22 contra la tensión por sacudida (Fig. 13). No obstante, como se indica en los datos de la Fig. 16, a 25 mg/ml, anti-CD22 es estable en tensión por congelación/descongelación y no se necesita tensioactivo. A 1 mg/ml, anti-CD22 es estable en condiciones de congelación lenta y no se necesita tensioactivo. El tensioactivo proporcionó protección adicional a anti-CD22 sólo en condiciones de congelación rápida.

Para investigar más a fondo los efectos del surfactante sobre anti-CD22, se desarrolló un estudio de seis meses para la estabilidad de anti-CD22. En estos experimentos, se preparó anti-CD22 a una concentración de 25 mg/ml de succinato 20 mM, pH 6,0 (S); succinato 20 mM, metionina 10 mM, pH 6,0 (SM); succinato 20 mM, polisorbato 80 al 0,01 %, pH 6,0 (ST); o succinato 20 mM, metionina 10 mM, polisorbato 80 al 0,01 %, pH 6,0 (SMT); y se incubó durante seis meses a -80 °C, 2-8 °C, 25 °C, o 40 °C. Las muestras se analizaron entonces para el porcentaje de

especies de alto peso molecular, porcentaje del área del pico total (que es una indicación de recuperación), y el porcentaje de especies completamente activas. Tenga en cuenta que el pico 5 es la especie totalmente activa.

En general, ninguno de los parámetros mostró efecto significativo sobre la estabilidad de anti-CD22 (Fig. 20A, Fig. 20B y Fig. 20C).

- 5 En general, tanto los datos de almacenamiento a largo plazo de dos anticuerpos diferentes (un anti-Lewis Y y un anti-CD22) demuestran que el tensioactivo (polisorbato 80) no es necesario para la estabilización de anticuerpos en una formulación de almacenamiento.

#### **Ejemplo 6: Formulación para el almacenamiento de anti-5T4 (ejemplo de referencia)**

- 10 Como otro ejemplo de la determinación de una formulación para el almacenamiento de una proteína, se evaluaron los parámetros de la concentración de sal, pH, concentración de proteínas y tipo de tampón y la concentración para el almacenamiento de un anticuerpo dirigido contra 5T4.

#### pH

- 15 Para identificar un pH ventajoso que se va a utilizar en una formulación para el almacenamiento de un anticuerpo anti-5T4, las muestras que contienen 1 mg/ml de anti-5T4 se ensayaron a un intervalo de pH desde pH 4,0 a pH 8,0. Las muestras se prepararon por diálisis en cada tampón de pH. Todas las formulaciones utilizadas en estos experimentos emplearon tampón fosfato de sodio 10 mM con o sin NaCl 150 mM. La proteína en una formulación se esterilizó por filtración y se colocó en un congelador a -80 °C o en una cámara de estabilidad mantenida a 5 °C, 25 °C, o 40 °C. Las muestras se analizaron para la presencia de especies de alto peso molecular (APM) (Fig. 21).

- 20 Se descubrió que anti-5T4 tenía la menor cantidad de especies de alto peso molecular en ausencia de NaCl a 5 °C, 25 °C, y 40 °C durante todo el intervalo de pH en tampón fosfato de sodio 10 mM. El anticuerpo no era estable a un ciclo de congelación/descongelación a pH 7 en una formulación que contiene NaCl y a un pH 8 con fosfato de sodio como tampón. También se observó que la proteína era inestable a pH 4 con NaCl 150 mM a 40 °C.

- 25 El isoelectroenfoque (IEE) se realizó en muestras preparadas y almacenadas a varios pHs (como se ha descrito anteriormente) y almacenadas a 40 °C durante dos semanas. Se descubrió que las muestras almacenadas en una formulación a pH 4 (sin NaCl) y a pH 5 y pH 6 (con o sin NaCl) mostraron la menor cantidad de cambio en la carga general de la proteína.

- 30 También se realizó un análisis por SDS-PAGE de muestras de detección de pH de anti-5T4 almacenadas a 40 °C durante dos semanas. Las muestras en el intervalo de pH del pH 5,0 a pH 7,0 muestran menor cantidad de especies de alto peso molecular en el gel no reducido y la menor cantidad de cambio en el peso molecular de proteínas en comparación con el material de partida en un gel reducido.

Estos datos demuestran que el anti-5T4 es estable en fosfato de sodio 10 mM en presencia o ausencia de NaCl a -80 °C, 5 °C, y 25 °C en el intervalo de pH de pH 4,0 a pH 7,0. En base a los resultados acelerados (es decir, los resultados obtenidos a temperaturas más altas) de la detección de pH, pH 5 a pH 6 se selecciona como el intervalo de pH ventajoso para la estabilidad de anti-5T4.

#### 35 Tampones

- 40 Cuatro sistemas tampón diferentes se ensayaron para el almacenamiento estable de anti-5T4 en formulaciones en el intervalo de pH de 5,0 a 7,0. También se evaluó el efecto de la fuerza iónica sobre la estabilidad. Estos sistemas tampón utilizados fueron acetato de sodio 10 mM, pH 5,0; acetato de sodio 10 mM 5,5; acetato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 5,0; acetato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 5,5; citrato de sodio 10 mM, pH 5,0; citrato de sodio 10 mM, pH 5,5; citrato de sodio 10 mM, pH 6,0; citrato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 5,0; citrato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 5,5; citrato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0; fosfato de sodio 10 mM, pH 6,0; fosfato de sodio 10 mM, pH 6,5; fosfato de sodio 10 mM, pH 7,0; fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0; fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5; fosfato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0; succinato de sodio 10 mM, pH 5,0; succinato de sodio 10 mM, 5,5; succinato de sodio 10 mM, pH 6,0; succinato de sodio 10 mM, pH 6,5; succinato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 5,0; succinato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 5,5; succinato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0; y succinato de sodio 10 mM, NaCl 150 mM, pH 6,5.

- 50 Anti-5T4 se dializó en los tampones anteriores y se diluyó a una concentración final de 2 mg/ml. Las muestras se almacenaron a -80 °C y 40 °C durante hasta cuatro semanas, y luego se analizaron utilizando CET-HPLC de muestras iniciales (antes del almacenamiento) y después del almacenamiento durante cuatro semanas. En estos datos (Fig. 22), se descubrió que las especies de alto peso molecular no eran los principales productos de degradación y el porcentaje de especies de alto peso molecular en cada formulación después de cuatro semanas de almacenamiento era comparable, o menor que, el porcentaje de especies de alto peso molecular presentes en las muestras iniciales. Las especies de bajo peso molecular se elevaron en la mayoría de las formulaciones que contenían NaCl.

Las masas fundidas térmicas ( $M_t$ s) se realizaron para evaluar el efecto del almacenamiento en diversas formulaciones sobre la estabilidad térmica de una proteína (anti-5T4). La calorimetría diferencial de barrido (CDB) se utilizó para generar termogramas. Ejemplos de tales termogramas se muestran en la Fig. 23A. Los resultados de calorimetría diferencial de barrido se ilustran en la Fig. 23B.

5 La proteína en formulaciones que tienen un pH de 5,0 fueron las menos estables térmicamente cuando la formulación utilizó citrato o succinato como tampón. Se descubrió que NaCl era térmicamente desestabilizadora puesto que los valores  $M_t$  fueron inferiores en cada condición de pH/tampón en comparación con sus correspondientes formulaciones libres de NaCl. Las otras formulaciones en el intervalo de pH de 5,5 a 7,0 en  
10 tampones acetato, citrato, succinato, y fosfato exhibieron los valores más altos de  $M_t$ s y, por lo tanto, la mayor estabilidad térmica.

CIC-HPLC también se utilizó para analizar la estabilidad de anti-5T4. En estos estudios, CIC-HPLC se realizó sobre muestras después de un almacenamiento durante cuatro semanas a 40 °C. Estos resultados se ilustran en la Fig. 25 y demuestran un aumento en el porcentaje de especies ácidas y una disminución en el porcentaje de especies básicas a un pH superior para los cuatro tampones ensayados. Algunas de las formulaciones que contienen NaCl  
15 también tenían niveles más altos de especies ácidas y niveles más bajos de especies básicas que las formulaciones correspondientes libres de NaCl.

Para analizar adicionalmente la estabilidad de las diversas formulaciones, la reducción por SDS-PAGE se realizó sobre las muestras después de un almacenamiento durante cuatro semanas a 40 °C. El análisis de estas muestras demostró que las muestras almacenadas en las formulaciones de pH 5,5 y pH 6,0 retuvieron la menor cantidad de  
20 cambio en el peso molecular de proteínas en comparación con el material de partida en el gel reductor.

En general, estos datos demuestran que la proteína de anti-5T4 utilizada en estos experimentos tenía una estabilidad similar en los cuatro tampones ensayados (acetato, citrato, fosfato y succinato de sodio) cuando se almacenan a un pH de pH 5,5 a 6,5. Un estudio de estabilidad acelerada mostró que la menor cantidad de especies de bajo peso molecular formó las formulaciones que no contenían NaCl.

#### 25 Efecto de la sal (NaCl)

Como se ha ilustrado anteriormente, anti-5T4 es estable en fosfato de sodio 10 mM en formulaciones a pH 5-6 a -80 °C, 5 °C, y 25 °C en NaCl 150 mM. No obstante, NaCl no mejoró la estabilidad y, por lo tanto, no proporcionó ningún beneficio de estabilidad (Fig. 21).

Los resultados de un estudio de estabilidad acelerada a 40 °C demostraron que NaCl promueve la formación de alto peso molecular y de bajo peso molecular y reduce la estabilidad térmica del anticuerpo (Fig. 22, Fig. 24A, Fig. 24B y  
30 Fig. 25).

#### Concentración de anticuerpos

Se examinaron los efectos de la concentración de anticuerpos (proteínas) sobre la estabilidad de almacenamiento. En estos experimentos, sistemas de tampón acetato de sodio, citrato de sodio, y succinato de sodio, se ensayaron  
35 de nuevo con un estrecho intervalo de pH; a partir 5,5 a 6,5. Anti-5T4 se dializó en los tampones y se diluyó a una concentración final de 2 mg/ml. Un conjunto adicional de las muestras se preparó con una concentración de 30 mg/ml en citrato o succinato. Las muestras se almacenaron a -80 °C y 40 °C durante hasta seis semanas, y luego se analizaron. La Fig. 26A y Fig. 26B ilustran los resultados del análisis por CET-HPLC de estas muestras. En general, estos datos demuestran que se observa una estabilidad comparable para las formulaciones de 2 mg/ml y 30 mg/ml,  
40 aunque la concentración de proteína más alta acumuló una cantidad ligeramente mayor de especies de alto peso molecular después de seis semanas a 40 °C.

CIC-HPLC también se realizó en estas muestras después de 6 semanas de almacenamiento a 40 °C. La estabilidad comparable fue observada para formulaciones de pH 5,5 que contienen 2 mg/ml o 30 mg/ml, aunque las muestras de pH 5,5 a 2 mg/ml tuvieron un porcentaje ligeramente menor de especies ácidas después del almacenamiento  
45 durante seis semanas a 40 °C. (Fig. 27A y 27B).

También se utilizó electroforesis capilar-SDS (ec-SDS; un procedimiento equivalente a SDS-PAGE) para analizar las muestras de 2 mg/ml que se almacenaron durante seis semanas a 40 °C. En estos experimentos, se observó una estabilidad casi comparable para las muestras de 2 mg/ml, con las muestras con un pH 5,5 que muestran un cambio ligeramente inferior en el peso molecular de la proteína. La estabilidad comparable se observa para las muestras de  
50 2 mg/ml con las muestras con un pH 5,5 que muestran un cambio ligeramente inferior en el PM de la proteína por el procedimiento de electroforesis capilar-SDS (procedimiento equivalente a SDS-PAGE) (Fig. 28).

#### Congelación/descongelación y estabilidad a las sacudidas

Los sistemas de tampón acetato de sodio, citrato de sodio, y succinato de sodio se ensayaron en un estudio de la estabilidad de la proteína en condiciones de congelación/descongelación y estudio de sacudidas a pH 5,5 en  
55 presencia o ausencia de polisorbato 80 derivado de vegetales al 0,005 % y sacarosa al 3 %. En estos experimentos,

anti-5T4 se dializó en los tampones y se diluyó a concentraciones finales de 25 mg/ml y 1 mg/ml. Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido (aproximadamente -196 °C o a -80 °C y después se descongelaron a 37 °C o a temperatura ambiente. Un conjunto distinto de muestras se sacudió a 200 rpm durante 24 horas, a 20 °C.

5 La turbidez se ensayó después de un ciclo de congelación/descongelación midiendo la absorbancia a  $A_{400}$ , y se determinó el porcentaje de especies de alto peso molecular para las muestras de 1 mg/ml. Después de un ciclo de congelación/descongelación, anti-5T4 fue ligeramente sensible a condiciones de congelación lenta (CL) (-80) a 1 mg/ml y muy sensible a condiciones de congelación más rápida (CR) (nitrógeno líquido). Polisorbato 80 minimizó la turbidez y el porcentaje de especies de alto peso molecular se incrementó en muestras de 1 mg/ml. La sacarosa mejoró (minimizó) la turbidez y en presencia de sacarosa, el porcentaje de especies de alto peso molecular aumentó  
10 sólo en condiciones de congelación rápida (Fig. 29A y Fig. 29B).

La turbidez y el porcentaje de especies de alto peso molecular también se analizaron después de múltiples ciclos (diez) de congelación/descongelación utilizando muestras con una concentración de proteína (anti-5T4) de 25 mg/ml. (Fig. 30A y Fig. 30B). Estos datos demostraron que el anti-5T4 no es sensible a tensión por congelación/descongelación a una concentración de 25 mg/ml. Sólo hubo una ligera disminución en la turbidez y el  
15 porcentaje de especies de alto peso molecular con la adición de polisorbato 80 y/o sacarosa después de diez ciclos de congelación/descongelación. Los resultados de turbidez también demuestran que no hubo beneficio, y en algunos casos fue perjudicial a la estabilidad de anti-5T4 cuando se añadió sacarosa a una formulación. El uso de tampón acetato en una formulación resultó en una turbidez ligeramente inferior y un menor porcentaje de especies de alto peso molecular en la mayoría de las condiciones de congelación/descongelación.

20 La estabilidad en condiciones de sacudida se analizó mediante la medición de la turbidez ( $A_{400}$ ) y el porcentaje de especies de alto peso molecular utilizando las formulaciones que contienen 25 mg/ml de anti-5T4. La Fig. 31A y Fig. 31B ilustran los resultados de las mediciones de turbidez de las muestras en varias formulaciones. Estos datos demuestran que el anti-5T4 es muy sensible a la tensión por sacudidas cuando una formulación contiene tampón citrato. Hubo una disminución de la turbidez y el porcentaje de algunas formulaciones de especies de alto peso  
25 molecular con la adición de polisorbato 80 con muestras de 1 mg/ml y 25 mg/ml, pero no se produce beneficio alguno con la adición de sacarosa a las formulaciones. Las formulaciones de tampón acetato exhibieron generalmente la turbidez más baja.

#### Tensioactivo y crioprotector

30 Algunos de los experimentos descritos *supra* (p. ej., los ilustrados en las Fig. 29A, Fig. 29B, Fig. 30A, Fig. 30B, Fig. 31A y Fig. 31B) incluyen datos en los que la formulación incluye un tensioactivo (polisorbato 80) y/o un crioprotector (sacarosa). Con respecto a la estabilidad después de la congelación, las muestras que contienen 25 mg/ml de anti-5T4 no fueron sensibles a tensión por congelación/descongelación. Anti-5T4 era estable en condiciones de congelación lenta, independientemente de la concentración de proteínas o condición de descongelación. Polisorbato 80 no era necesario para mejorar la estabilidad de las muestras de concentración de proteínas de 25 mg/ml cuando  
35 se aplicó un protocolo de descongelación rápida.

La adición de sacarosa a una formulación no mejoró la estabilidad para las muestras que contienen 25 mg/ml de anti-5T4. Para las muestras que contienen 1 mg/ml, polisorbato 80 y sacarosa protegieron el anti-5T4 durante la congelación/descongelación, particularmente en condiciones de congelación rápida (Fig. 29A y Fig. 29B y Fig. 30A y Fig. 30B).

40 También se examinó la estabilidad de anti-5T4 en diversas formulaciones en condiciones de sacudida. Polisorbato 80 contribuyó a la minimización de la turbidez y a la minimización del porcentaje de especies de alto peso molecular de las formulaciones anti-5T4 a una concentración de proteínas de 25 mg/ml cuando la proteína se sacudió a rpm extremadamente altas. En formulaciones que contienen 1 mg/ml de anti-5T4, polisorbato 80 protegía a la proteína contra la tensión por agitación (Fig. 31A y Fig. 31B).

45 Estos datos demuestran que para las concentraciones de proteína más altas (p. ej., 25 mg/ml), anti-5T4 es estable en tensión por congelación/descongelación. Hubo un beneficio escaso o nulo con la adición de tensioactivo a una formulación en la mayoría de las condiciones de congelación/descongelación, en particular, en formulaciones que contienen tampón acetato. Además, no hay necesidad de utilizar un crioprotector (p. ej., sacarosa) en las formulaciones. Polisorbato 80 fue útil para la estabilización de anti-5T4 en condiciones de agitación severa.

50 Además, se descubrió que las muestras que contienen bajas concentraciones de proteína (p. ej., 1 mg/ml de anti-5T4) eran estables en condiciones de congelación lenta. En tales muestras de proteínas con una concentración baja, polisorbato 80 y sacarosa protegieron la proteína (anti-5T4) contra la desnaturalización inducida por congelación/descongelación. También, en las muestras con una baja concentración de proteínas, el polisorbato 80 protegió a la proteína frente a la desnaturalización inducida por agitación.

#### Otras realizaciones

Queda entendido que si bien la invención se ha descrito junto con la descripción detallada de la misma, la descripción anterior tiene por objeto ilustrar y no limitar el ámbito de la invención, que se define por el ámbito de las

reivindicaciones adjuntas. Otros aspectos, ventajas y modificaciones están dentro del ámbito de las siguientes reivindicaciones.

## REIVINDICACIONES

## 1. Una formulación que comprende

(a) un anticuerpo anti-CD22 monoclonal humanizado que comprende:

- una región variable de la cadena ligera gL1 que consiste en la secuencia de aminoácidos:

1 DVQVTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSLA NSYGNTFLSW YLHKPGKAPQ LLIYGISNRF  
5 61 SGVPDRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQGTHQP YTFGQGTKVE IKR

- una región constante de la cadena ligera de la cadena ligera kappa humana;

- una región variable de la cadena pesada gH7 que consiste en la secuencia de aminoácidos

1 EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYRFT NYWIHWVRQA PGQGLEWIGG INPGNNYATY  
61 RRFKQGRVTM TADTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCTREG YGNYGAWFAY WGQGLTVTVS  
121 S;

y,

10 - una región constante de la cadena pesada de la cadena pesada gamma-4 humana;

en la que el anticuerpo está presente a una concentración de 1 mg/ml a 50 mg/ml;

y

(b) una solución acuosa que comprende un tampón succinato y que tiene un pH 4,0 a pH 6,5, en la que la concentración del tampón es de 1 mM a 100 mM;

15 en la que la formulación no contiene crioprotector o tensioactivo, y el anticuerpo es estable durante al menos 3 semanas entre -80 °C a 8 °C,

en la que la estabilidad se determina examinando al menos uno entre el porcentaje de especies de alto peso molecular, el porcentaje de especies de bajo peso molecular, o el porcentaje de especies ácidas en comparación con un control;

20 en la que el control es una réplica de la formulación que no se ha sometido a almacenamiento; en la que el porcentaje del componente proteico de la formulación en especies de alto peso molecular después del almacenamiento es de 10 % o menos de la proteína total;

en la que el porcentaje del componente proteico de la formulación en especies de bajo peso molecular después del almacenamiento es de 10 % o menos de la proteína total, y,

25 en la que la formulación no muestra un aumento superior al 10 % en el porcentaje de especies ácidas después del almacenamiento.

## 2. Una formulación según la reivindicación 1, en el que el anticuerpo comprende

- una cadena ligera que consiste en la secuencia de aminoácidos:

1 MKLPVRLVL LLFWIPASRG DVQVTQSPSS LSASVGDRVT ITCRSSQSLA NSYGNTFLSW  
61 YLHKPGKAPQ LLIYGISNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLTI SSLQPEDFAT YYCLQGTHQP  
121 YTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAK VQWKVDNALQ  
181 SGNQSQESVTE QDSKDSTYSL SSSLTSLKAD YEKHKVYACE VTHQGLSSPV TKSFNREGC;

30

y una cadena pesada que consiste en la secuencia de aminoácidos:

1 MDFGFSLVFL ALILKGVQCE VQLVQSGAEV KPKGASVKVS CKASGYRFTN YWIHWVRQAP  
61 GQGLEWIGGI NPGNNYATYR RKFQGRVTMT ADTSTSTVYM ELSSLRSED TAVYYCTREGY  
121 GNYGAWFAYW GQGLTVTVSS ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS  
181 WNSGALTSGV HTPFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES  
241 KYGPPCPPCP APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSDQED PEVQFNWYVD  
301 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK  
361 GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS  
421 DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LLSLGLGK.

## 3. La formulación de la reivindicación 1, en la que la formulación comprende menos de sal 150 mM.

4. La formulación de la reivindicación 1, en la que la concentración de tampón es de 50 mM a 100 mM.
5. La formulación de la reivindicación 1, en la que la concentración de tampón es de 1 mM a 50 mM.
6. La formulación de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo es estable durante al menos 1 año a 5 °C o el anticuerpo es estable durante al menos 3 años a 5 °C.
- 5 7. La formulación de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo está presente a una concentración de 10 mg/ml a 30 mg/ml, 25 mg/ml a 30 mg/ml, 10 mg/ml a 50 mg/ml o 20 mg/ml a 50 mg/ml.
8. La formulación de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo tiene un pI de al menos 6,0, 7,0 u 8,0.
9. La formulación de la reivindicación 1, en la que el pH de la formulación es de 5,0 a 6,0.
10. La formulación de la reivindicación 1, en la que la solución acuosa es succinato 20 mM, pH 6,0.
- 10 11. La formulación de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo está purificado al menos en el 95 %.
12. La formulación de la reivindicación 1, en la que la formulación es estéril.

FIG 1A

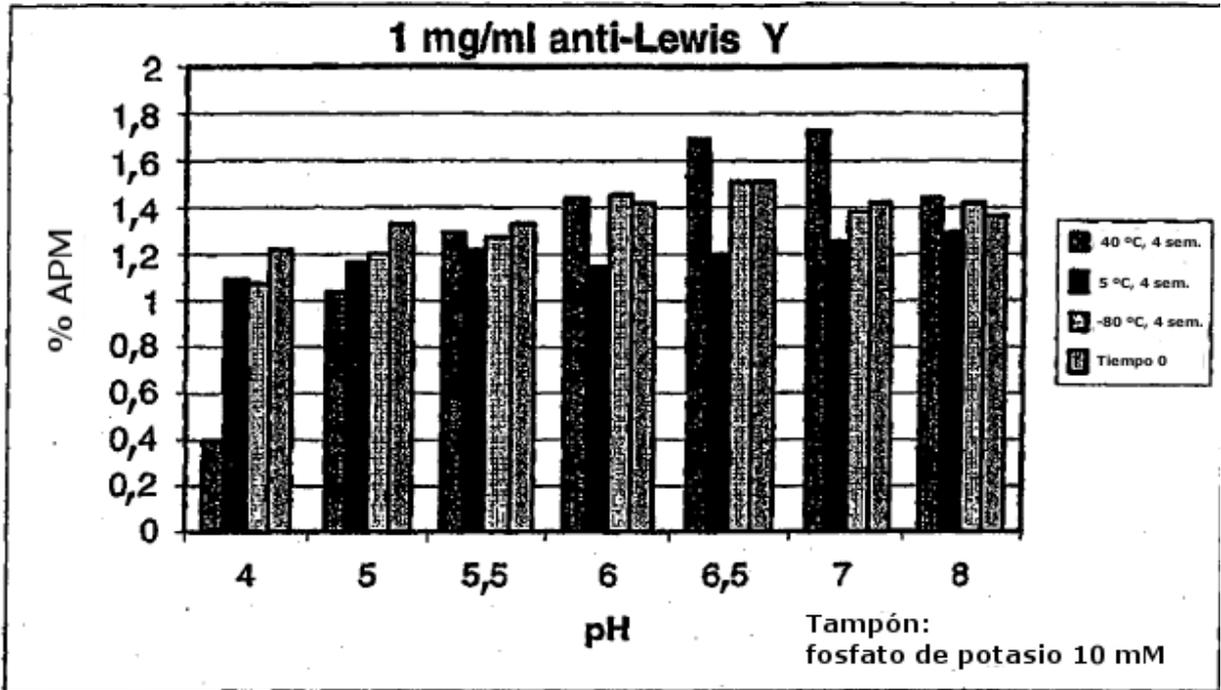


FIG 1B

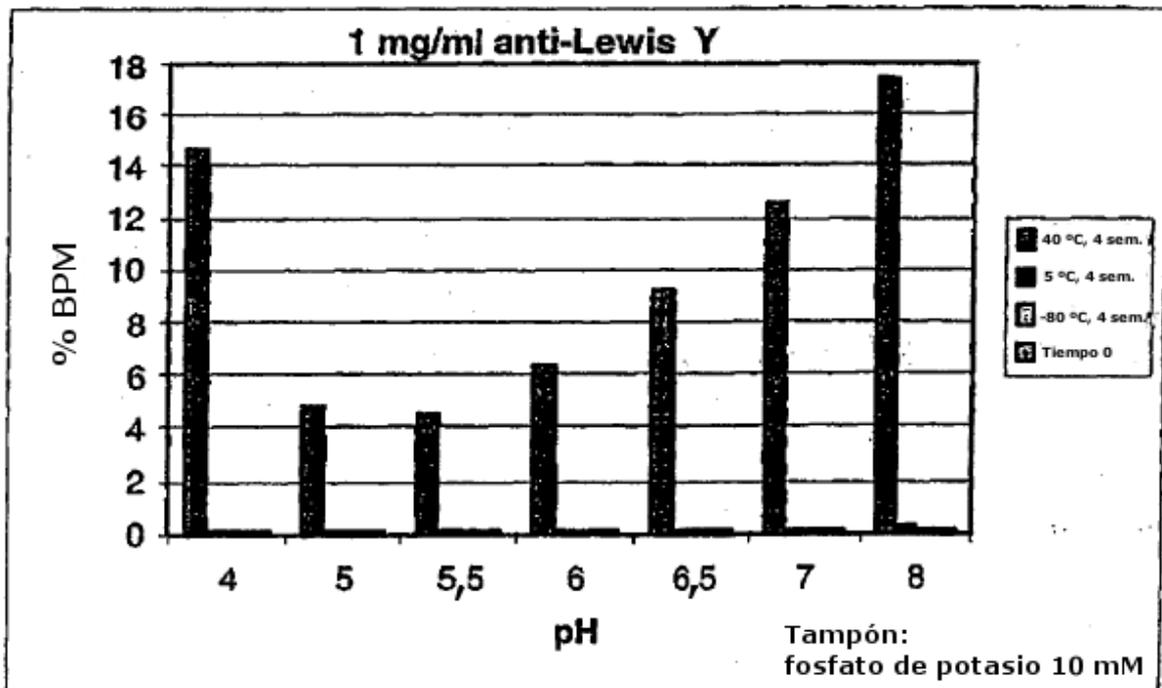


FIG 2

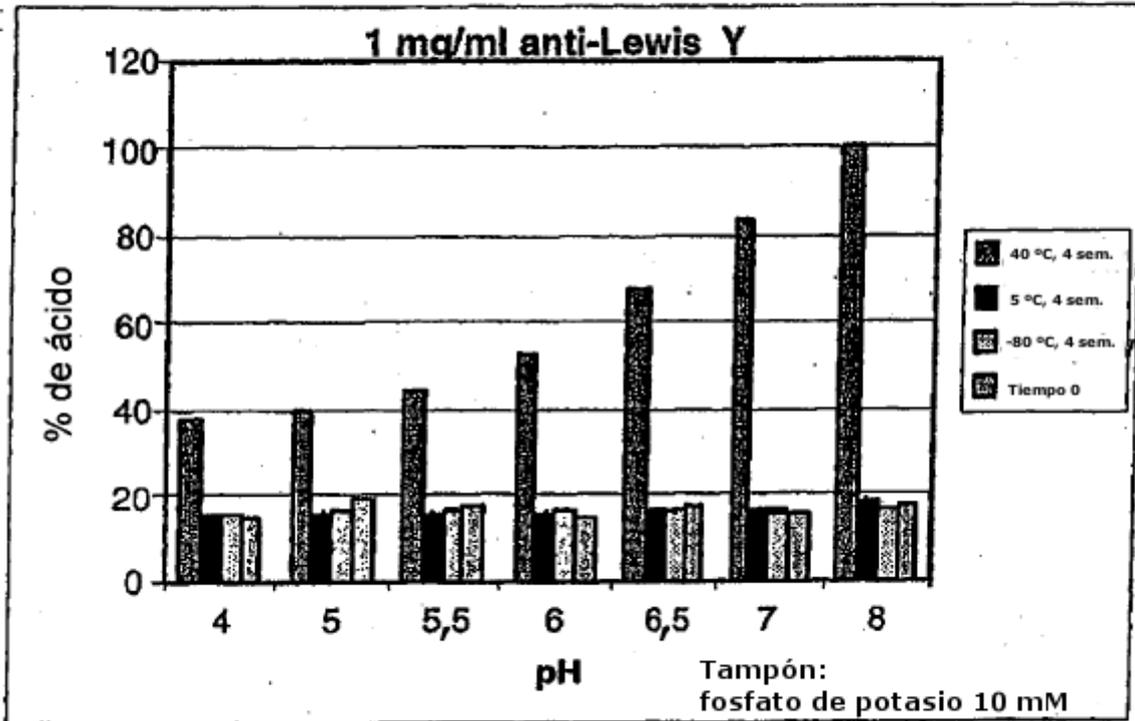


FIG 3

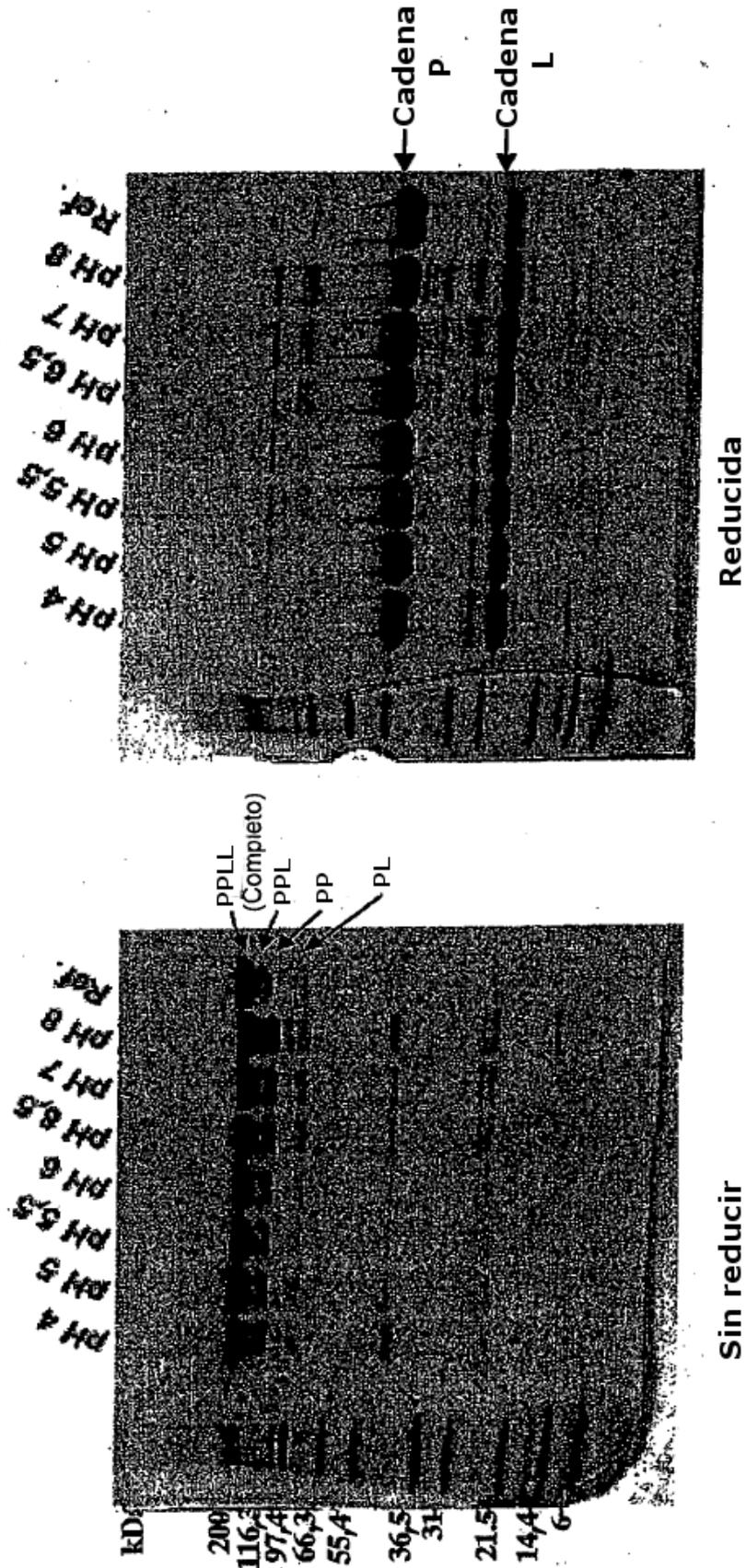


FIG 4

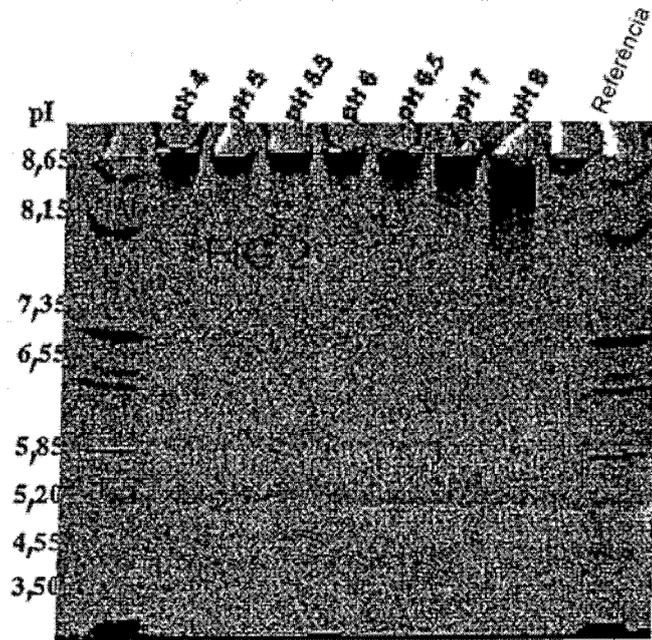


FIG 5

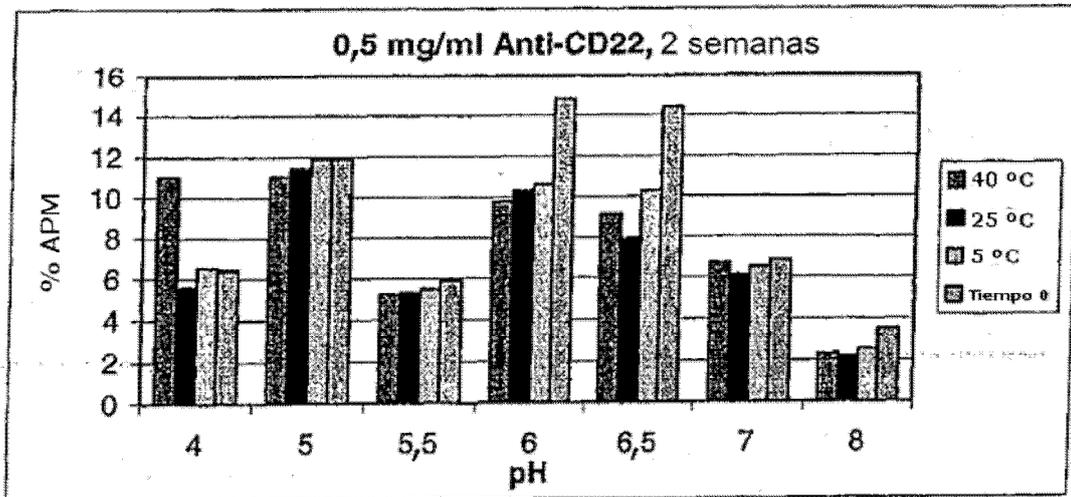
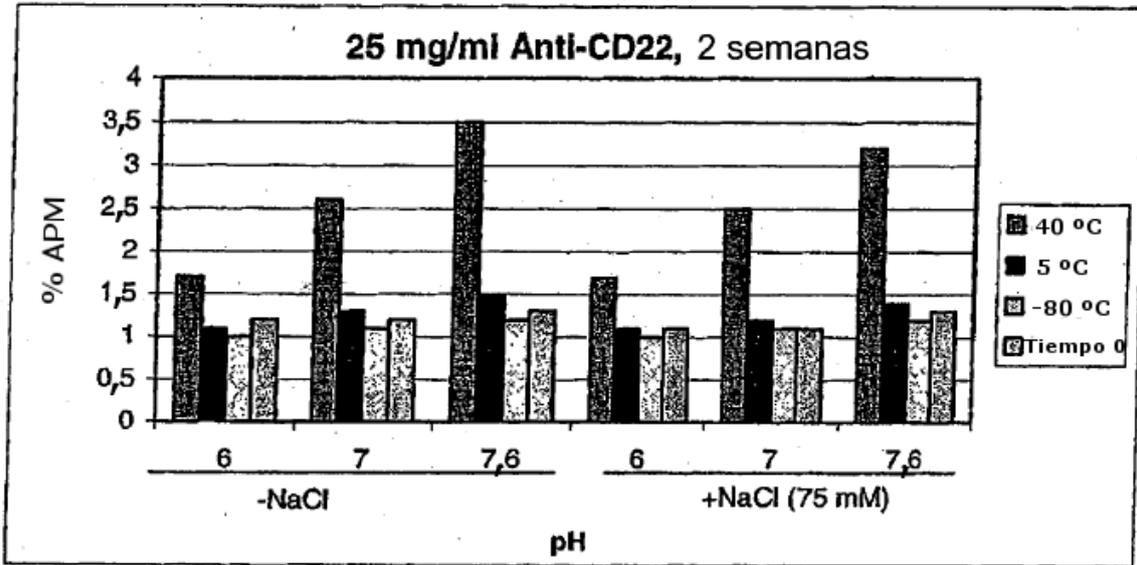


FIG 6



**Tampón:**  
 pH6: succinato 50 mM  
 pH7: succinato 50 mM  
 HEPES 50 mM

FIG 7A

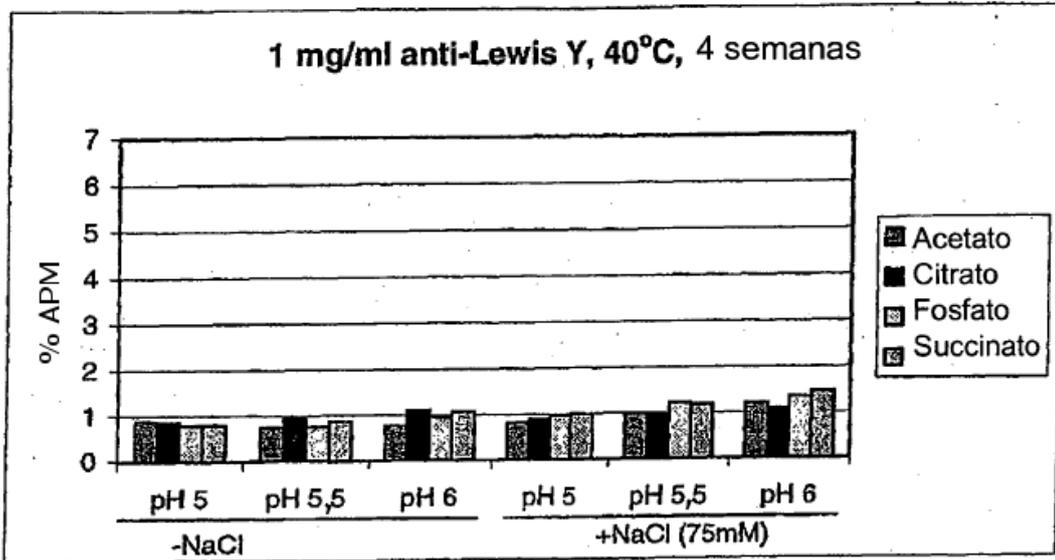


FIG 7B

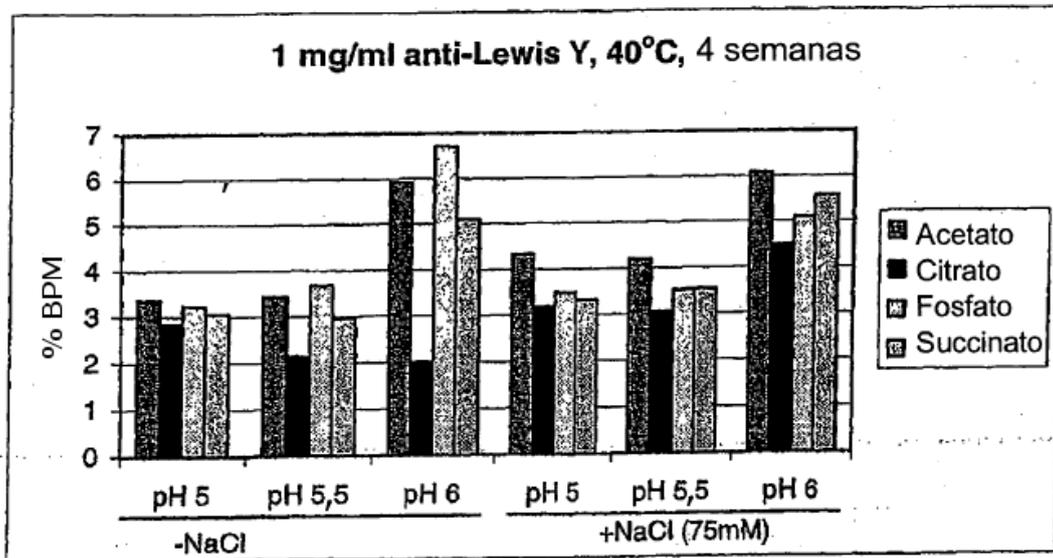


FIG 8

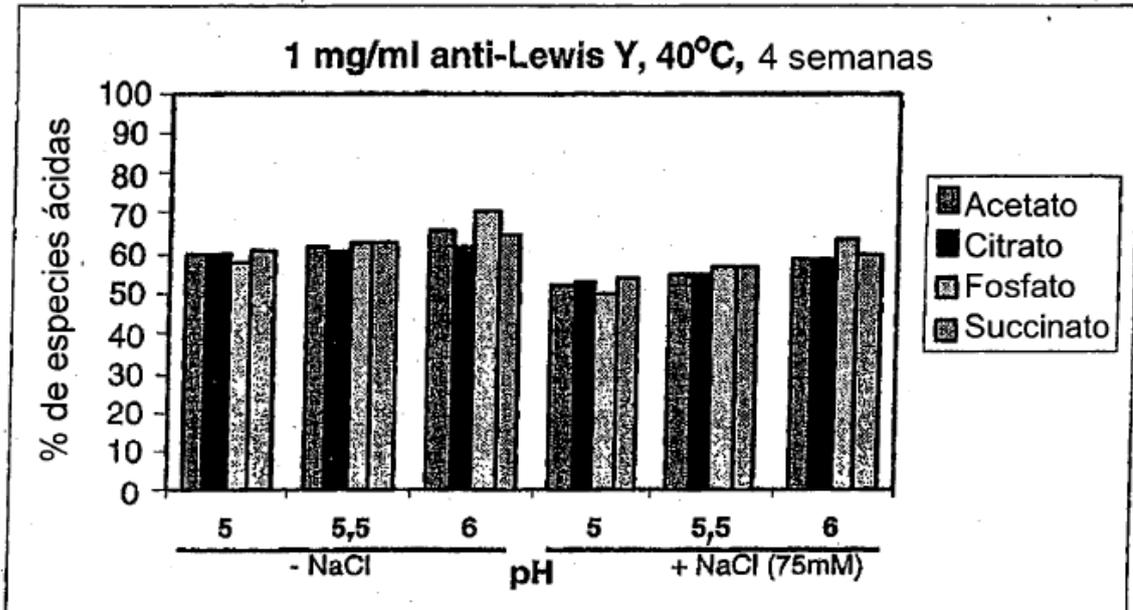


FIG 9A

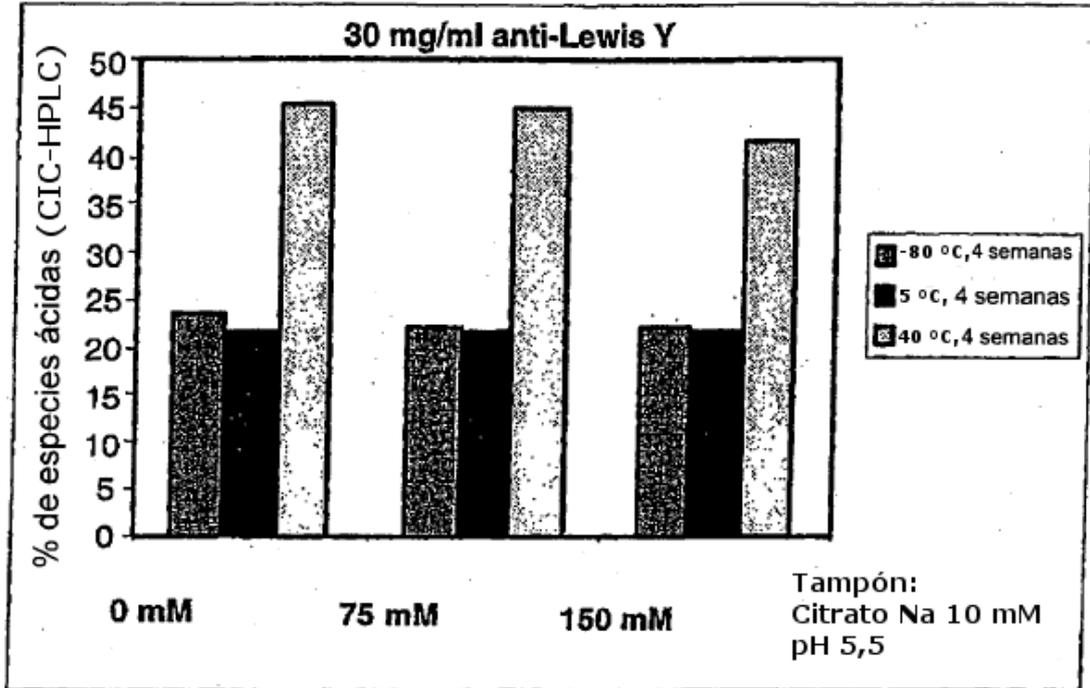


FIG 9B

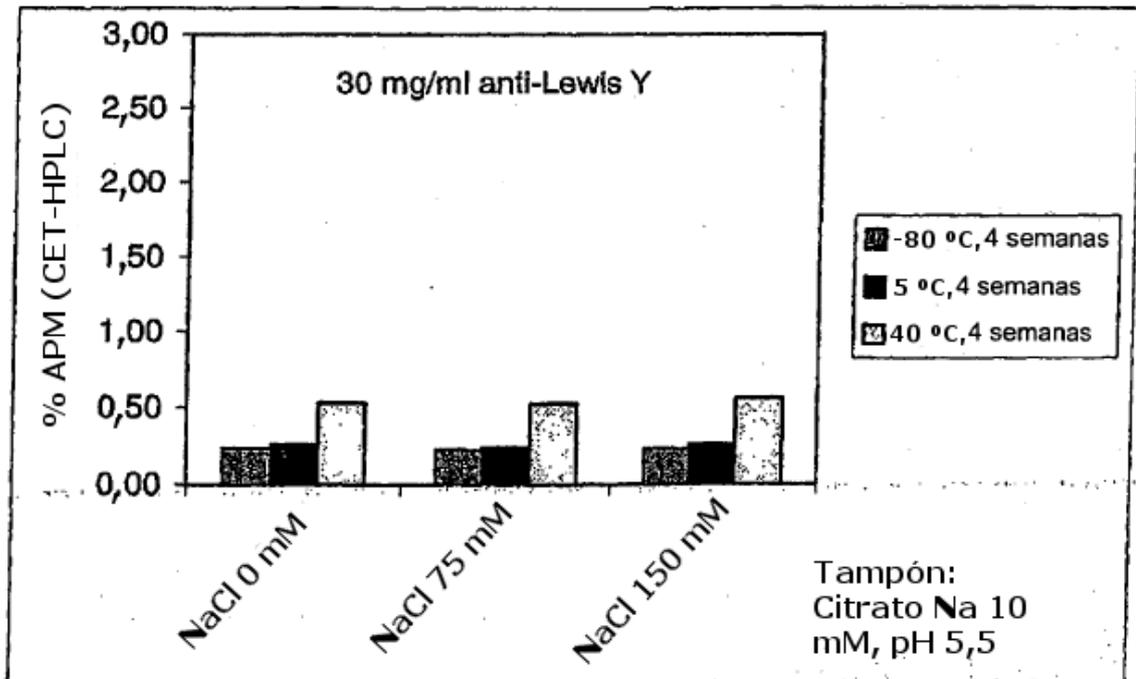


FIG 9C

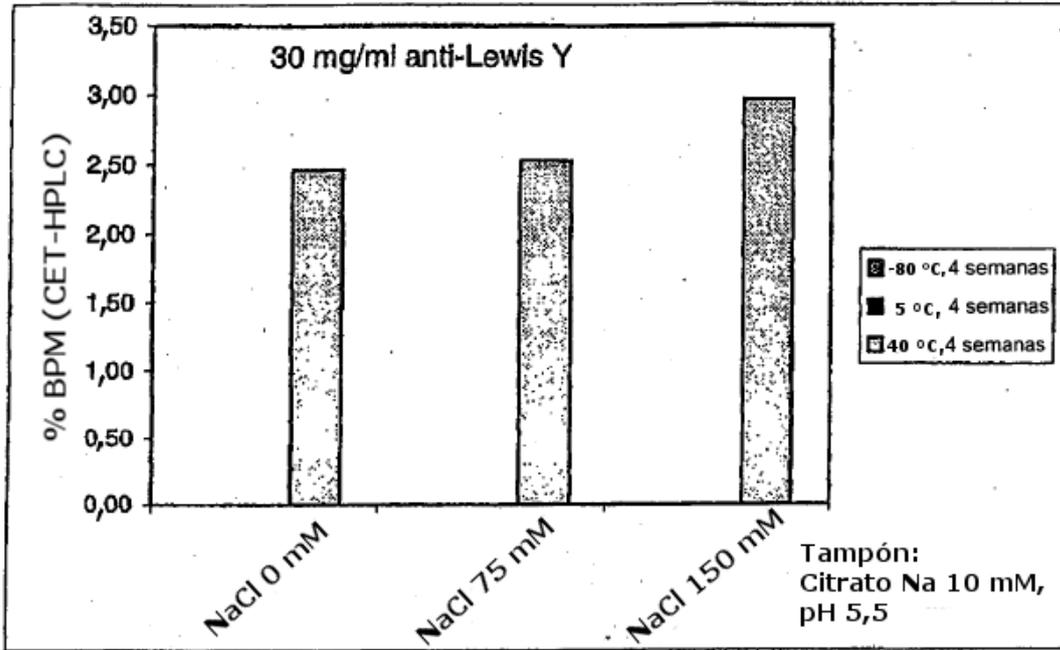


FIG 10

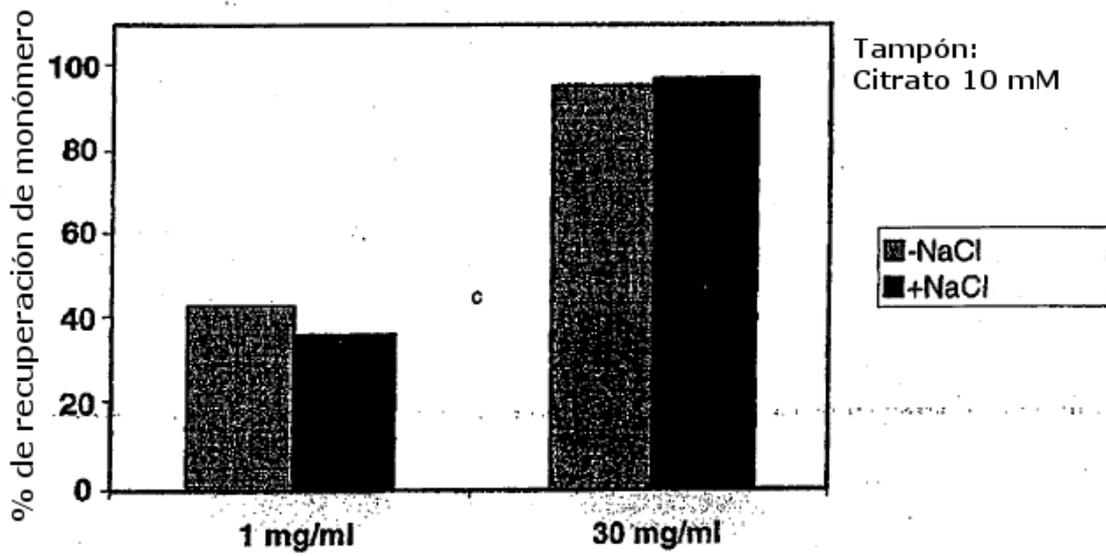


FIG 11A

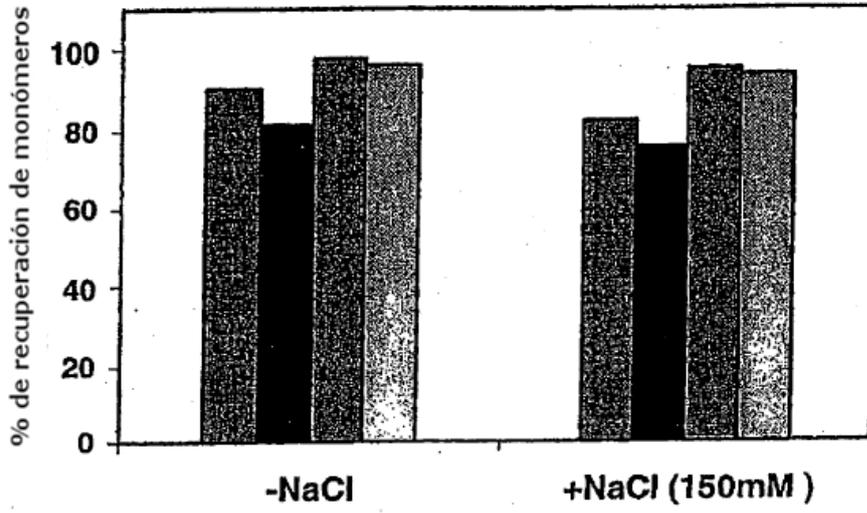


FIG 11B

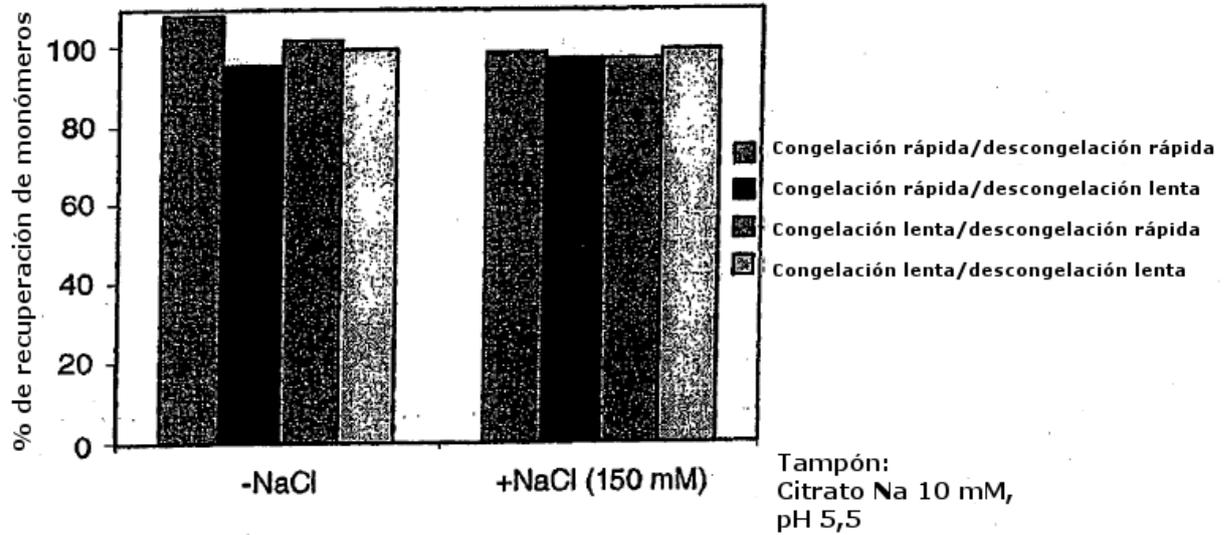


FIG 12

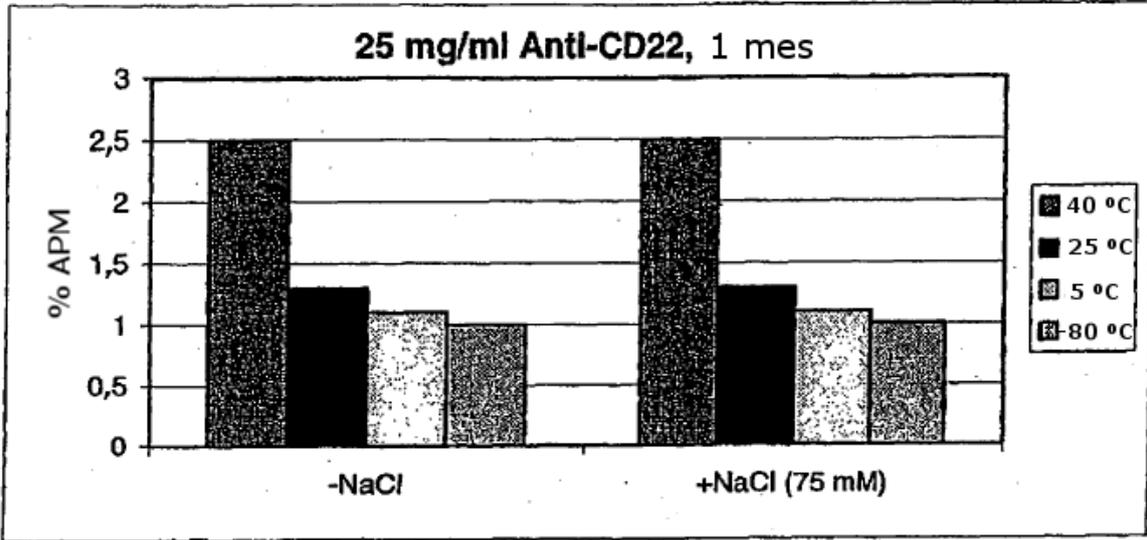


FIG 13

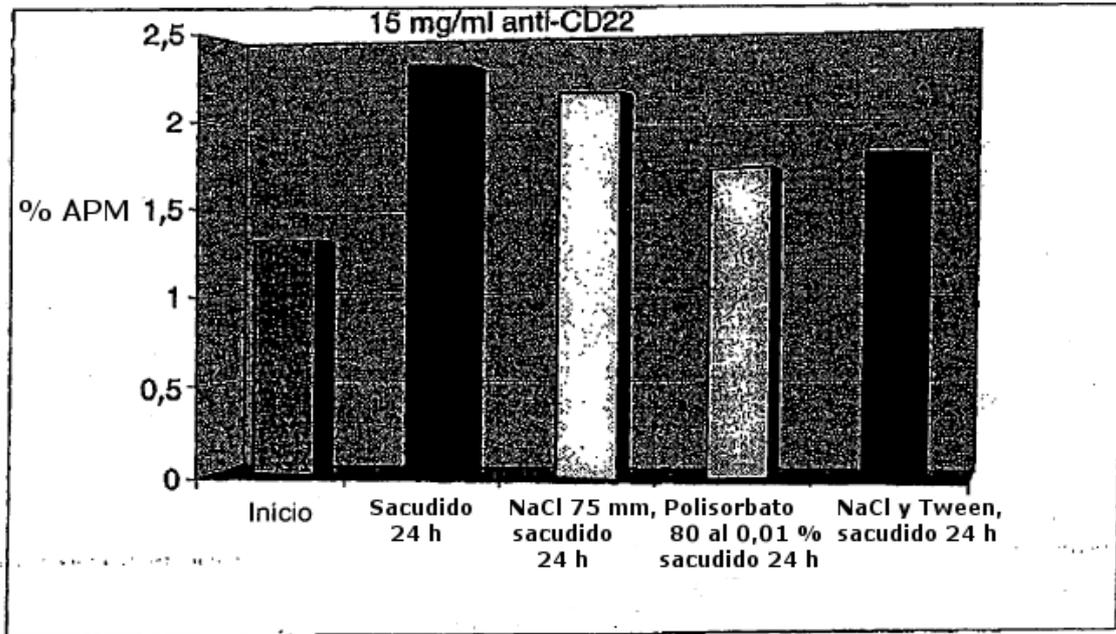


FIG 14A

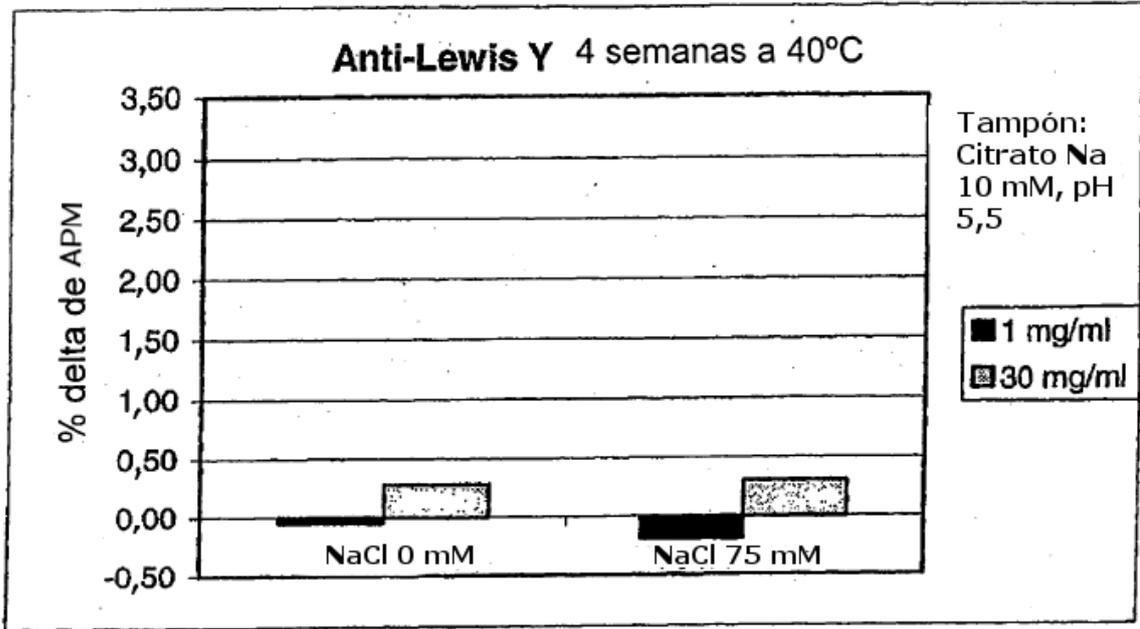


FIG 14B

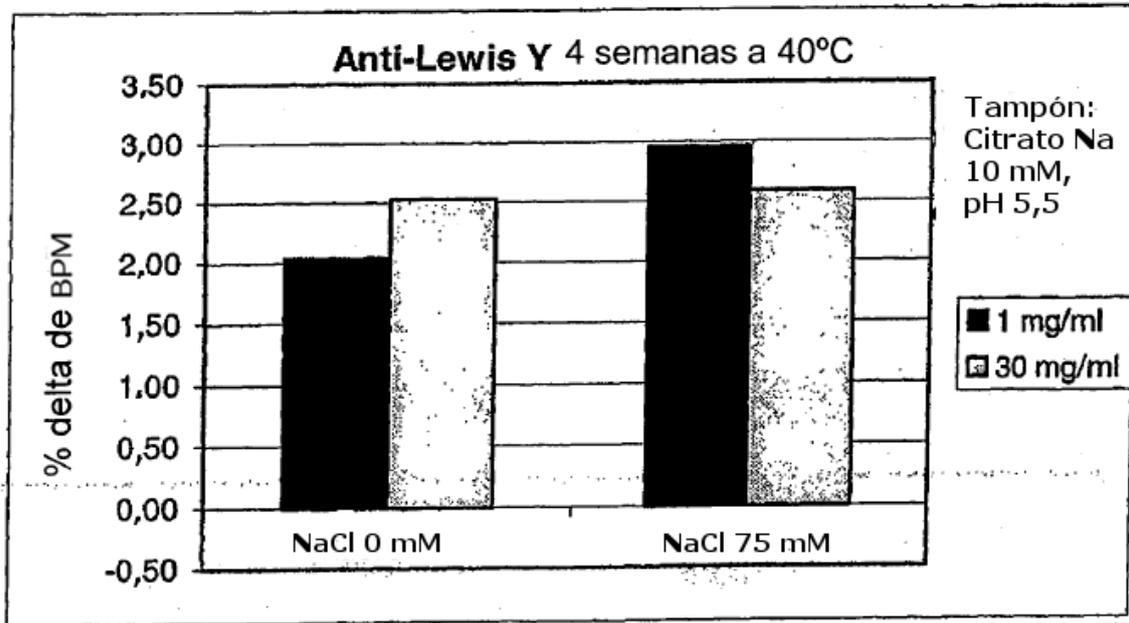


FIG 14C

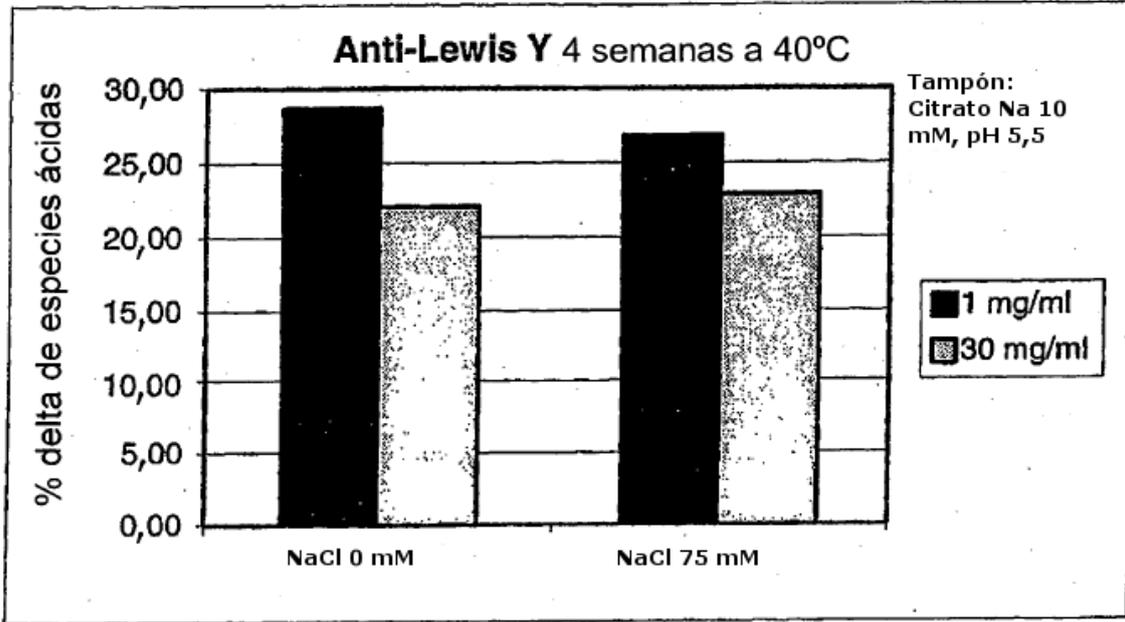


FIG 15A

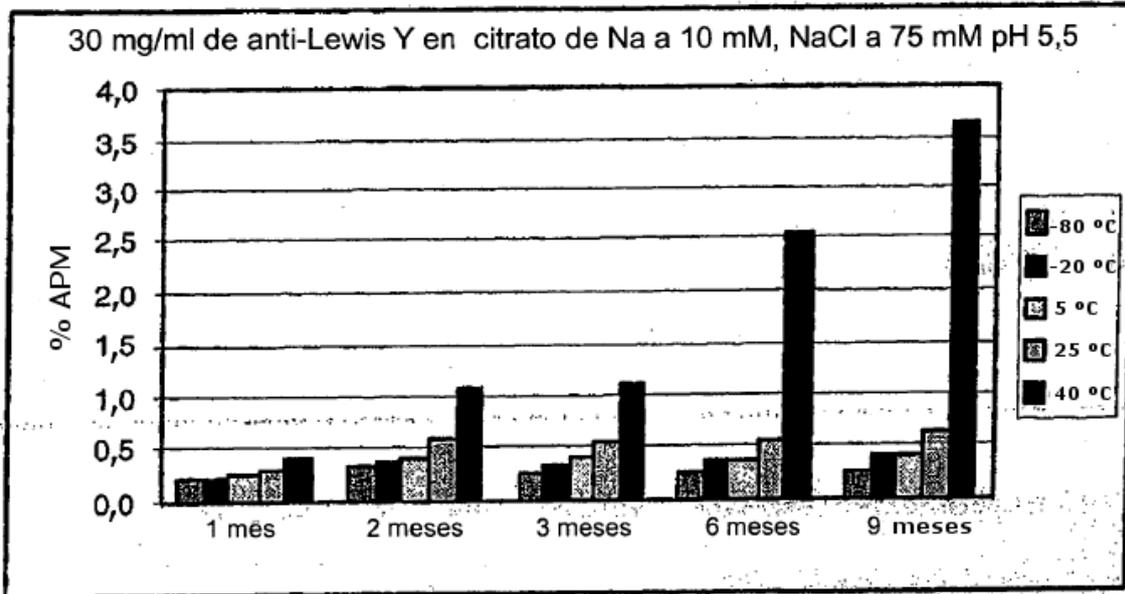


FIG 15B

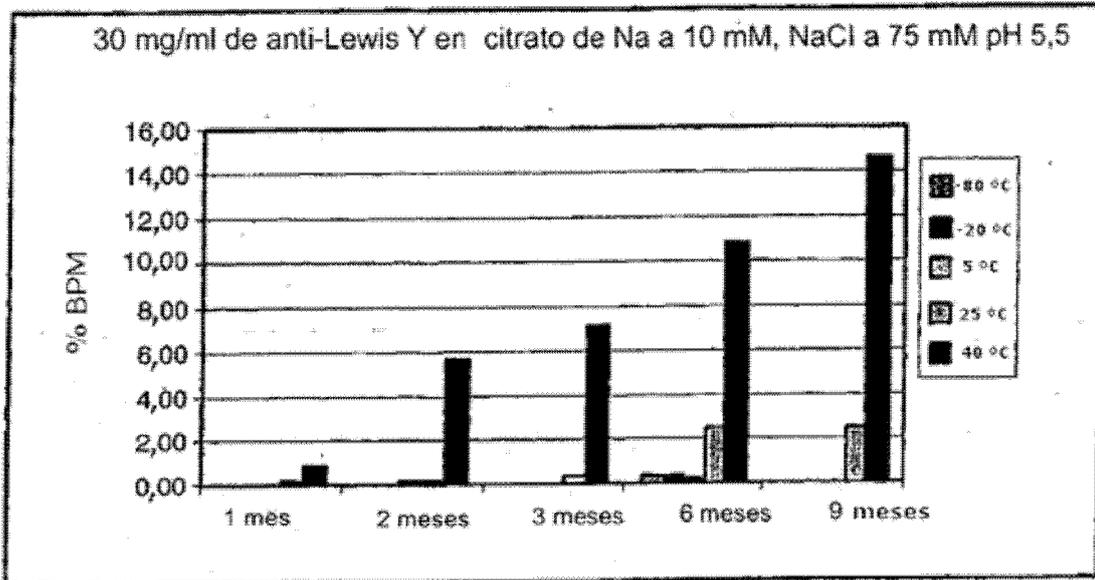


FIG 15C

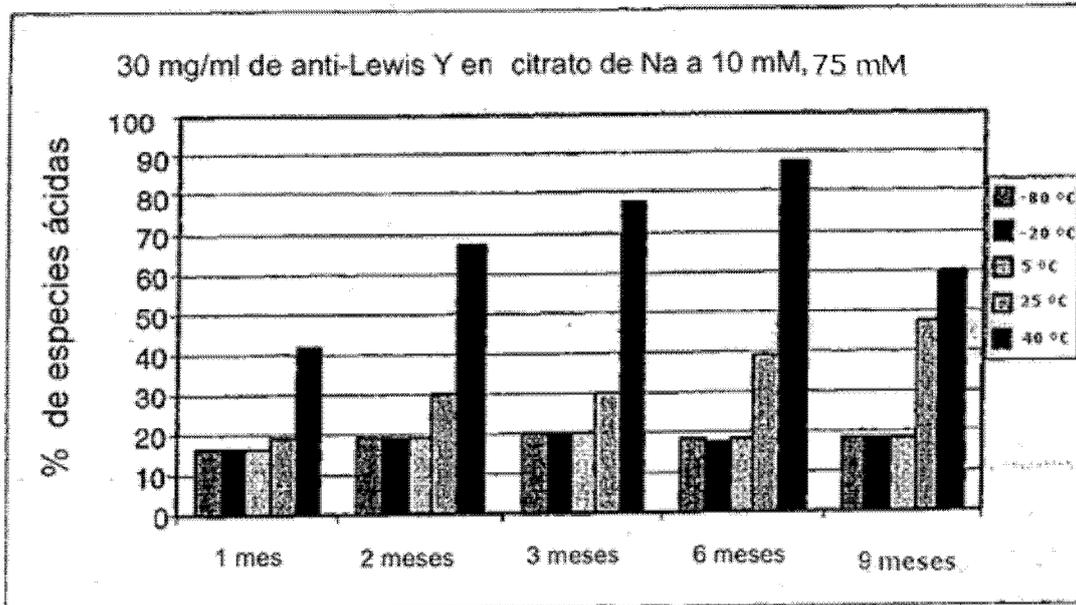


FIG 16A

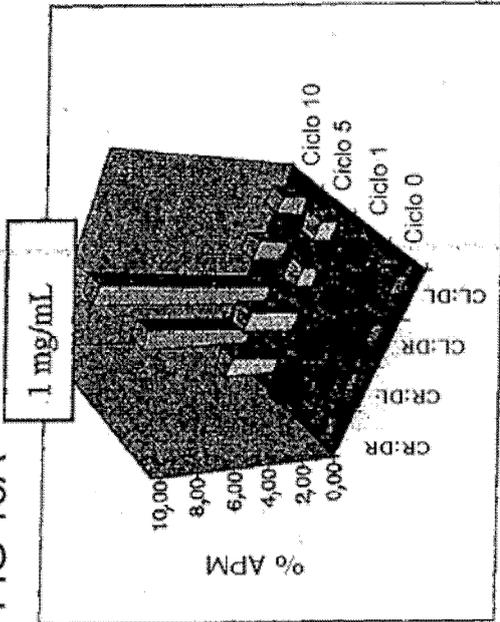


FIG 16B

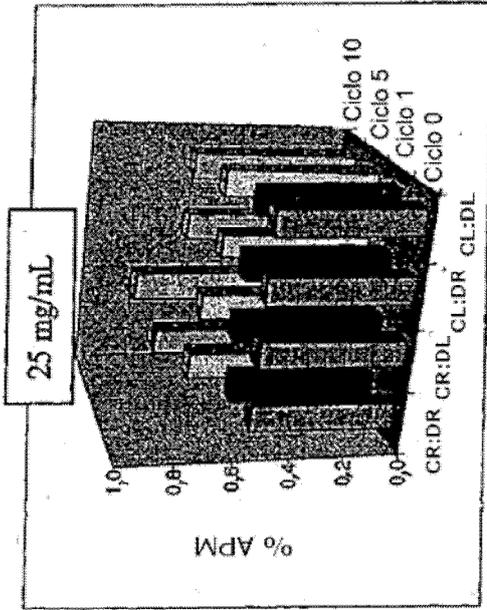


FIG 16C

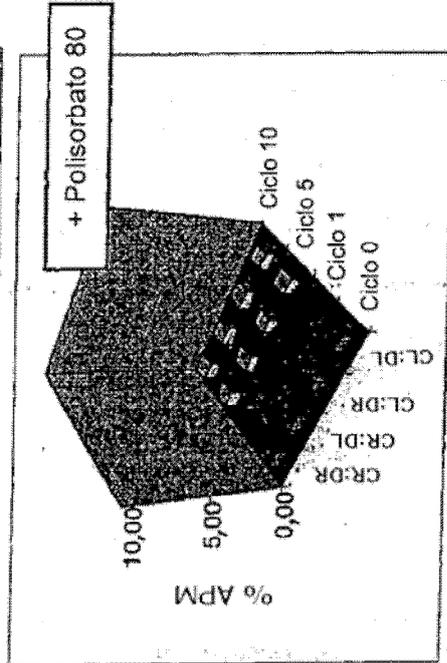


FIG 16D

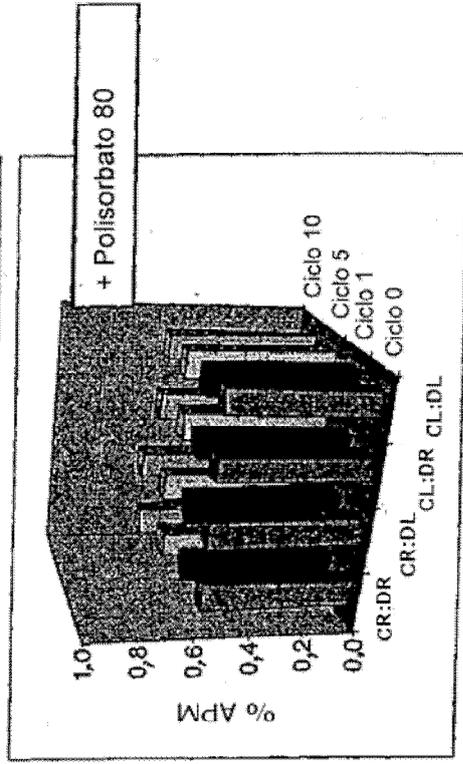


FIG 17A

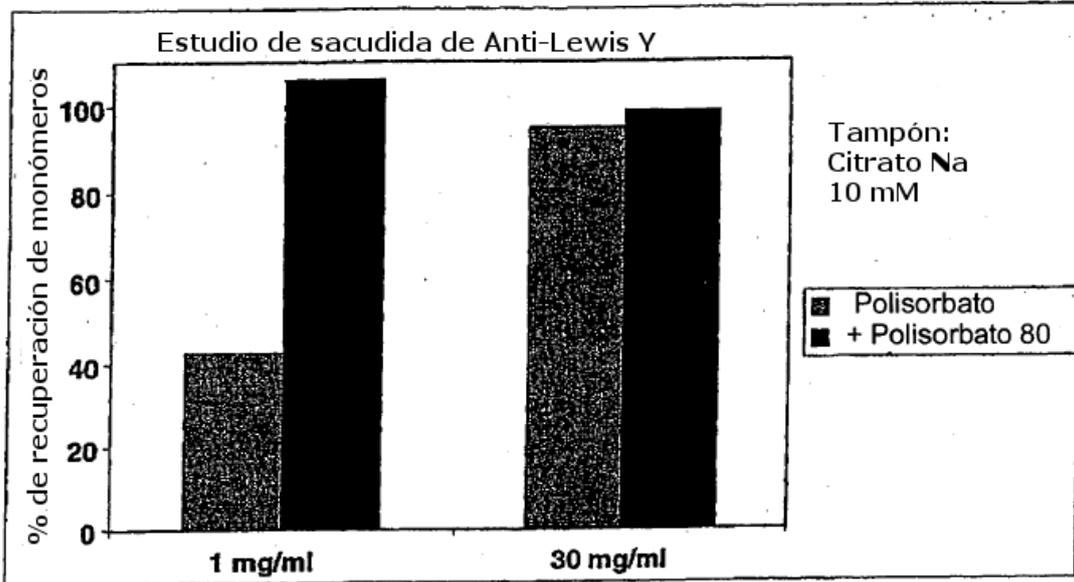


FIG 17B

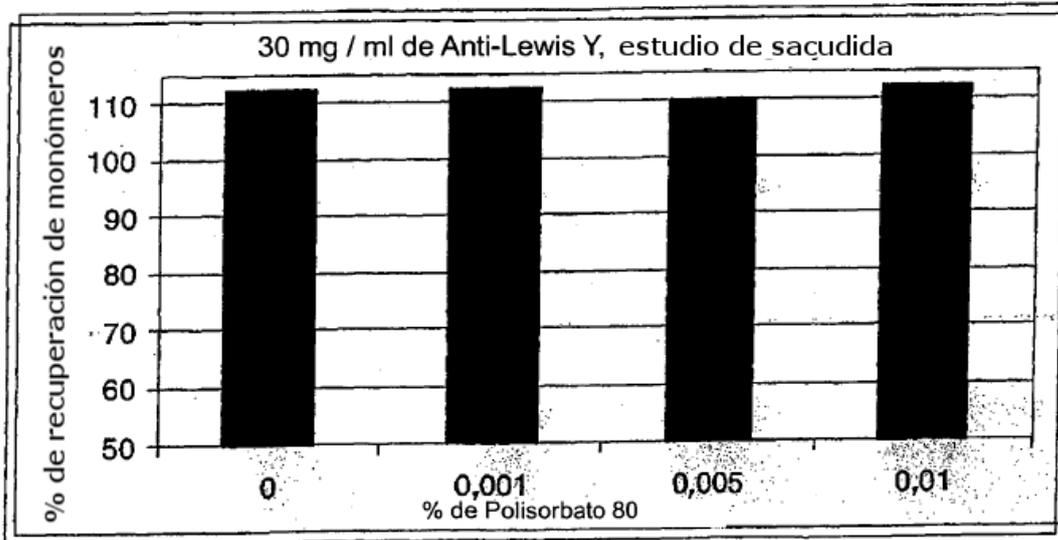


FIG 18A

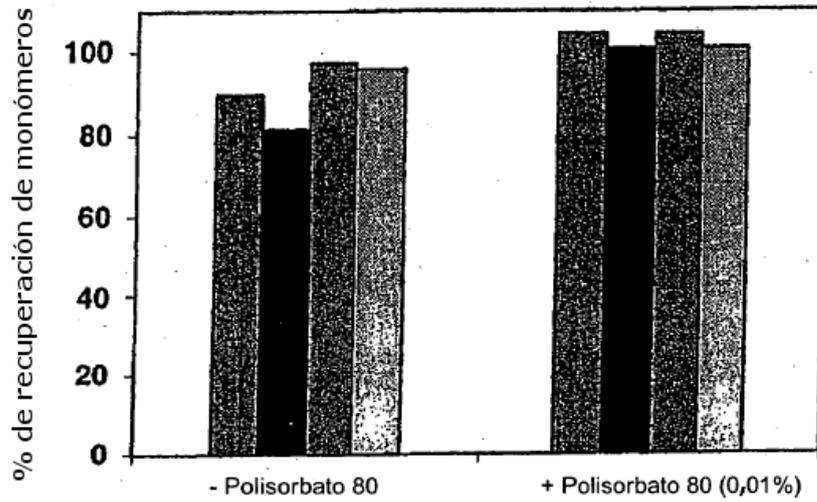


FIG 18B

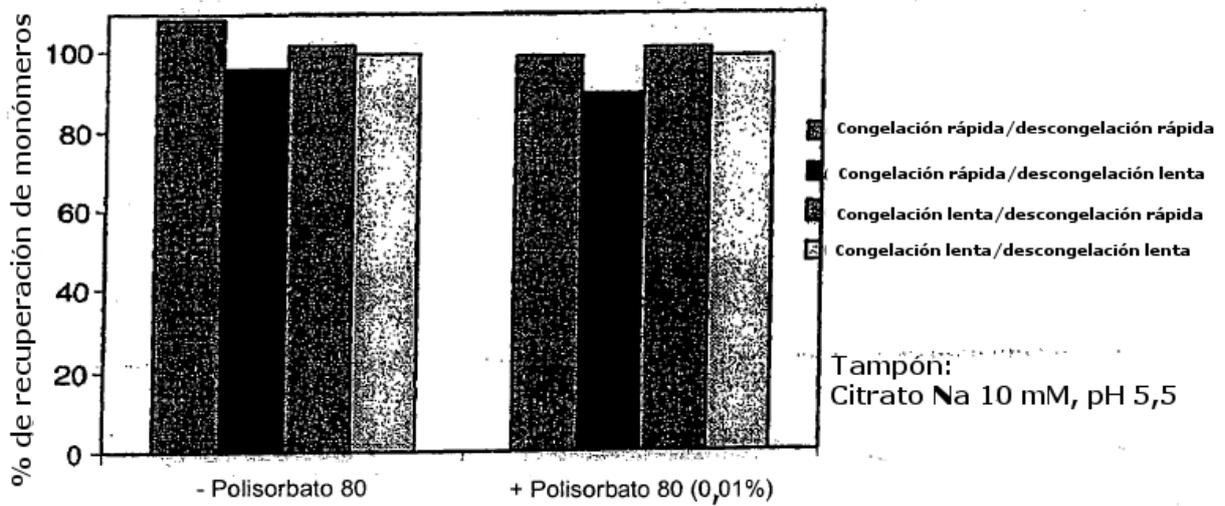


FIG 19A

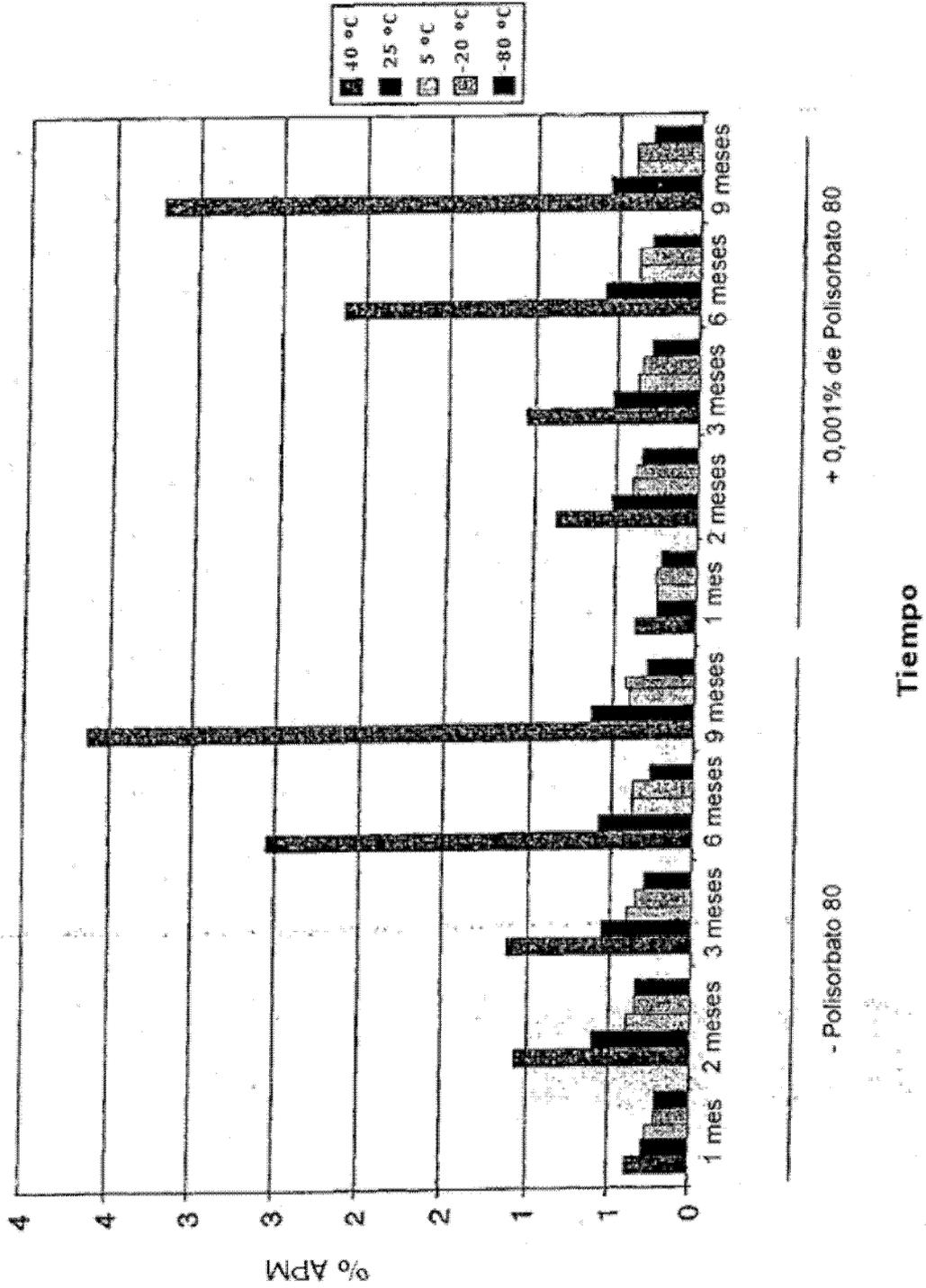


FIG 19B

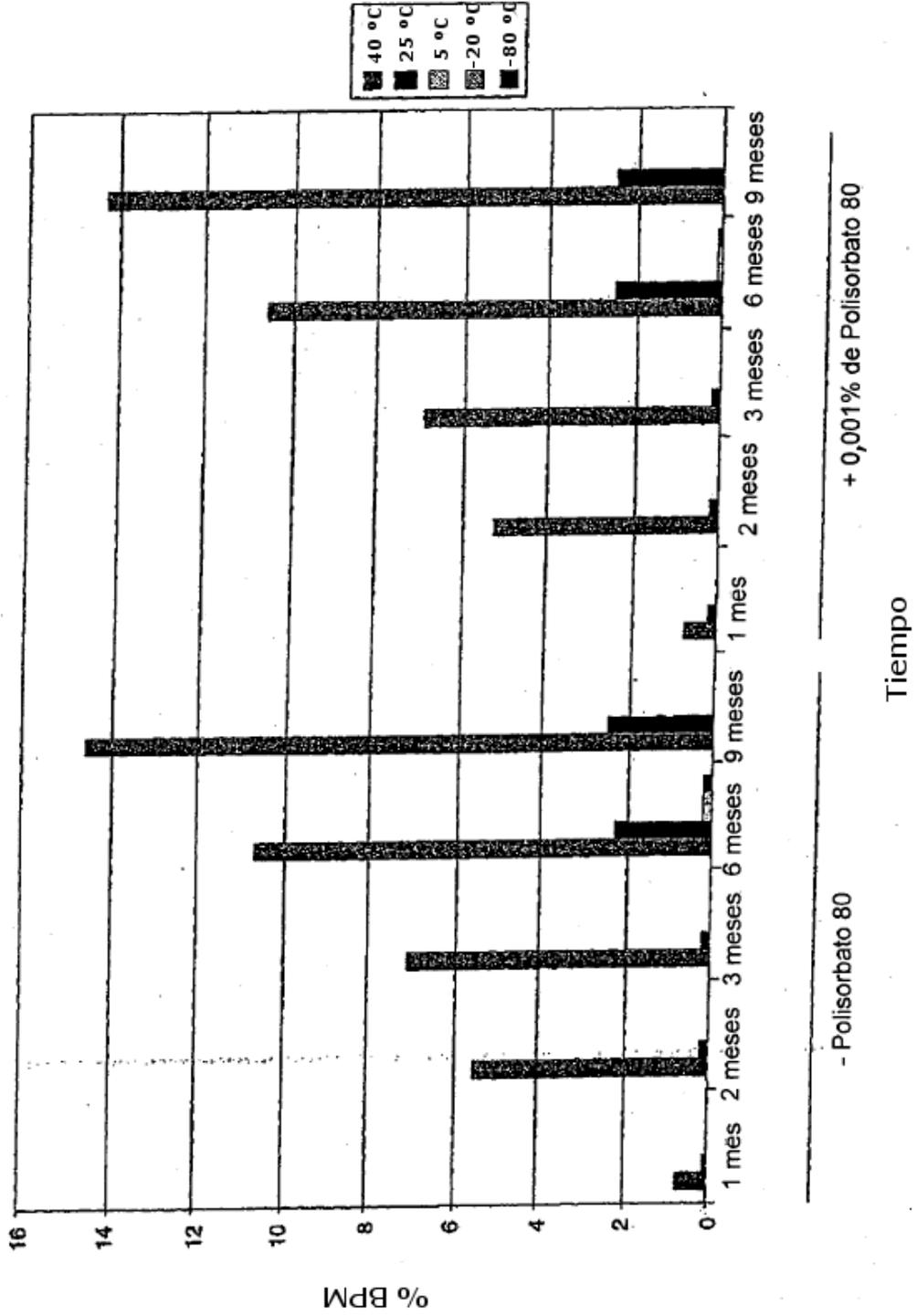
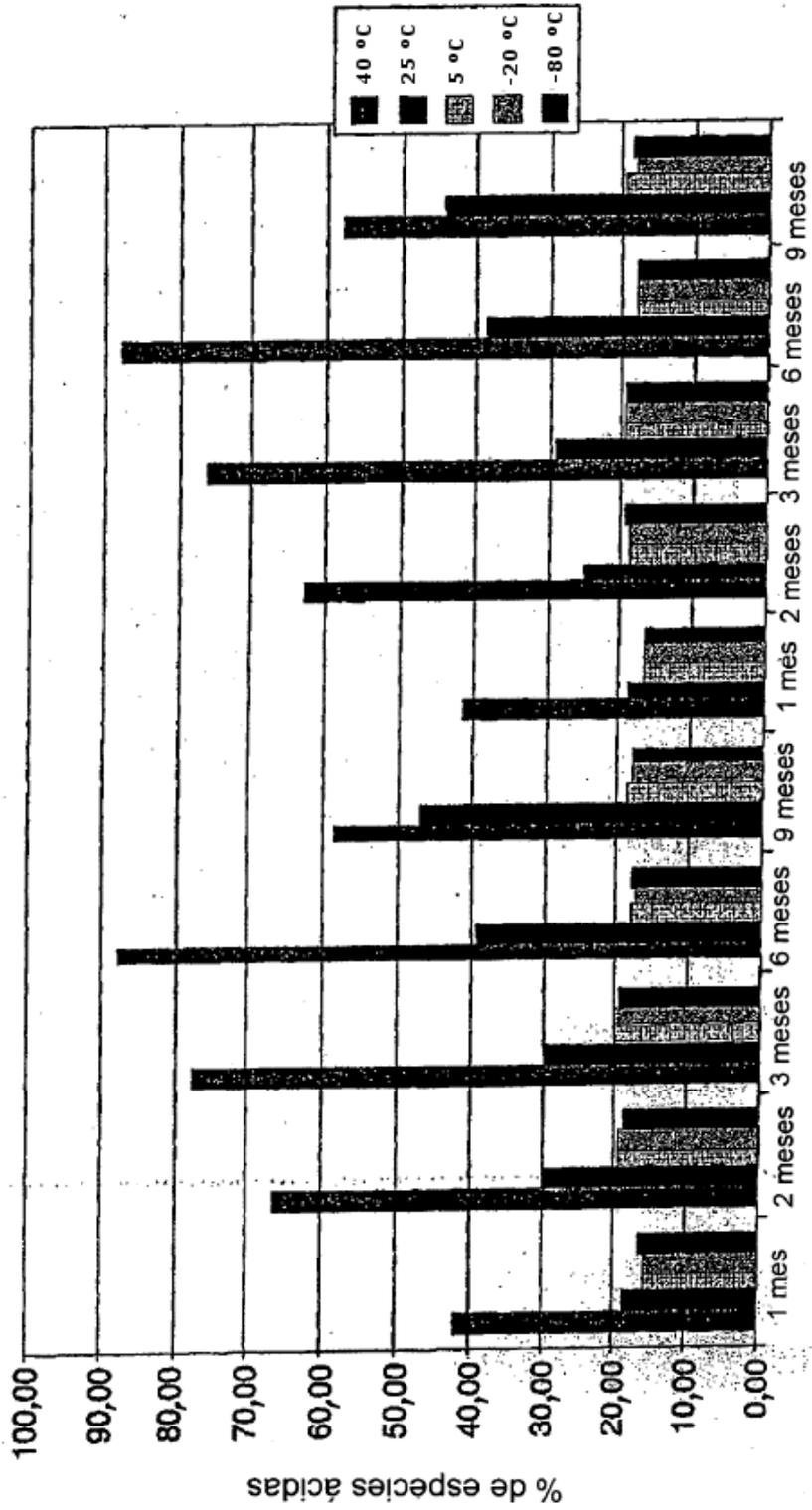


FIG 19C



+ 0,001% de Polisorbato 80

- Polisorbato 80

Tiempo



FIG 21

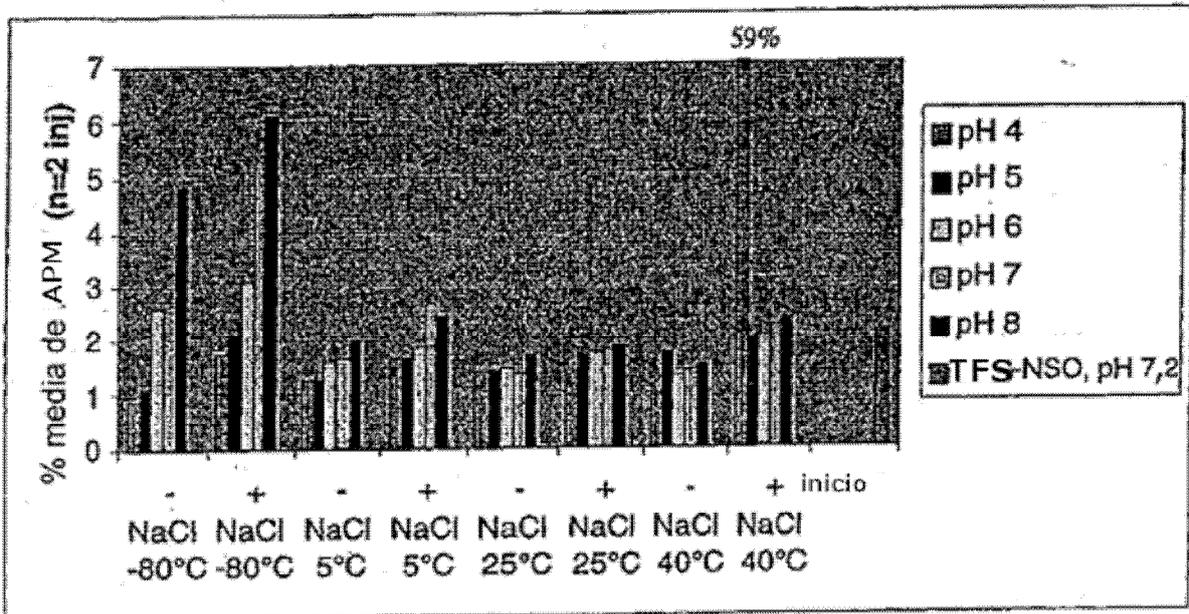


FIG 22

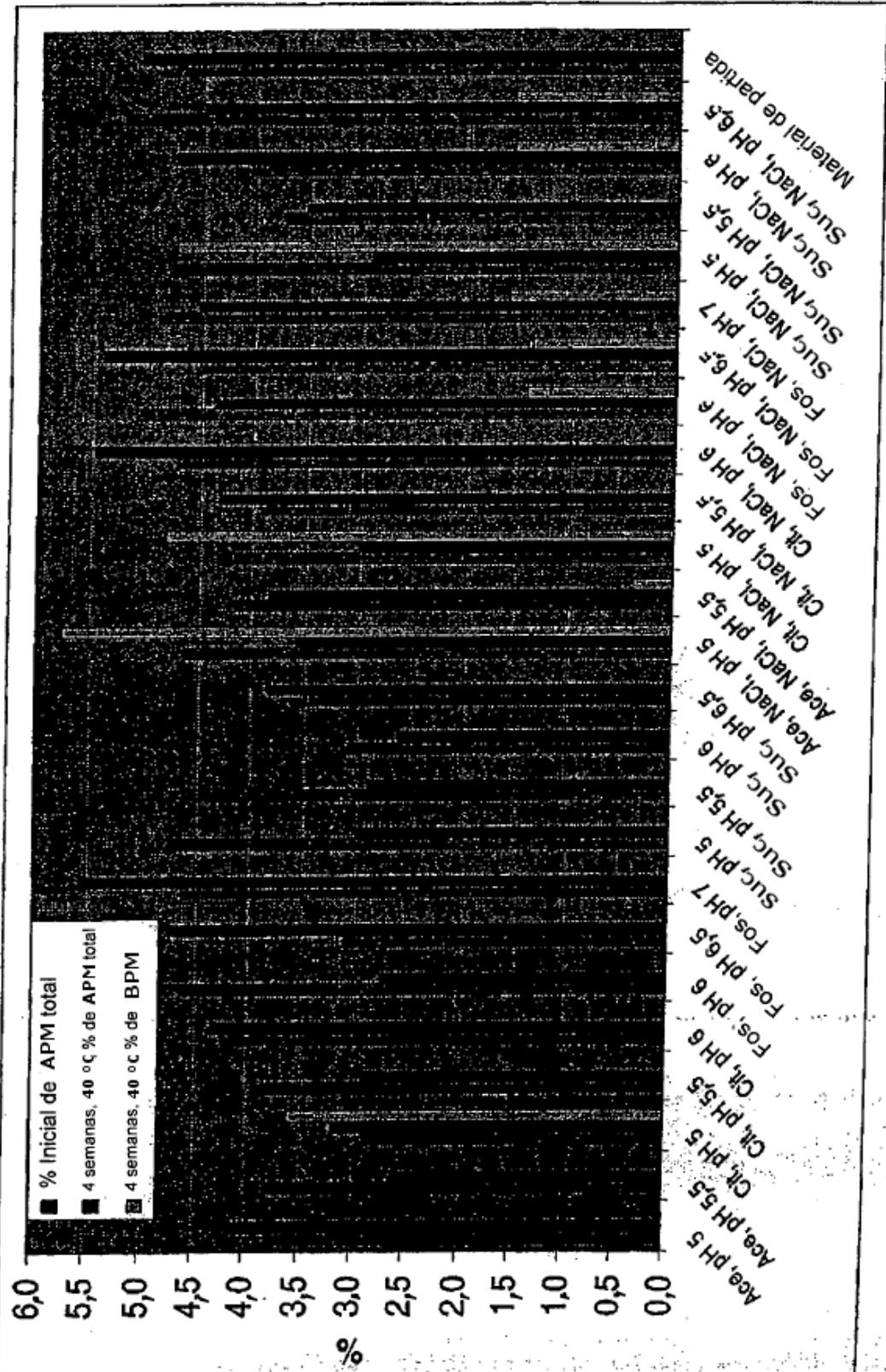


FIG 23A

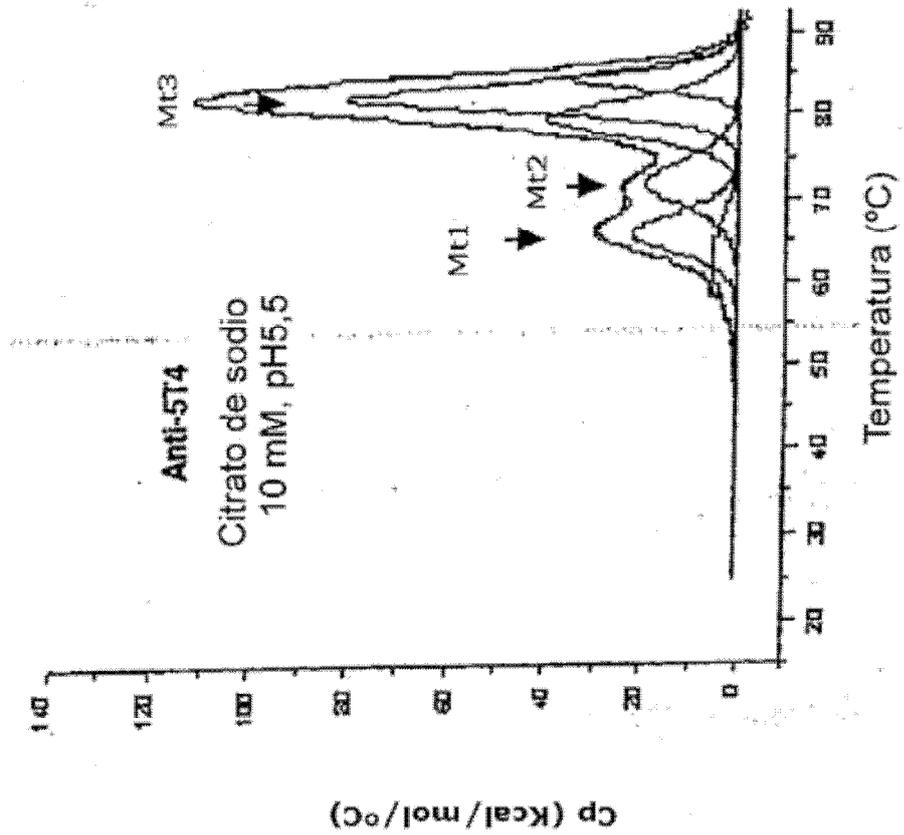


FIG 23B

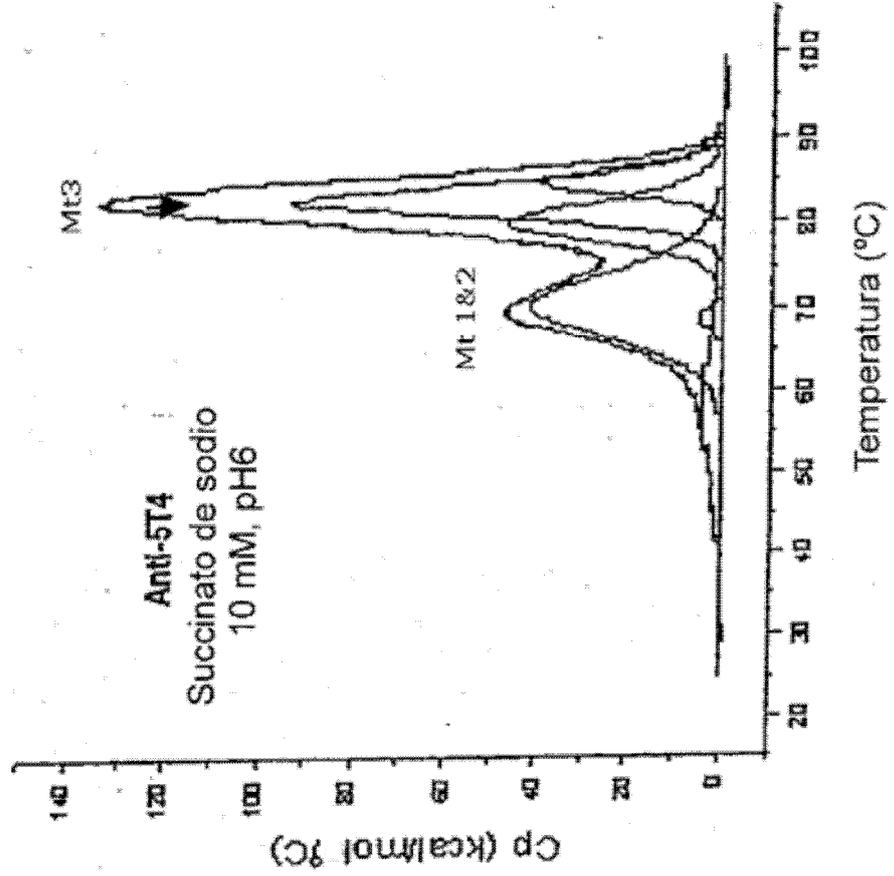




FIG 25

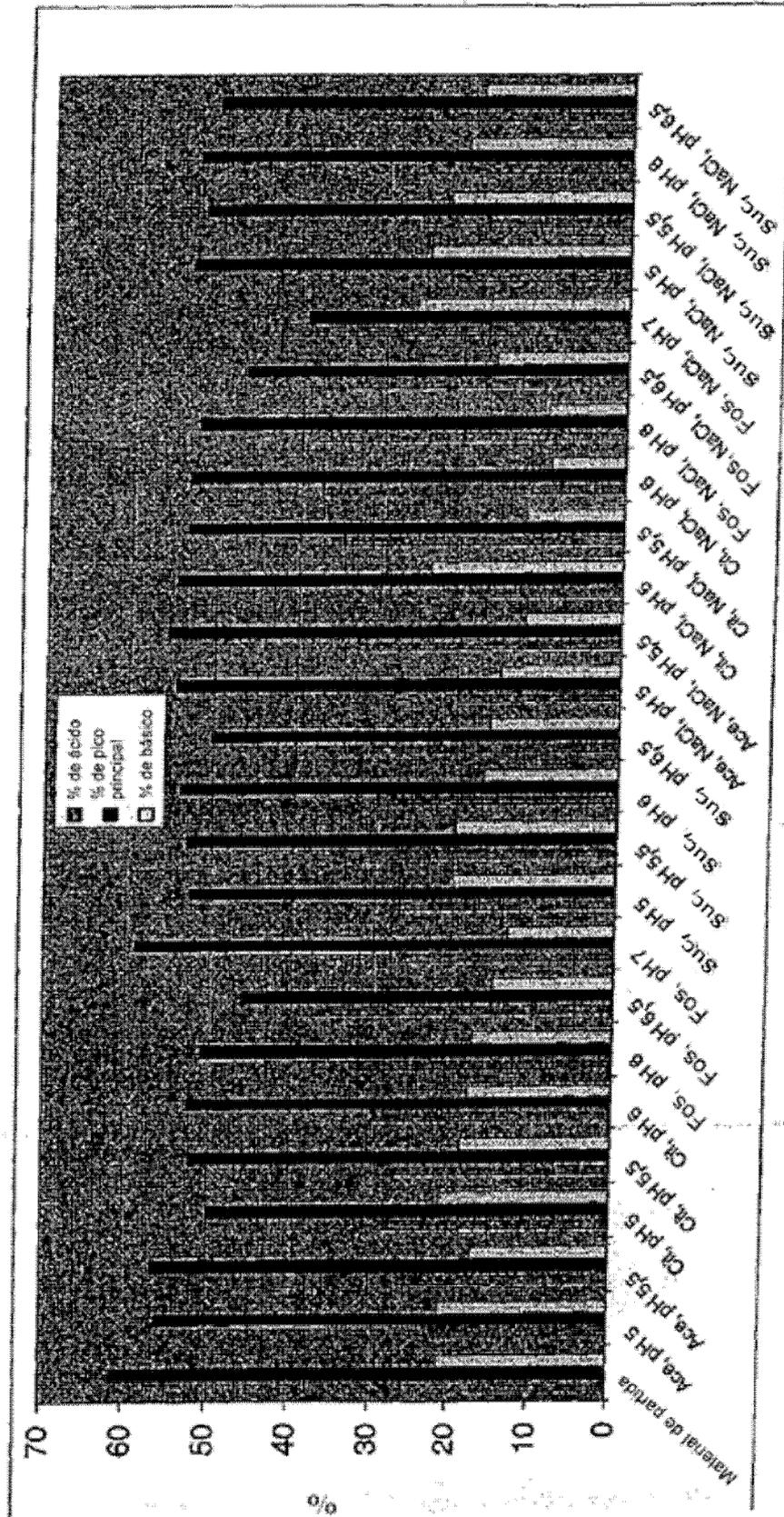


FIG 26A

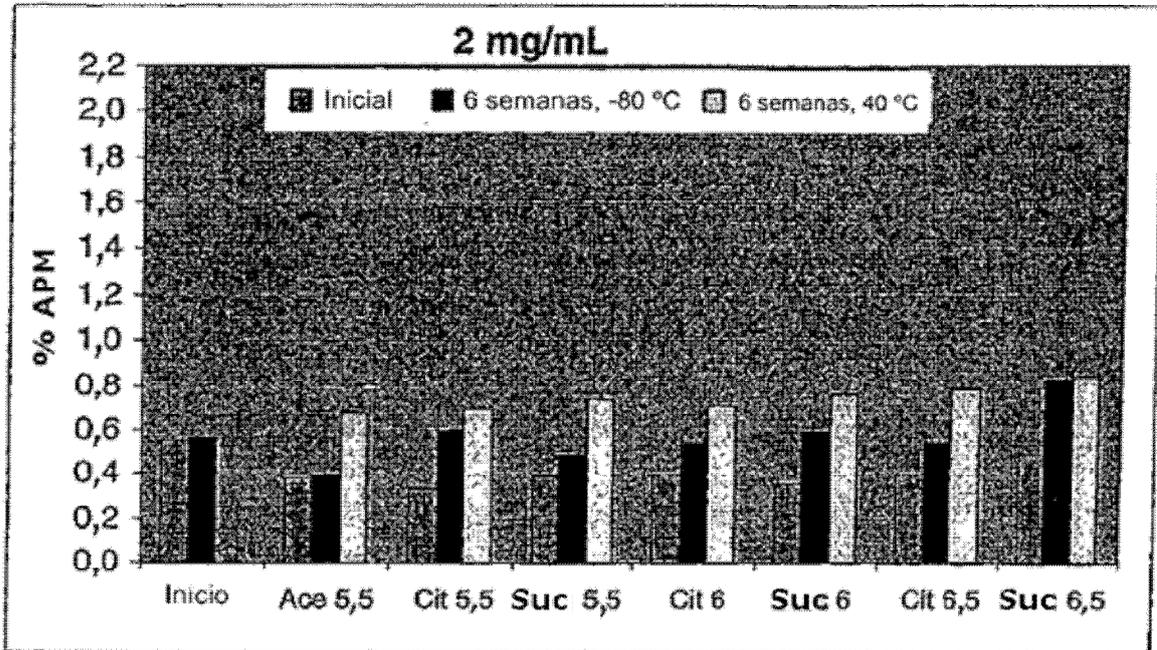


FIG 26B

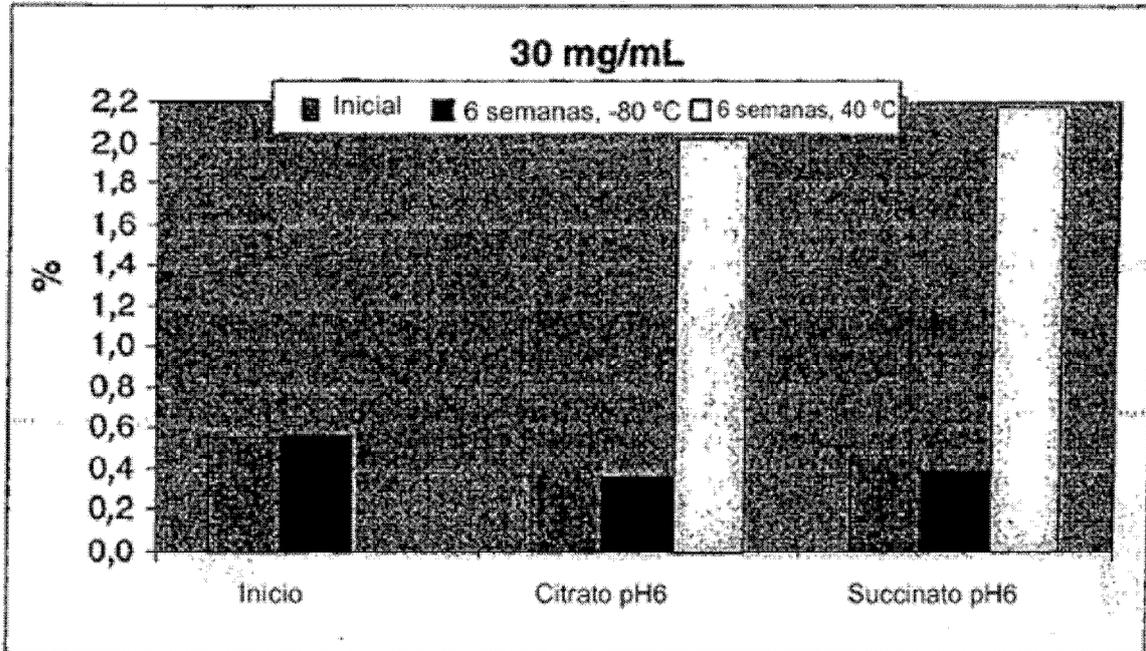


FIG 27A

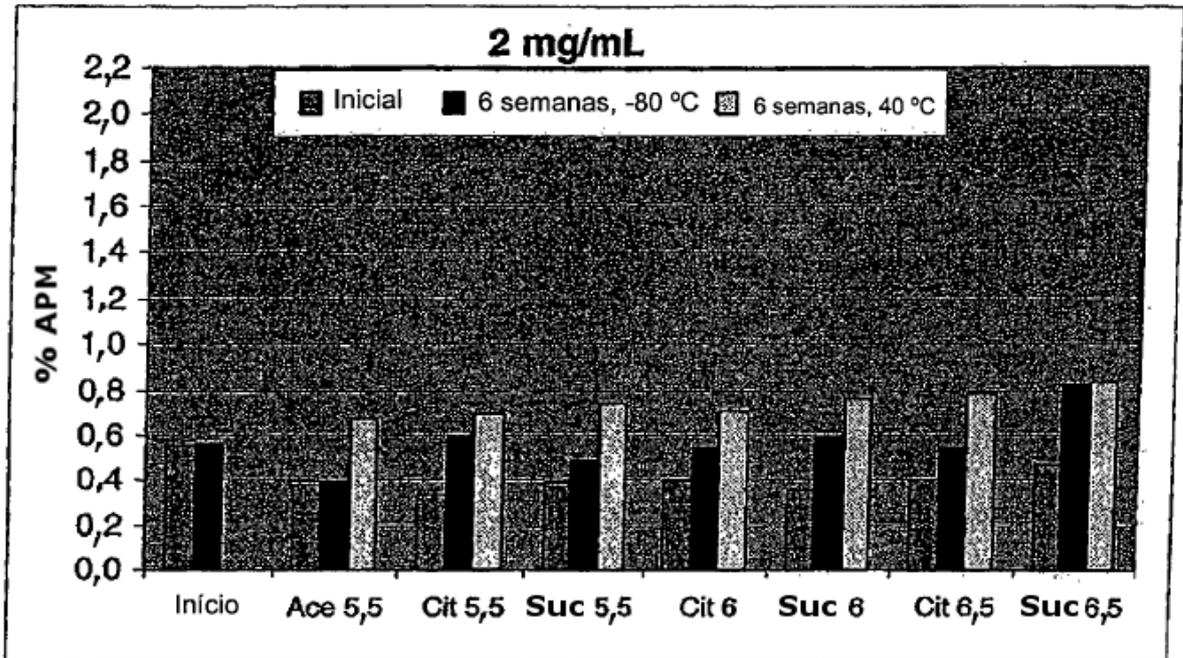


FIG 27B

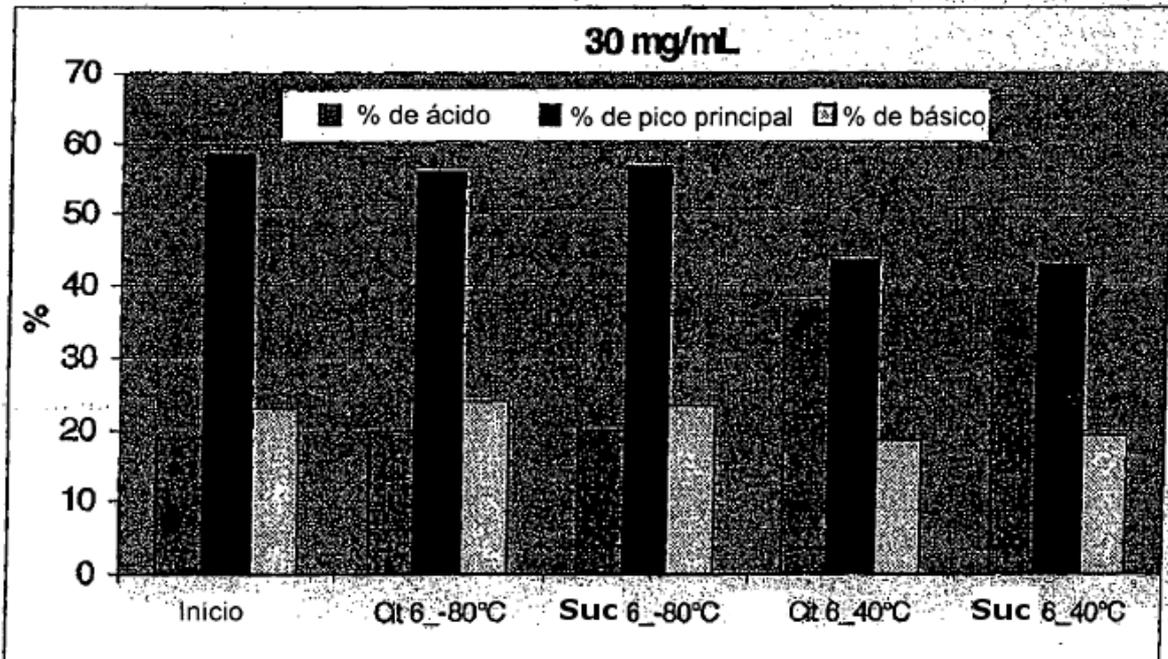


FIG 28

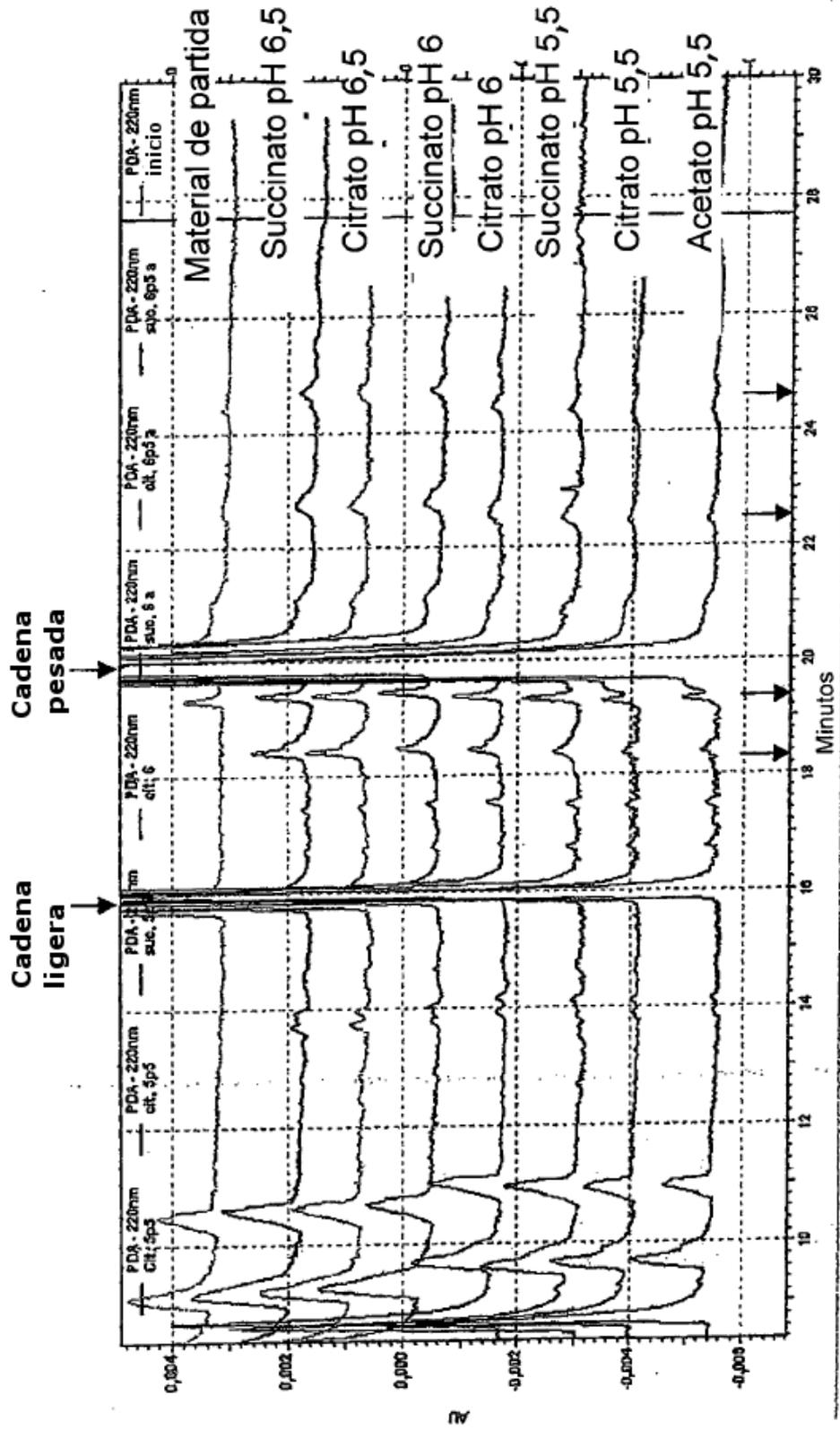


FIG 29A

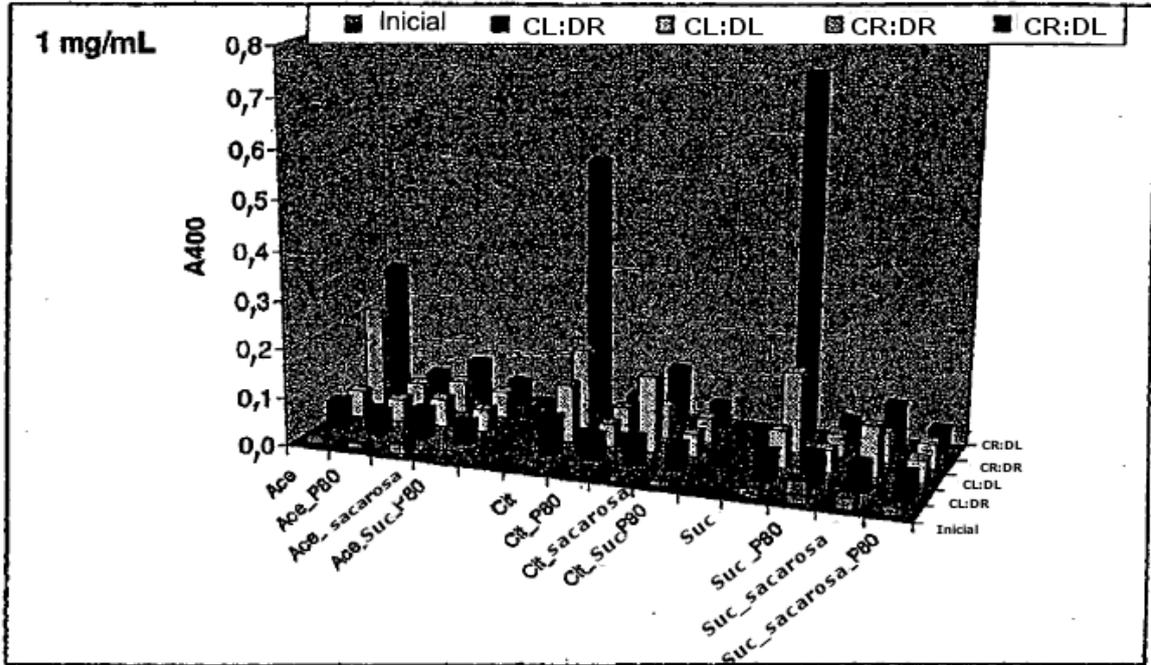


FIG 29B

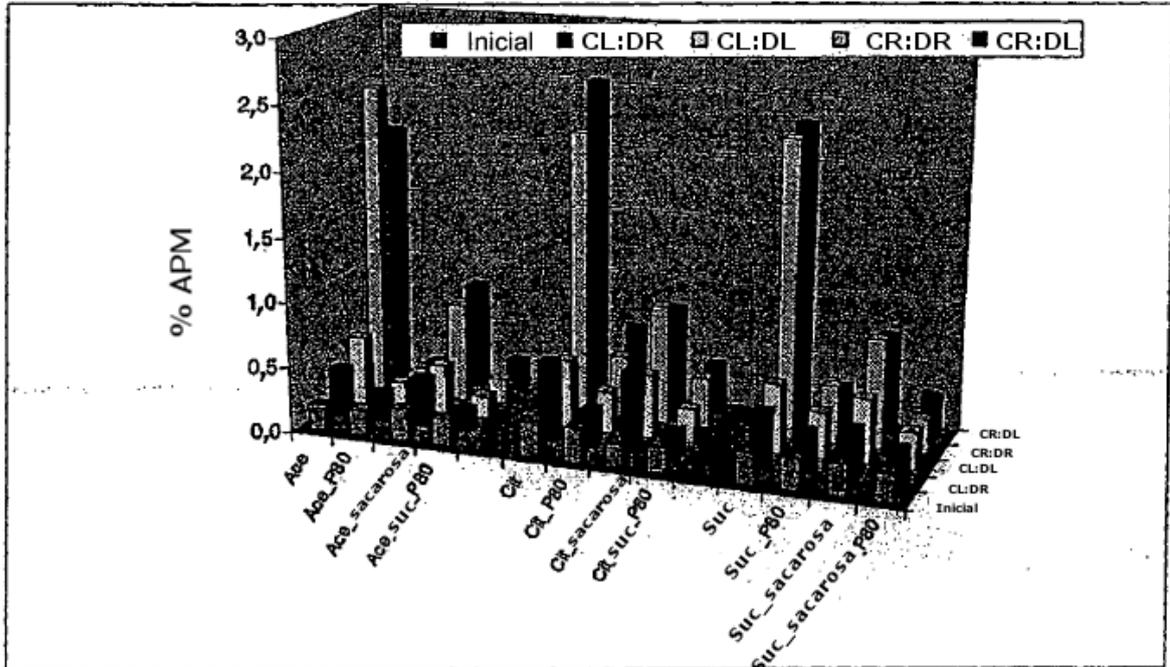


FIG 30A

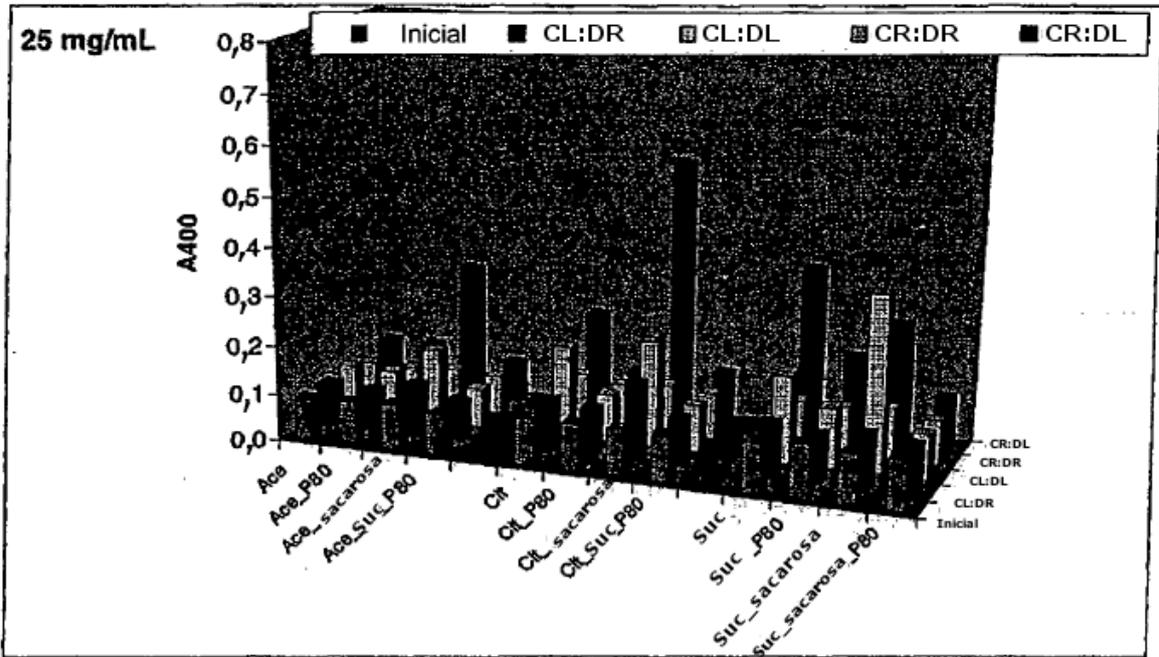


FIG 30B

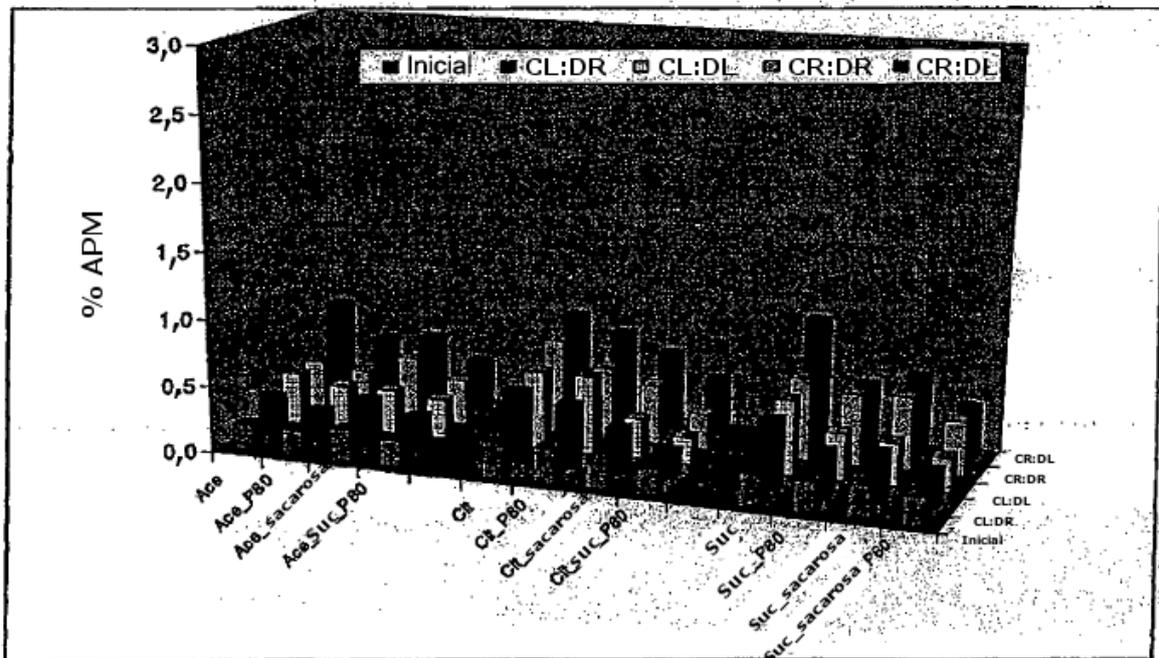


FIG 31A

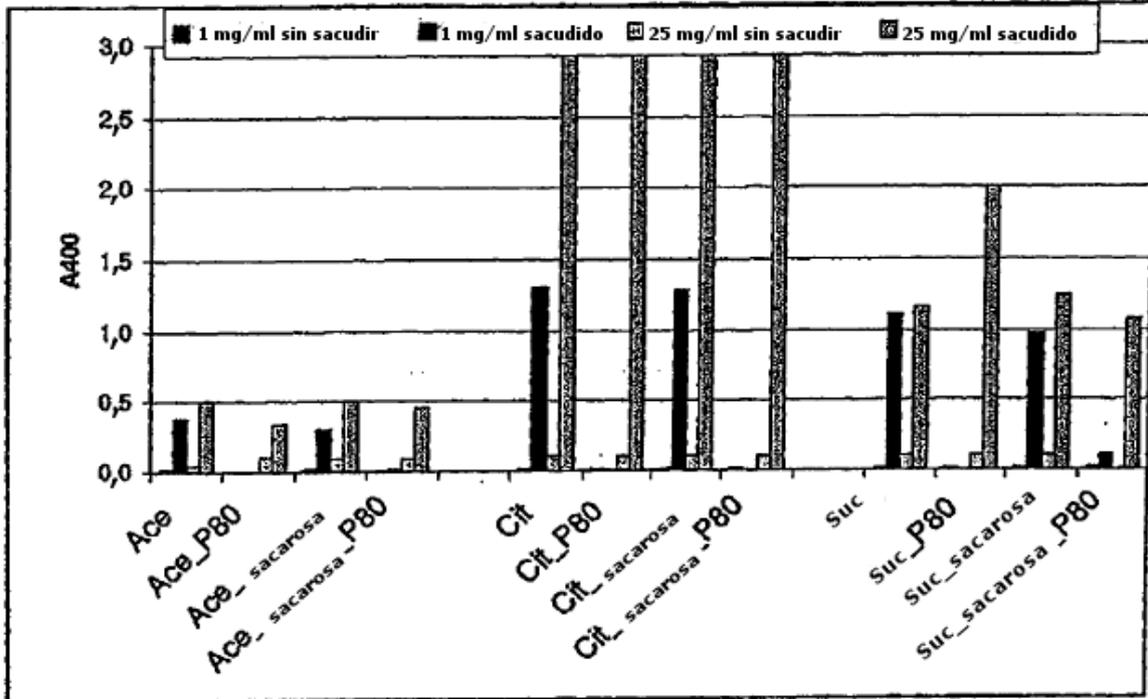


FIG 31B

