

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 895**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/US2014/026841**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14160495**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14773506 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.07.2018 EP 2968466**

54 Título: **Formulaciones con oxidación reducida**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361780845 P

27.11.2013 US 201361909813 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.11.2018

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

ALAVATTAM, SREEDHARA;
MALLANEY, MARY y
GREWAL, PARBIR

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 688 895 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 con oxidación reducida

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a formulaciones líquidas que comprenden una proteína y que comprenden además un compuesto que previene la oxidación de dicha proteína, a procedimientos para producir y usar las formulaciones líquidas, así como a procedimientos de cribado para determinar compuestos que previenen la oxidación de proteínas en composiciones de proteínas, en los que la proteína es un anticuerpo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La degradación oxidativa de los residuos de aminoácido es un fenómeno observado comúnmente en los fármacos de proteínas. Una serie de residuos de aminoácido son sensibles a la oxidación, en particular, metionina (Met), cisteína (Cys), histidina (His), triptófano (Trp) y tirosina (Tyr) (Li *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 48:490-500 (1995)). La oxidación se observa típicamente cuando la proteína se expone a peróxido de hidrógeno, luz, iones de metales o una combinación de estos durante diversas etapas de procesamiento (Li *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 48:490-500 (1995)). En particular, las proteínas expuestas a la luz (Wei, *et al.*, *Analytical Chemistry* 79(7):2797-2805 (2007)), AAPH o a los reactivos de Fenton (Ji *et al.*, *J Pharm Sci* 98(12):4485-500 (2009)) han mostrado niveles de oxidación incrementados en residuos de triptófano, mientras que las expuestas a peróxido de hidrógeno han mostrado típicamente solo oxidación de metionina (Ji *et al.*, *J Pharm Sci* 98(12):4485-500 (2009)). La exposición a la luz puede dar como resultado la oxidación de proteínas por medio de la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO), incluyendo oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno y superóxido (Li *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 48:490-500 (1995); Wei, *et al.*, *Analytical Chemistry* 79(7):2797-2805 (2007); Ji *et al.*, *J Pharm Sci* 98(12):4485-500 (2009); Frokjaer *et al.*, *Nat Rev Drug Discov* 4(4):298-306 (2005)), mientras que la oxidación de proteínas se produce típicamente por medio de radicales hidroxilo en la reacción mediada por Fenton (Prousek *et al.*, *Pure and Applied Chemistry* 79(12):2325-2338 (2007)) y por medio de peróxidos de alcohol en la reacción mediada por AAPH (Werber *et al.*, *J Pharm Sci* 100(8):3307-15 (2011)). La oxidación de triptófano da lugar a una miríada de productos de oxidación, incluyendo hidroxitriptófano, cinurenina y *N*-formilcinurenina, y tiene el potencial de influir en la seguridad y eficacia (Li *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 48:490-500 (1995); Ji *et al.*, *J Pharm Sci* 98(12):4485-500 (2009); Frokjaer *et al.*, *Nat Rev Drug Discov* 4(4):298-306 (2005)). Se ha informado de la oxidación de un residuo de triptófano particular en la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal que se ha correlacionado con la pérdida de la función biológica (Wei, *et al.*, *Analytical Chemistry* 79(7):2797-2805 (2007)). Recientemente se ha informado de la oxidación de Trp mediada por un ion de metal coordinado con histidina para una molécula de Fab (Lam *et al.*, *Pharm Res* 28(10):2543-55 (2011)). La autooxidación de polisorbato 20 en la formulación de Fab, que da lugar a la generación de diversos peróxidos, también se ha mencionado en el mismo informe. La generación inducida por autooxidación de estos peróxidos también puede dar lugar a la oxidación de metionina en la proteína durante el almacenamiento a largo plazo de la especialidad farmacéutica, puesto que se ha sugerido que los residuos de Met en las proteínas actúan como antioxidantes internos (Levine *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(26):15036-15040 (1996)) y se oxidan fácilmente mediante peróxidos. La oxidación de los residuos de aminoácido tiene el potencial de influir en la actividad biológica de la proteína. Esto puede ser especialmente cierto para los anticuerpos monoclonales (mAb). La oxidación de metionina en Met254 y Met430 en un mAb IgG1 influye potencialmente en la semivida en suero en ratones transgénicos (Wang *et al.*, *Molecular Immunology* 48(6-7):860-866 (2011)) y también influye en la unión de IgG1 humana a los receptores FcRn y Fc gamma (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, *Molecular Immunology* 46(8-9):1878-82 (2009)).

La estabilidad de las proteínas, especialmente en estado líquido, necesita evaluarse durante la fabricación y el almacenamiento de las especialidades farmacéuticas. El desarrollo de formulaciones farmacéuticas a veces incluye la adición de antioxidantes para prevenir la oxidación del principio activo. La adición de L-metionina a las formulaciones ha dado como resultado la reducción de la oxidación de los residuos de metionina en proteínas y péptidos (Ji *et al.*, *J Pharm Sci* 98(12):4485-500 (2009); Lam *et al.*, *Journal of Pharmaceutical Sciences* 86(11):1250-1255 (1997)). Asimismo, se ha demostrado que la adición de L-triptófano reduce la oxidación de los residuos de triptófano (Ji *et al.*, *J Pharm Sci* 98(12):4485-500 (2009); Lam *et al.*, *Pharm Res* 28(10):2543-55 (2011)). Sin embargo, L-Trp posee una fuerte absorbancia en la región UV (260-290 nm), convirtiéndole en una diana principal durante la fotooxidación (Creed, D., *Photochemistry and Photobiology* 39(4):537-562 (1984)). Se ha planteado la hipótesis de que Trp sea un fotosensibilizante endógeno que potencia la fotooxidación dependiente de oxígeno de tirosina (Babu *et al.*, *Indian J Biochem Biophys* 29(3):296-8 (1992)) y otros aminoácidos (Bent *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* 97(10):2612-2619 (1975)). Se ha demostrado que L-Trp puede generar peróxido de hidrógeno cuando se expone a la luz y que L-Trp bajo luz UV produce peróxido de hidrógeno por medio del anión superóxido (McCormick *et al.*, *Science* 191(4226):468-9 (1976); Wentworth *et al.*, *Science* 293(5536):1806-11 (2001); McCormick *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* 100:312-313 (1978)). Adicionalmente, se sabe que el triptófano produce oxígeno singlete tras su exposición a la luz (Davies, M.J., *Biochem Biophys Res Commun* 305(3):761-70 (2003)). De forma similar a la oxidación de proteínas inducida mediante autooxidación de polisorbato 20, es posible que se pueda producir la oxidación de proteínas tras la generación de ERO por otros excipientes en la

formulación de proteínas (por ejemplo, L-Trp) en condiciones de manipulación normales.

En el documento EP 1 260 230 A1 se divulgan formulaciones de proteínas estables que comprenden triptófano o derivados de triptófano, tales como acetiltryptófano, que actúan como estabilizantes. El documento
5 WO 2010/032220 A1 se refiere a formulaciones de anticuerpos líquidas y estables en las que se usa trehalosa como agente de tonicidad y estabilizante.

Es evidente a partir de estudios recientes que la adición de excipientes estándar, tales como L-Trp y polisorbatos, a composiciones de proteínas que están destinados a estabilizar la proteína puede dar como resultado consecuencias inesperadas y no deseadas, tales como la oxidación inducida por ERO de la proteína. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad identificar excipientes alternativos para su uso en composiciones de proteínas y desarrollar dichas composiciones.
10

BREVE SUMARIO DE LA INVENCIÓN 15

En el presente documento se proporcionan formulaciones que comprenden una proteína y un compuesto que previene la oxidación de la proteína en la formulación, en las que la proteína es un anticuerpo, procedimientos de preparación de las formulaciones y procedimientos de cribado de compuestos que previenen la oxidación de una proteína en una composición de proteínas en la que la proteína es un anticuerpo.
20

En un aspecto, en el presente documento se proporciona una formulación líquida que comprende una proteína y un compuesto que previene la oxidación de la proteína en la formulación líquida, en la que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 5-hidroxitriptófano, 5-hidroxiindol, 7-hidroxiindol, y serotonina, y en la que la proteína es un anticuerpo.
25

En algunos modos de realización, la formulación es acuosa.

En algunos modos de realización, el compuesto que previene la oxidación de la proteína en la formulación es desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 10 mM, o hasta la concentración más alta a la que el compuesto es soluble en la formulación. En algunos modos de realización, el compuesto que previene la oxidación de la proteína en la formulación es desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 9 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 8 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 7 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 6 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 5 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 4 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 3 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 2 mM, desde aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2 mM, desde aproximadamente 0,6 mM a aproximadamente 1,5 mM o desde aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 1,25 mM. En algunos modos de realización, el compuesto que previene la oxidación de la proteína en la formulación es de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 1 mM. En algunos modos de realización, el compuesto que previene la oxidación de la proteína en la formulación es desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 5 mM. En algunos modos de realización, el compuesto que previene la oxidación de la proteína en la formulación es aproximadamente 1 mM. En algunos modos de realización, el compuesto previene la oxidación de triptófano y/o metionina en la proteína. En algunos modos de realización, el compuesto previene la oxidación de la proteína mediante una especie reactiva del oxígeno. En algunos modos de realización, la especie reactiva del oxígeno se selecciona del grupo que consiste en oxígeno singlete, un superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno, un radical hidroxilo y un peróxido de alquilo.
30
35
40
45

En algunos modos de realización, la proteína en la formulación es sensible a la oxidación. En algunos modos de realización, el triptófano en la proteína es sensible a la oxidación. En algunos modos de realización, la proteína es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un fragmento de anticuerpo. En algunos modos de realización, la concentración de proteínas en la formulación es de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml.
50

En algunos modos de realización, la formulación comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en un estabilizante, un tampón, un tensioactivo y un agente de tonicidad. En algunos modos de realización, la formulación tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0.
55

En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un procedimiento de preparación de una formulación líquida que comprende añadir una cantidad de un compuesto que previene la oxidación de una proteína a la formulación líquida, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 5-hidroxitriptófano, 5-hidroxiindol, 7-hidroxiindol, y serotonina. En otro aspecto, en el presente documento se proporciona un procedimiento de prevención de la oxidación de una proteína en una formulación líquida que comprende añadir una cantidad de un compuesto que previene la oxidación de la proteína a la formulación líquida, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 5-hidroxitriptófano, 5-hidroxiindol, 7-hidroxiindol, y serotonina.
60

En algunos modos de realización de los procedimientos descritos en el presente documento, la formulación es una
65

formulación farmacéutica adecuada para su administración a un sujeto. En algunos modos de realización, la formulación es acuosa.

5 En algunos modos de realización de los procedimientos descritos en el presente documento, el compuesto en la formulación es desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 10 mM, o hasta la concentración más alta a la que el compuesto es soluble en la formulación. En algunos modos de realización, el compuesto en la formulación está a una concentración desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 9 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 8 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 7 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 6 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 5 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 4 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 3 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 2 mM, desde aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2 mM, desde aproximadamente 0,6 mM a aproximadamente 1,5 mM o desde aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 1,25 mM. En algunos modos de realización, el compuesto en la formulación es de aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 1 mM. En algunos modos de realización, el compuesto en la formulación es desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 5 mM. En algunos modos de realización, el compuesto en la formulación es desde aproximadamente 1 mM. En algunos modos de realización, el compuesto previene la oxidación de triptófano y/o metionina en la proteína. En algunos modos de realización, el compuesto previene la oxidación de la proteína mediante una especie reactiva del oxígeno. En algunos modos de realización, la especie reactiva del oxígeno se selecciona del grupo que consiste en oxígeno singlete, un superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno, un radical hidroxilo y un peróxido de alquilo.

10 En algunos modos de realización, la proteína es sensible a la oxidación. En algunos modos de realización, el triptófano en la proteína es sensible a la oxidación. En algunos modos de realización, la proteína es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un fragmento de anticuerpo. En algunos modos de realización, la concentración de proteínas en la formulación es de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml.

15 En algunos modos de realización, se añaden a la formulación uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en un estabilizante, un tampón, un tensioactivo y un agente de tonicidad. En algunos modos de realización, la formulación tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0.

20 En otro aspecto, en el presente documento se describe un procedimiento de cribado de un compuesto que previene la oxidación de una proteína en una composición de proteínas, que comprende seleccionar un compuesto que tiene un potencial de oxidación más pequeño y menos fotosensibilidad en comparación con L-triptófano, y someter a prueba el efecto del compuesto seleccionado en la prevención de la oxidación de la proteína.

25 En algunos de los procedimientos, la fotosensibilidad se mide basándose en la cantidad de H_2O_2 producido por el compuesto tras la exposición a la luz. En algunos modos de realización, se selecciona el compuesto que produce menos de aproximadamente un 20 % de la cantidad de H_2O_2 producido por L-triptófano. En algunos modos de realización, el potencial de oxidación se mide mediante voltametría cíclica. En algunos modos de realización, el compuesto seleccionado se somete a prueba para determinar el efecto en la prevención de la oxidación de la proteína mediante las especies reactivas del oxígeno generadas por diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), luz y/o un reactivo de Fenton.

30 Se ha de entender que una, algunas o todas las propiedades de los diversos modos de realización descritos en el presente documento se pueden combinar para formar otros modos de realización de la presente solicitud. Estos se describen además mediante la descripción detallada que sigue.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

35 La **figura 1** es una serie de gráficos que demuestran la oxidación de **A)** Fab en mAb1 y **B)** Fc en mAb1 después de ocho horas de exposición a la luz a $250 W/m^2$. El mAb1 estaba presente a 5 mg/ml en acetato de histidina 20 mM, trehalosa 250 mM, polisorbato 20 al 0,02 %. Todos los frascos se dispusieron en la caja de luz, salvo el Mat. de ref. de mAb1. Los frascos de CTRL con papel metalizado se cubrieron con papel metalizado antes de su disposición en la caja de luz. Se promediaron tres frascos experimentales separados para cada muestra, salvo que "Met 10 mM, Trp 1 mM" (*) fue el promedio de dos frascos experimentales y Mat. de ref. de mAb1 fue un frasco experimental con tres inyecciones independientes en la HPLC. Las barras de error representan una desviación estándar.

40 La **figura 2** es un gráfico que muestra la producción de H_2O_2 dependiente de la dosis por L-Trp. Los rombos indican L-Trp solo; los triángulos indican L-Trp + SOD; los círculos y cuadrados indican L-Trp + $NaN_3 \pm SOD$. Todos los estudios se realizaron en L-His HCl 20 mM, pH 5,5.

45 La **figura 3** es una serie de gráficos que demuestran **A)** la producción de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en formulaciones de mAb1 de 50 mg/ml que contienen L-Trp 3,2 mM cuando se exponen a condiciones de luz ambiental durante 1, 3 y 7 días y **B)** el porcentaje (%) de oxidación de Fab en formulaciones de mAb1 que contienen L-Trp 3,2 mM después de 10 días de exposición a condiciones de luz ambiental.

La **figura 4** es una serie de gráficos que muestran la generación de peróxido de hidrógeno mediante derivados de triptófano y derivados de indol con agresión lumínica durante 4 horas a 250 W/m². **A)** Cribado de derivados de triptófano (1 mM) para la generación de peróxido de hidrógeno (μM) en una formulación de HisAc 20 mM, pH 5,5. **B)** Cribado de derivados de indol (1 mM) para la generación de peróxido de hidrógeno (μM) en una formulación de HisAc 20 mM, pH 5,5.

La **figura 5** es un gráfico que muestra el efecto de NaN₃ en la producción de H₂O₂ por diversos derivados de Trp tras la exposición a la luz. Los datos se muestran como una proporción con respecto al peróxido generado mediante L-Trp.

La **figura 6** es un gráfico que muestra la correlación entre el potencial de oxidación y la formación de peróxido inducida por la luz. La región con recuadros muestra compuestos antioxidantes candidatos.

La **figura 7** es una serie de gráficos que muestran la oxidación de **A)** Fab en mAb1 y **B)** Fc en mAb1 después de la incubación con AAPH. Todas las muestras se incubaron con AAPH salvo Mat. de ref. de mAb1 y Sin AAPH. Todas las muestras se incubaron a 40 °C, salvo Mat. de ref. de mAb1. Los datos mostrados son el promedio de tres muestras experimentales ± 1 DE, salvo Mat. de ref. de mAb1, que es el promedio de seis inyecciones en la HPLC sin barras de error.

La **figura 8** es una serie de gráficos que muestran la oxidación de **A)** Fab en mAb1 y **B)** Fc en mAb1 después de dieciséis horas de exposición a la luz a 250 W/m². Todos los frascos se dispusieron en la caja de luz, salvo el Mat. de ref. de mAb1. Los frascos de CTRL con papel metalizado se cubrieron con papel metalizado antes de su disposición en la caja de luz. Se promediaron tres frascos experimentales separados para cada muestra, salvo que L-triptofanamida (*) fue el promedio de dos frascos experimentales y Mat. de ref. de mAb1 fue un frasco con tres inyecciones independientes en la HPLC. Las barras de error representan una desviación estándar.

La **figura 9** es una serie de gráficos que muestran la oxidación de **A)** Fab en 3 mg/ml de mAb1 y **B)** Fc en 3 mg/ml de mAb1 tras la reacción de Fenton usando 10 ppm de H₂O₂ y Fe(III) 0,2 mM. La reacción se incubó a 40 °C durante 3 horas, se inactivó con L-Met 100 mM y se analizó usando RP-HPLC después de digestión con papaína. Todas las muestras son el promedio de tres frascos separados y el control de mAb1 (Mat. de ref.) fue un frasco con cinco inyecciones independientes en la HPLC. Las barras de error representan una desviación estándar.

La **figura 10** es una serie de diagramas que muestran el supuesto mecanismo de excitación de **A)** L-Trp y **B)** 5-hidroxi-L-triptófano y en la generación e inactivación de ¹O₂. k_{25C} representa la constante de velocidad de segundo orden para la inactivación de ¹O₂ (Dad *et al.*, J Photochem Photobiol B, 78(3):245-51 (2005)), mientras que E_{ox} es el potencial de oxidación de la molécula frente a Ag/AgCl.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Definiciones.

Antes de describir la invención en detalle, se ha de entender que la presente invención no se limita a composiciones o sistemas biológicos particulares, que, por supuesto, pueden variar. También se ha de entender que la terminología usada en el presente documento es para el fin de describir solo modos de realización particulares y no pretende ser limitante.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en tal forma que permite que la actividad biológica del principio activo sea eficaz y que no contiene ningún componente adicional que sea inaceptablemente tóxico para un sujeto al que se administraría la formulación. Dichas formulaciones son estériles.

Una formulación "estéril" es aséptica o libre o esencialmente libre de cualquier microorganismo vivo y de sus esporas.

Una formulación "estable" es una en la que la proteína en la misma retiene esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras su almacenamiento. Preferentemente, la formulación retiene esencialmente su estabilidad física y química, así como su actividad biológica tras su almacenamiento. El periodo de almacenamiento se selecciona, en general, basándose en el periodo de validez pretendido de la formulación. Están disponibles en la técnica diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad se puede medir a una cantidad seleccionada de exposición a la luz y/o temperatura durante un periodo de tiempo seleccionado. La estabilidad se puede evaluar cualitativa y/o cuantitativamente en una variedad de formas diferentes, incluyendo la evaluación de la formación de agregados (por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño, midiendo la turbidez y/o mediante inspección visual); evaluación de la formación de ERO (por ejemplo, usando un ensayo de agresión

lumínica o un ensayo de agresión con diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH)); oxidación de residuos de aminoácido específicos de la proteína (por ejemplo, un residuo de Trp y/o un residuo de Met de un anticuerpo monoclonal); evaluando la heterogeneidad de carga usando cromatografía de intercambio catiónico, isoelectroenfoque capilar por formación de imágenes (icIEF) o electroforesis capilar en zona; análisis de secuencias aminoterminales o carboxiterminales; análisis por espectrometría de masas; análisis por SDS-PAGE para comparar anticuerpos reducidos e inalterados; análisis por cartografía peptídica (por ejemplo, tripsínica o LYS-C); evaluando la actividad biológica o la función de unión a diana de la proteína (por ejemplo, la función de unión a antígeno de un anticuerpo); etc. La inestabilidad puede implicar uno o más de: agregación, desamidación (por ejemplo, desamidación de Asn), oxidación (por ejemplo, oxidación de Met y/u oxidación de Trp), isomerización (por ejemplo, isomerización de Asp), truncamiento de lisina C terminal/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo, fragmentación de la región bisagra), formación de succinimida, cisteína(s) desapareada(s), extensión N terminal, procesamiento C terminal, diferencias de glucosilación, etc.

Una proteína "retiene su estabilidad física" en una formulación farmacéutica si no muestra signos o muy pocos de agregación, precipitación y/o desnaturalización tras el examen visual del color y/o claridad, o como se mide mediante dispersión de la luz UV o mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Una proteína "retiene su estabilidad química" en una formulación farmacéutica, si la estabilidad química en un momento dado es tal que se considera que la proteína todavía retiene su actividad biológica como se define a continuación. La estabilidad química se puede evaluar detectando y cuantificando las formas alteradas químicamente de la proteína. La alteración química puede implicar la oxidación de proteínas que se puede evaluar usando cartografía peptídica tripsínica, cromatografía de líquidos de alto rendimiento (HPLC) de fase inversa y cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL/EM), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen alteración de carga de la proteína que se puede evaluar mediante cromatografía de intercambio iónico o icIEF, por ejemplo.

Una proteína "retiene su actividad biológica" en una formulación farmacéutica si la actividad biológica de la proteína en un momento dado está en aproximadamente un 10 % (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica presentada en el momento en el que se preparó la formulación farmacéutica como se determina, por ejemplo, en un ensayo de unión a antígeno para un anticuerpo monoclonal.

Como se usa en el presente documento, "actividad biológica" de una proteína se refiere a la capacidad de la proteína para unirse a su diana, por ejemplo, la capacidad de un anticuerpo monoclonal para unirse a un antígeno. Puede incluir además una respuesta biológica que se puede medir *in vitro* o *in vivo*. Dicha actividad puede ser antagonista o agonista.

Una proteína que es "sensible a la oxidación" es una que comprende uno o más residuo(s) que se ha descubierto que es/son proclive(s) a la oxidación, tales como, pero no limitados a, metionina (Met), cisteína (Cys), histidina (His), triptófano (Trp) y tirosina (Tyr). Por ejemplo, un aminoácido triptófano en la porción Fab de un anticuerpo monoclonal o un aminoácido metionina en la porción Fc de un anticuerpo monoclonal puede ser sensible a la oxidación.

Por "isotónico" se quiere decir que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán, en general, una presión osmótica desde aproximadamente 250 a 350 mOsm. La isotonicidad se puede medir usando un osmómetro de tipo de presión de vapor o congelación de hielo, por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, "tampón" se refiere a una solución tamponada que resiste los cambios en el pH mediante la acción de sus componentes conjugados ácido-base. El tampón de la presente invención tiene preferentemente un pH en el intervalo desde aproximadamente 4,5 a aproximadamente 8,0. Por ejemplo, acetato de histidina es un ejemplo de un tampón que controlará el pH en este intervalo.

Un "conservante" es un compuesto que se puede incluir opcionalmente en la formulación para reducir esencialmente la acción bacteriana en la misma, facilitando, por tanto, la producción de una formulación de múltiples usos, por ejemplo. Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en la que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos, tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. En un modo de realización, el conservante en el presente documento es alcohol bencílico.

Como se usa en el presente documento, un "tensioactivo" se refiere a un agente tensioactivo, preferentemente un tensioactivo no iónico. Los ejemplos de tensioactivos en el presente documento incluyen polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 y polisorbato 80); poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188); tritón; dodecilsulfato de sodio (SDS); laurilsulfato de sodio; octilglucósido de sodio; lauril, miristil, linoleil o estearilsulfobetaina; lauril, miristil, linoleil o estearilsarcosina; linoleil, miristil o cetilbetaína; lauroamidopropil, cocamidopropil, linoleamidopropil, miristamidopropil, palmidopropil o isosteamidopropilbetaína (por ejemplo, lauroamidopropil); miristamidopropil,

palmidopropil o isostearamidopropildimetilamina; metilcocoilaurato sódico o metiloleilaurato disódico; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.); polietilglicol, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, Pluronic, PF68 etc.); etc. En un modo de realización, el tensioactivo en el presente documento es polisorbato 20.

Los excipientes o vehículos "farmacéuticamente aceptables" usados en el presente documento incluyen vehículos, estabilizantes, tampones, ácidos, bases, azúcares, conservantes, tensioactivos, agentes de tonicidad farmacéuticamente aceptables, y similares, que se conocen bien en la técnica (Remington: *The Science and Practice of Pharmacy*, 22nd Ed., Pharmaceutical Press, 2012). Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen tampones, tales como fosfato, citrato, acetato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico, L-triptófano y metionina; polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 residuos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos, tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos, tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros glúcidos, incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; complejos de metal, tales como complejos Zn-proteína; agentes quelantes, tales como EDTA; alditoles, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sales, tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos, tales como polisorbato, poloxámero, polietilenglicol (PEG) y PLURONICS™. Los excipientes o vehículos "farmacéuticamente aceptables" son los que se pueden administrar razonablemente a un sujeto para proporcionar una dosis eficaz del principio activo empleado y que no son tóxicos para el sujeto expuesto a los mismos a las dosificaciones y concentraciones empleadas.

La proteína que se formula es preferente y esencialmente pura y deseable y esencialmente homogénea (por ejemplo, libre de proteínas contaminantes, etc.). Proteína "esencialmente pura" significa una composición que comprende al menos aproximadamente un 90 % en peso de la proteína (por ejemplo, anticuerpo monoclonal) basándose en el peso total de la composición, preferentemente al menos aproximadamente un 95 % en peso. Proteína "esencialmente homogénea" significa una composición que comprende al menos aproximadamente un 99 % en peso de proteína (por ejemplo, anticuerpo monoclonal), basándose en el peso total de la composición.

Los términos "proteína", "polipéptido" y "péptido" se usan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a polímeros de aminoácidos de cualquier longitud. El polímero puede ser lineal o ramificado, puede comprender aminoácidos modificados y puede estar interrumpido por sustancias distintas de aminoácidos. Los términos también engloban un polímero de aminoácidos que se ha modificado naturalmente o mediante intervención; por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glucosilación, lipidación, acetilación, fosforilación o cualquier otra manipulación o modificación, tal como conjugación con un componente de marcado. También se incluyen en la definición, por ejemplo, proteínas que contienen uno o más análogos de un aminoácido (incluyendo, por ejemplo, aminoácidos no naturales, etc.), así como otras modificaciones conocidas en la técnica. Los ejemplos de proteínas englobadas en la definición en el presente documento incluyen proteínas de mamífero, tales como, por ejemplo, renina; una hormona del crecimiento, incluyendo la hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; hormona liberadora de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; leptina; factores de coagulación, tales como factor VIIIc, factor IX, tromboplastina tisular y factor de Von Willebrand; factores de anticoagulación, tales como proteína C; péptido natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa u orina humana, o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; factor de necrosis tumoral alfa y beta; un receptor del factor de necrosis tumoral, tal como el receptor de muerte 5 y CD120; ligando inductor de la apoptosis relacionado con el TNF (TRAIL); antígeno de maduración de linfocitos B (BCMA); estimulador de linfocitos B (BLyS); un ligando inductor de la proliferación (APRIL); encefalina; RANTES (regulada por activación, expresada y secretada normalmente por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1-alfa) humana; una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; hormona antimülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropinas de ratón; una proteína microbiana, tal como betalactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; factor de crecimiento de células endoteliales derivado de plaquetas (PD-ECGF); una proteína de la familia del factor de crecimiento endotelial vascular (por ejemplo, VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D y P1GF); una proteína de la familia del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (por ejemplo, PDGF-A, PDGF-B, PDGF-C, PDGF-D y dímeros de los mismos); familia del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), tal como aFGF, bFGF, FGF4, y FGF9; factor de crecimiento epidérmico (EGF); receptores de hormonas o factores de crecimiento, tales como receptor(es) de VEGF (por ejemplo, VEGFR1, VEGFR2 y VEGFR3), receptor(es) del factor de crecimiento epidérmico (EGF) (por ejemplo, el receptor ErbB1, ErbB2, ErbB3 y ErbB4), receptor(es) del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) (por ejemplo, PDGFR- α y PDGFR- β) y receptor(es) del factor de crecimiento de fibroblastos; ligandos de TIE (angiopoyetinas, ANGPT1, ANGPT2); receptor de angiopoyetina, tal como TIE1 y TIE2; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico, tal como factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-b; factor de crecimiento transformante (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; factor de crecimiento insulinoide I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide; proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); una quimiocina, tal como CXCL12 y CXCR4; un interferón, tal como interferón alfa, beta

- y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; una citocina, tal como interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; midquina; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerador de la degradación; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del virus del sida; proteínas de transporte; receptores de migración dirigida; adreínas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; efrinas; Bv8; ligando similar a delta 4 (DLL4); Del-1; BMP9; BMP10; folistatina; factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)/factor de dispersión (SF); Alk1; Robo4; ESM1; perlecano; dominio similar a EGF, múltiple 7 (EGFL7); CTGF y miembros de su familia; tromboespondinas, tales como tromboespondina 1 y tromboespondina 2; colágenos, tales como colágeno IV y colágeno XVIII; neuropilinas, tales como NRP1 y NRP2; pleiotrofina (PTN); progranulina; proliferina; proteínas Notch, tales como Notch 1 y Notch 4; semaforinas, tales como Sema3A, Sema3C y Sema3F; un antígeno asociado a tumor, tal como CA125 (antígeno de cáncer de ovario); inmunoadesinas; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de las proteínas enumeradas anteriormente, así como anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, que se unen a una o más proteínas, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de las proteínas enumeradas anteriormente.
- El término "anticuerpo" se usa en el presente documento en el sentido más amplio y abarca específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada.
- Una proteína "aislada" (por ejemplo, un anticuerpo aislado) es una que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su ambiente natural son materiales que interferirían en usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos para la proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. La proteína aislada incluye la proteína *in situ* en las células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural de la proteína no estará presente. De manera ordinaria, sin embargo, la proteína aislada se preparará mediante al menos una etapa de purificación.
- Los "anticuerpos naturales" son normalmente glucoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150 000 dalton, compuestas de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se une a una cadena pesada mediante un enlace disulfuro covalente, mientras que el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable en un extremo (V_L) y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido particulares forman una interfaz entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.
- El término "dominio constante" se refiere a la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada con respecto a la otra porción de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión a antígeno. El dominio constante contiene los dominios C_H1 , C_H2 y C_H3 (colectivamente, CH) de la cadena pesada y el dominio CHL (o CL) de la cadena ligera.
- La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios aminotermiales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede denominar " V_H ". El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar " V_L ". Estos dominios son, en general, las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.
- El término "variable" hace referencia al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en las secuencias entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por todos los dominios variables de anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables (HVR), en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas mediante tres HVR, que forman bucles que conectan, y en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina beta. Las HVR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.
- Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de mamífero se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (κ) y lambda (λ), basándose en las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

El término "isotipo" o "subclase" de IgG como se usa en el presente documento quiere decir cualquiera de las subclases de inmunoglobulinas definidas por las características químicas y antigénicas de sus regiones constantes. Dependiendo de las secuencias de aminoácidos de los dominios constantes de sus cadenas pesadas, los anticuerpos (inmunoglobulinas) se pueden asignar a diferentes clases. Existen cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, y varias de estas se pueden dividir además en subclases (isotipos), por ejemplo, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ e IgA₂. Los dominios constantes de la cadena pesada que se corresponden con las diferentes clases de inmunoglobulinas se llaman α , γ , ϵ , μ y δ , respectivamente. Las estructuras de subunidades y configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas se conocen bien y se describen, en general, en, por ejemplo, Abbas *et al. Cellular and Mol. Immunology*, 4.º ed., W.B. Saunders, Co., 2000. Un anticuerpo puede ser parte de una molécula de fusión mayor, formada mediante asociación covalente o no covalente del anticuerpo con una o más de otras proteínas o péptidos.

Los términos "anticuerpo de longitud completa", "anticuerpo inalterado" y "anticuerpo completo" se usan en el presente documento de manera intercambiable para referirse a un anticuerpo en su forma sustancialmente inalterada, no fragmentos de anticuerpo como se define a continuación. Los términos se refieren, en particular, a un anticuerpo con cadenas pesadas que contienen una región Fc.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una porción de un anticuerpo inalterado, comprendiendo preferentemente la región de unión a antígeno del mismo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", cada uno con un sitio de unión a antígeno único, y un fragmento "Fc" residual, cuyo nombre refleja su capacidad de cristalizar fácilmente. El tratamiento con pepsina produce un fragmento F(ab')₂ que tiene dos sitios de combinación de antígeno y todavía se puede reticular con el antígeno. El fragmento Fab contiene los dominios variables de la cadena pesada y ligera y también contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante (CH1) de la cadena pesada. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en la adición de unos pocos residuos en el extremo carboxílico del dominio CH1 de la cadena pesada, incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes tienen un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo F(ab')₂ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También se conocen otros acoplamientos químicos de fragmentos de anticuerpo.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a antígeno completo. En un modo de realización, una especie de Fv bicatenario consiste en un dímero de un dominio variable de la cadena ligera y uno de la pesada en estrecha asociación no covalente. En una especie de Fv monocatenario (scFv) se pueden unir de manera covalente un dominio variable de la cadena ligera y uno de la pesada mediante un conector peptídico flexible, de tal manera que las cadenas ligera y pesada se puedan asociar en una estructura "dimérica" análoga a la de una especie de Fv bicatenario. Es en esta configuración en la que las tres HVR de cada dominio variable interaccionan para definir un sitio de unión a antígeno en la superficie del dímero VH-VL. Colectivamente, las seis HVR confieren especificidad de unión a antígeno al anticuerpo. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprenda únicamente tres HVR específicas para un antígeno) tiene capacidad para reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad más baja que el sitio de unión completo.

Los fragmentos de anticuerpo "Fv monocatenario" o "scFv" comprenden los dominios VH y VL del anticuerpo, en los que estos dominios están presentes en una única cadena polipeptídica. En general, el polipéptido scFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL, que posibilita que el scFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para obtener una revisión de los scFv, véase, por ejemplo, Pluckthün, en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315, 1994.

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo con dos sitios de unión a antígeno, comprendiendo los fragmentos un dominio variable de la cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, se fuerza a que los dominios se apareen con los dominios complementarios de otra cadena y creen dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos pueden ser bivalentes o biespecíficos. Los diacuerpos se describen más completamente, por ejemplo, en los documentos EP 404.097; WO 1993/01161; Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); y Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90: 6444-6448 (1993). Los triacuerpos y tetracuerpos también se describen en Hudson *et al.*, *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, por ejemplo, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, salvo por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones naturales, que pueden estar presentes en cantidades sin importancia. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos aislados. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo

monoclonal incluye típicamente un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en el que la secuencia polipeptídica de unión a la diana se obtuvo mediante un procedimiento que incluye la selección de una única secuencia polipeptídica de unión a la diana de una pluralidad de secuencias polipeptídicas. Por ejemplo, el procedimiento de selección puede ser la selección de un clon único entre una pluralidad de clones, como un grupo de clones de hibridoma, clones de fago o clones de ADN recombinante. Se ha de entender que se puede alterar además una secuencia de unión a diana seleccionada, por ejemplo, para mejorar la afinidad por la diana, para humanizar la secuencia de unión a diana, para mejorar su producción en un cultivo celular, para reducir su inmunogenia *in vivo*, para crear un anticuerpo multiespecífico, etc., y que un anticuerpo que comprende la secuencia de unión a diana alterada también es un anticuerpo monoclonal de la presente invención. A diferencia de las preparaciones de anticuerpos policlonales, que típicamente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos frente a diferentes determinantes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal de una preparación de anticuerpos monoclonales se dirige contra un único determinante en un antígeno. Además de su especificidad, las preparaciones de anticuerpos monoclonales son ventajosas al no estar típicamente contaminadas por otras inmunoglobulinas.

El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene a partir de una población de anticuerpos sustancialmente homogénea y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la invención se pueden preparar mediante una variedad de técnicas, incluyendo, por ejemplo, el procedimiento de hibridoma (por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975); Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)), procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567), tecnologías de presentación en fagos (véase, por ejemplo, Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Sidhu *et al.*, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); y Lee *et al.*, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004), y tecnologías para producir anticuerpos humanos o similares a humanos en animales que tienen partes o todos los locus o genes de inmunoglobulina humana que codifican secuencias de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, los documentos WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature* 362: 255-258 (1993); Bruggemann *et al.*, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); las patentes de EE. UU. n.º 5.545.807; 5.545.806; 5.569.825; 5.625.126; 5.633.425; y 5.661.016; Marks *et al.*, *Bio/Technology* 10: 779-783 (1992); Lonberg *et al.*, *Nature* 368: 856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368: 812-813 (1994); Fishwild *et al.*, *Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996); y Lonberg y Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995).

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567; y Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos incluyen anticuerpos PRIMATTZED® en los que la región de unión a antígeno del anticuerpo se deriva de un anticuerpo producido, ejemplo, inmunizando macacos con el antígeno de interés.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En un modo de realización, un anticuerpo humanizado es una inmunoglobulina humana (anticuerpo receptor) en la que los residuos de una HVR del receptor se reemplazan por residuos de una HVR de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata, conejo o primate no humano, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, se reemplazan los residuos de FR de la inmunoglobulina humana por los residuos no humanos correspondientes. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se pueden preparar para refinar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y típicamente dos, dominios variables, en los que todos o sustancialmente todos los bucles hipervariables corresponden a los de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá opcionalmente al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para obtener más detalles, véanse, por ejemplo, Jones *et al.*, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.* 2:593-596 (1992). Véase también, por ejemplo, Vaswani y Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions* 23:1035-1038 (1995); Hurler y Gross, *Curr. Op. Biotech.* 5:428-433 (1994); y las patentes de EE. UU. n.º 6.982.321 y 7.087.409.

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que se corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se divulga en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye

específicamente un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo colecciones de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los procedimientos descritos en Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando el antígeno a un animal transgénico que se ha modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero cuyos locus endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 6.075.181 y 6.150.584 en relación con la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) en relación con los anticuerpos humanos generados por medio de una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

El término "región hipervariable", "HVR" o "HV" cuando se usa en el presente documento se refiere a las regiones de un dominio variable de anticuerpo que son de secuencia hipervariable y/o forman bucles definidos estructuralmente. En general, los anticuerpos comprenden seis HVR; tres en el VH (H1, H2, H3) y tres en el VL (L1, L2, L3). En anticuerpos naturales, H3 y L3 presentan la mayor diversidad de las seis HVR, y se cree que H3, en particular, desempeña un papel exclusivo al conferir una especificidad precisa a los anticuerpos. Véanse, por ejemplo, Xu *et al.*, *Immunity* 13:37-45 (2000); Johnson y Wu, en *Methods in Molecular Biology* 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003). De hecho, los anticuerpos de camélido naturales que solo consisten en una cadena pesada son funcionales y estables en ausencia de la cadena ligera. Véase, por ejemplo, Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993); Sheriff *et al.*, *Nature Struct. Biol.* 3:733-736 (1996).

Una serie de delineaciones de HVR están en uso y se engloban en el presente documento. Las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de Kabat se basan en la variabilidad de secuencia y son las usadas más comúnmente (Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). En cambio, Chothia se refiere a la localización de los bucles estructurales (Chothia y Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Las HVR de AbM representan un término medio entre las HVR de Kabat y los bucles estructurales de Chothia y se usan por el programa informático de modelado de anticuerpos AbM de Oxford Molecular. Las HVR de "contacto" se basan en un análisis de las estructuras cristalinas complejas disponibles. Los residuos de cada una de estas HVR se indican a continuación.

Bucle	Kabat	AbM	Chothia	Contacto
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (numeración de Kabat)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35B (Numeración de Chothia)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

Las HVR pueden comprender "HVR extendidas" como sigue: 24-36 o 24-34 (L1), 46-56 o 50-56 (L2) y 89-97 o 89-96 (L3) en el VL y 26-35 (H1), 50-65 o 49-65 (H2) y 93-102, 94-102 o 95-102 (H3) en el VH. Los residuos del dominio variable se numeran de acuerdo con Kabat *et al.*, *supra*, para cada una de estas definiciones.

Los residuos de "la región estructural" o "FR" son los residuos del dominio variable distintos de los residuos de la HVR como se define en el presente documento.

El término "numeración de residuos del dominio variable como en Kabat" o "numeración de la posición de aminoácido como en Kabat", y las variaciones del mismo, se refieren al sistema de numeración usado para los dominios variables de la cadena pesada o los dominios variables de la cadena ligera de la compilación de anticuerpos en Kabat *et al.*, *supra*. Usando este sistema de numeración, la secuencia de aminoácidos lineal real puede contener menos aminoácidos o aminoácidos adicionales correspondientes a un acortamiento de o inserción en una FR o HVR del dominio variable. Por ejemplo, un dominio variable de la cadena pesada puede incluir un único inserto de aminoácido (residuo 52a de acuerdo con Kabat) después del residuo 52 de H2 y residuos insertados (por ejemplo, residuos 82a, 82b y 82c, etc. de acuerdo con Kabat) después del residuo 82 de FR de la cadena pesada. La numeración de Kabat de los residuos se puede determinar para un anticuerpo dado mediante alineación en regiones de homología de la secuencia del anticuerpo con una secuencia numerada de Kabat "estándar".

El sistema de numeración de Kabat se usa, en general, cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*. 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of

Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa, en general, cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU del que se informa en Kabat *et al.*, *supra*). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo humano IgG1 EU.

La expresión "anticuerpos lineales" se refiere, en general, a los anticuerpos descritos en Zapata *et al.* (1995 *Protein Eng*, 8(10):1057-1062). En resumen, estos anticuerpos comprenden un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1) que, junto con los polipéptidos de la cadena ligera complementarios, forman un par de regiones de unión a antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento se refiere a un intervalo de error aceptable para el valor respectivo como determine un experto en la técnica, que dependerá, en parte, de cómo se mida o determine el valor, es decir, de las limitaciones del sistema de medición. Por ejemplo, "aproximadamente" puede significar en 1 o más de 1 desviaciones estándar, según la práctica en la técnica. Una referencia a "aproximadamente" un valor o parámetro en el presente documento incluye y describe modos de realización que se dirigen a ese valor o parámetro *per se*. Por ejemplo, una descripción que se refiera a "aproximadamente X" incluye la descripción de "X".

Como se usa en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas del singular "un", "una" y "el/la" incluyen referentes al plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por tanto, por ejemplo, la referencia a "un compuesto" incluye opcionalmente una combinación de dos o más de dichos compuestos, y similares.

Se entiende que los aspectos y modos de realización de la invención descrita en el presente documento incluyen "que comprende", "que consiste en" y "que consiste esencialmente en" aspectos y modos de realización.

II. Formulaciones de proteínas y preparación

En el presente documento la invención se refiere a formulaciones líquidas que comprenden una proteína y un compuesto que previene la oxidación de la proteína en la formulación líquida, en las que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 5-hidroxitriptófano, 5-hidroxiindol, 7-hidroxiindol, y serotonina, y en las que la proteína es un anticuerpo. En algunos modos de realización, el compuesto en la formulación es desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 10 mM, o hasta la concentración más alta a la que el compuesto es soluble en la formulación. En algunos modos de realización, el compuesto en la formulación es aproximadamente 1 mM. En algunos modos de realización, el compuesto previene la oxidación de uno o más aminoácidos en la proteína seleccionados del grupo que consiste en triptófano y metionina. En algunos modos de realización, el compuesto previene la oxidación de la proteína mediante una especie reactiva del oxígeno (ERO). En otro modo de realización, la especie reactiva del oxígeno se selecciona del grupo que consiste en un oxígeno singlete, un superóxido (O₂-), un radical alcóxido, un radical peróxido, un peróxido de hidrógeno (H₂O₂), un trióxido de dihidrógeno (H₂O₃), un radical hidrotroxilo (HO₃*), ozono (O₃), un radical hidroxilo y un peróxido de alquilo. En algunos modos de realización, una proteína descrita en el presente documento es sensible a la oxidación. En algunos modos de realización, la metionina, cisteína, histidina, triptófano y/o tirosina en la proteína son sensibles a la oxidación. En algunos modos de realización, el triptófano y/o la metionina en la proteína son sensibles a la oxidación. Por ejemplo, un aminoácido triptófano en la porción Fab de un anticuerpo monoclonal y/o un aminoácido metionina en la porción Fc de un anticuerpo monoclonal puede ser sensible a la oxidación. En algunos modos de realización, la proteína es una proteína terapéutica. En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un fragmento de anticuerpo. En otro modo de realización, el compuesto previene la oxidación de uno o más aminoácidos en la porción Fab de un anticuerpo. En otro modo de realización adicional, el compuesto previene la oxidación de uno o más aminoácidos en la porción Fc de un anticuerpo. En algunos modos de realización, la formulación proporcionada en el presente documento es una formulación farmacéutica adecuada para su administración a un sujeto. Como se usa en el presente documento, un "sujeto" o un "individuo" para fines de tratamiento o administración se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferentemente, el mamífero es humano. En algunos modos de realización, la formulación es acuosa. En algunos modos de realización, la concentración de proteínas (por ejemplo, el anticuerpo) en la formulación es de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en un estabilizante, un tampón, un tensoactivo y un agente de tonicidad. Por ejemplo, una formulación de la invención puede comprender un anticuerpo monoclonal, un compuesto como se proporciona en el presente documento que previene la oxidación de la proteína (por ejemplo, 5-hidroxiindol) y un tampón que mantiene el pH de la formulación a un nivel deseable. En algunos modos de realización, una formulación proporcionada en el presente documento tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0.

Los anticuerpos en la formulación se pueden preparar usando procedimientos conocidos en la técnica. El anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos de longitud completa, fragmentos de anticuerpo y anticuerpos multiespecíficos) en la

formulación líquida se prepara usando técnicas disponibles en la técnica, cuyos procedimientos ejemplares no limitantes se describen con más detalle en las siguientes secciones. Los procedimientos en el presente documento se pueden adaptar por un experto en la técnica para la preparación de formulaciones que comprendan otras proteínas, tales como inhibidores basados en péptidos. Véase *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook *et al.*, 4.^a ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2012); *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel, *et al.* eds., 2003); *Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel *et al.*, eds., J. Wiley y Sons, 2002); *Current Protocols in Protein Science*, (Horswill *et al.*, 2006); *Antibodies, A Laboratory Manual* (Harlow y Lane, eds., 1988); *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I. Freshney, 6.^a ed., J. Wiley y Sons, 2010) para técnicas y procedimientos, en general, bien entendidos y empleados comúnmente para la producción de proteínas terapéuticas, incorporándose todos en el presente documento por referencia en su totalidad.

A. Preparación de anticuerpos

El anticuerpo en las formulaciones líquidas proporcionado en el presente documento se dirige contra un antígeno de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido importante biológicamente y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece un trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos no polipeptídicos.

Si el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembranaria, (por ejemplo, un receptor) o un ligando, tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen moléculas tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); CD20; ox-LDL; ox-ApoB100; renina; una hormona del crecimiento, incluyendo la hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; hormona liberadora de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como factor VIIIc, factor IX, tromboplastina tisular y factor de Von Willebrand; factores de anticoagulación, tales como proteína C; péptido natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa u orina humana, o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; un receptor del factor de necrosis tumoral, tal como el receptor de muerte 5 y CD120; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalina; RANTES (regulada por activación, expresada y secretada normalmente por linfocitos T); proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1-alfa) humana; una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; hormona antimülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropinas de ratón; una proteína microbiana, tal como betalactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; receptores de hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico, tal como factor neurotrófico derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF- β ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4 o TGF- β 5; factor de crecimiento insulinoide I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento insulinoide; proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor acelerador de la degradación; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del virus del sida; proteínas de transporte; receptores de migración dirigida; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

(i) Preparación de antígenos

Se pueden usar antígenos o fragmentos de los mismos solubles, conjugados opcionalmente con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembranarias, tales como receptores, se pueden usar fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. De forma alternativa, se pueden usar células que expresan la molécula transmembranaria como inmunógeno. Dichas células se pueden derivar de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado mediante técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranaria. Otros antígenos y formas de los mismos útiles para preparar anticuerpos serán evidentes para los expertos en la técnica.

(ii) Determinados procedimientos basados en anticuerpos

Los anticuerpos policlonales se crean preferentemente en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente con una proteína que sea inmunogénica en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de la soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzilsuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), *N*-

hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, en la que R y R^1 son grupos alquilo diferentes.

Los animales se inmunizan frente al antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados combinando, por ejemplo, 100 μg o 5 μg de la proteína o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund e inyectando la solución por vía intradérmica en múltiples sitios. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a 14 días más tarde, se extrae sangre de los animales y el suero se somete a ensayo para obtener el título de anticuerpos. Los animales se refuerzan hasta la estabilización del título. Preferentemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado con una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. También se pueden preparar conjugados en cultivo de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, se usan adecuadamente agentes de agregación tales como alumbre para potenciar la respuesta inmunitaria.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales de interés usando el procedimiento de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256:495 (1975), y descrito además, por ejemplo, en Hongo *et al.*, *Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow *et al.*, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.^a ed. 1988); Hammerling *et al.*, en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) y Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268 (2006) en relación con los hibridomas humano-humano. Los procedimientos adicionales incluyen los descritos, por ejemplo, en las patentes de EE. UU. n.º 7.189.826 en relación con la producción de anticuerpos IgM naturales, humanos y monoclonales a partir de líneas de células de hibridoma. La tecnología de hibridomas humanos (tecnología de Trioma) se describe en Vollmers y Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) y Vollmers y Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3): 185-91 (2005).

Para otras técnicas diversas de hibridoma, véanse, por ejemplo, los documentos US 2006/258841; US 2006/183887 (anticuerpos completamente humanos), US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 2005/026229; y las patentes de EE. UU. n.º 7.078.492 y 7.153.507. Un protocolo ejemplar para producir anticuerpos monoclonales usando el procedimiento de hibridoma se describe como sigue. En el procedimiento de hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza para producir linfocitos que producen o pueden producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína usada para la inmunización. Se crean anticuerpos en animales mediante múltiples inyecciones subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) de un polipéptido de interés o un fragmento del mismo, y un adyuvante, tal como monofosforil lípido A (MPL)/dicrinomicolato de trehalosa (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, Mont.). Se puede preparar un polipéptido de interés (por ejemplo, antígeno) o un fragmento del mismo usando procedimientos bien conocidos en la técnica, tales como procedimientos recombinantes, algunos de los cuales se describen además en el presente documento. El suero de animales inmunizados se somete a ensayo para determinar anticuerpos antiantígeno y se administran opcionalmente inmunizaciones de refuerzo. Se aíslan los linfocitos de animales que producen anticuerpos antiantígeno. De forma alternativa, se pueden inmunizar *in vitro* los linfocitos.

Entonces, se fusionan los linfocitos con células de mieloma usando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma. Véase, por ejemplo, Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp. 59-103 (Academic Press, 1986). Se pueden usar células de mieloma que se fusionen eficazmente, soporten una producción estable de alto nivel de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas y sean sensibles a un medio tal como medio HAT. Las células de mieloma ejemplares incluyen, pero no se limitan a, líneas de mieloma murino, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles del Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California EE. UU., y células SP-2 o X63-Ag8-653 disponibles del American Type Culture Collection, Rockville, Md. EE. UU. También se han descrito líneas de células de heteromioma ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

Las células de hibridoma así preparadas se siembran y cultivan en un medio de cultivo adecuado, por ejemplo, que contenga una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma originales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma originales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirá típicamente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), previniendo dichas sustancias el crecimiento de células con deficiencia de HGPRT. Preferentemente, se usan procedimientos de cultivo de células de hibridoma libres de suero para reducir el uso de suero derivado de animal, tal como suero bovino fetal, como se describe, por ejemplo, en Even *et al.*, *Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108 (2006).

Los oligopéptidos como herramientas para mejorar la productividad de los cultivos de células de hibridoma se describen en Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005). Específicamente, los medios de cultivo estándar se enriquecen con determinados aminoácidos (alanina, serina, asparagina, prolina) o con fracciones de hidrolizados de proteínas, y la apoptosis se puede inhibir significativamente mediante oligopéptidos sintéticos constituidos por de tres a seis residuos de aminoácido. Los péptidos están presentes a concentraciones milimolares

o más altas.

El medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se puede someter a ensayo para determinar la producción de anticuerpos monoclonales que se unen a un anticuerpo descrito en el presente documento. Se puede determinar la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o enzimoimmunoanálisis de adsorción (ELISA). Se puede determinar la afinidad de unión del anticuerpo, por ejemplo, mediante análisis de Scatchard. Véase, por ejemplo, Munson *et al.*, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

Después de que se identifiquen las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante procedimientos estándar. Véase, por ejemplo, Goding, *supra*. Los medios de cultivo adecuados para este fin incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o RPMI-1640. Además, las células de hibridoma se pueden cultivar *in vivo* como tumores ascíticos en un animal. Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan adecuadamente del medio de cultivo, líquido ascítico o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-sefarosa, cromatografía con hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad. Se describe un procedimiento para el aislamiento de proteínas a partir de células de hibridoma en el documento US 2005/176122 y la patente de EE. UU. n.º 6.919.436. El procedimiento incluye el uso de sales mínimas, tales como sales liotrópicas, en el procedimiento de unión y preferentemente también usar pequeñas cantidades de disolventes orgánicos en el procedimiento de elución.

(iii) Determinados procedimientos de cribado de colecciones

Los anticuerpos en las formulaciones y composiciones descritas en el presente documento se pueden preparar usando colecciones combinatorias para cribar anticuerpos con la actividad o actividades deseada(s). Por ejemplo, en la técnica se conoce una variedad de procedimientos para generar colecciones de presentación en fagos y cribar dichas colecciones para determinar los anticuerpos que posean las características de unión deseadas. Dichos procedimientos se describen, en general, en Hoogenboom *et al.* en *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien *et al.*, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2001). Por ejemplo, un procedimiento de generación de anticuerpos de interés es a través del uso de una colección de anticuerpos en fagos como se describe en Lee *et al.*, *J. Mol. Biol.* (2004), 340(5):1073-93.

En principio, se seleccionan clones de anticuerpos sintéticos cribando colecciones de fagos que contienen fagos que presentan diversos fragmentos de la región variable (Fv) del anticuerpo fusionados a la proteína de la cápside del fago. Dichas colecciones de fagos se seleccionan mediante cromatografía de afinidad frente al antígeno deseado. Los clones que expresan los fragmentos Fv que se pueden unir al antígeno deseado se adsorben en el antígeno y, por tanto, se separan de los clones de no unión en la colección. A continuación, los clones de unión se eluyen del antígeno, y se pueden enriquecer además mediante ciclos adicionales de adsorción/elución de antígeno. Cualquiera de los anticuerpos se puede obtener diseñando un procedimiento de cribado de antígenos adecuado para seleccionar el clon del fago de interés seguido de la construcción de un clon de anticuerpo de longitud completa usando las secuencias de Fv del clon del fago de interés y secuencias de la región constante (Fc) adecuadas descritas en Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, publicación del NIH 91-3242, Bethesda Md. (1991), vols. 1-3.

En determinados modos de realización, el dominio de unión a antígeno de un anticuerpo se forma a partir de dos regiones variables (V) de aproximadamente 110 aminoácidos, cada una de las cadenas ligera (VL) y pesada (VH), presentando ambas tres bucles hipervariables (HVR) o regiones determinantes de la complementariedad (CDR). Los dominios variables se pueden presentar funcionalmente en fago, como fragmentos Fv monocatenarios (scFv), en los que VH y VL se unen covalentemente a través de un péptido corto y flexible, o bien como fragmentos Fab, en los que se fusionan cada uno con un dominio constante e interaccionan de manera no covalente, como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Como se usa en el presente documento, los clones de fago que codifican scFv y los clones de fago que codifican Fab se denominan colectivamente "clones de fago Fv" o "clones Fv".

Los repertorios de genes de VH y VL se clonan por separado mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y se recombinan aleatoriamente en colecciones de fagos, que, entonces, se pueden cribar para determinar los clones de unión a antígeno como se describe en Winter *et al.*, *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455 (1994). Las colecciones de fuentes inmunizadas proporcionan anticuerpos de afinidad alta con respecto al inmunógeno sin el requisito de construcción de hibridomas. De forma alternativa, se puede clonar el repertorio sin exposición previa para proporcionar una única fuente de anticuerpos humanos frente a una amplia gama de antígenos no propios y también propios sin ninguna inmunización como describen Griffiths *et al.*, *EMBO J.*, 12: 725-734 (1993). Finalmente, también se pueden preparar de manera sintética colecciones sin exposición previa clonando segmentos de genes V no reordenados a partir de células madre y usando cebadores de PCR que contienen secuencias aleatorias para codificar las regiones CDR3 altamente variables y conseguir el reordenamiento *in vitro*, como describen Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

En determinados modos de realización, se usa un fago filamentosos para presentar fragmentos de anticuerpo por fusión con la proteína de la cápside menor pIII. Los fragmentos de anticuerpo se pueden presentar como fragmentos Fv monocatenarios, en los que los dominios VH y VL se conectan en la misma cadena polipeptídica mediante un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, como describen Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona con pIII y la otra se secreta en el periplasma de células huésped bacterianas en el que se produce el ensamblaje de una estructura de Fab-proteína de la cápside que se presenta en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de la cápside naturales, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

En general, los ácidos nucleicos que codifican fragmentos de genes de anticuerpos se obtienen a partir de células inmunitarias obtenidas de seres humanos o animales. Si se desea una colección sesgada en favor de clones antiantígeno, se inmuniza al sujeto con antígeno para generar una respuesta de anticuerpos, y se recuperan células de bazo y/o linfocitos B en circulación, otros linfocitos de sangre periférica (LSP) para la construcción de la colección. En un modo de realización, se obtiene una colección de fragmentos de genes de anticuerpos humanos sesgada en favor de los clones antiantígeno generando una respuesta de anticuerpos antiantígeno en ratones transgénicos que portan una micromatriz genética de inmunoglobulina humana funcional (y que carecen de un sistema de producción de anticuerpos endógenos funcionales), de tal manera que la inmunización con antígeno dé lugar a linfocitos B que produzcan anticuerpos humanos frente al antígeno. La generación de ratones transgénicos que producen anticuerpos humanos se describe a continuación.

Se puede obtener un enriquecimiento adicional de las poblaciones de células reactivas con antiantígeno usando un procedimiento de cribado adecuado para aislar linfocitos B que expresan un anticuerpo unido a membrana específico de antígeno, por ejemplo, mediante separación celular usando cromatografía de afinidad por antígeno o adsorción de células sobre antígeno marcado con fluorocromo seguido de clasificación de células activadas por flujo (FACS).

De forma alternativa, el uso de células de bazo y/o linfocitos B u otros LSP de un donante no inmunizado proporciona una mejor representación del posible repertorio de anticuerpos, y también permite la construcción de una colección de anticuerpos usando cualquier especie animal (humana o no humana) en la que el antígeno no sea antigénico. Para colecciones que incorporan una construcción de genes de anticuerpos *in vitro*, se obtienen células madre del sujeto para proporcionar ácidos nucleicos que codifiquen segmentos de genes de anticuerpos no reordenados. Las células inmunitarias de interés se pueden obtener a partir de una variedad de especies animales, tales como las especies humana, ratón, rata, lagomorfa, luprina, canina, felina, porcina, bovina, equina y aviar, etc.

Los ácidos nucleicos que codifican segmentos de genes variables de anticuerpos (incluyendo los segmentos de VH y VL) se recuperan de las células de interés y se amplifican. En el caso de las colecciones de genes de VH y VL reordenados, se puede obtener el ADN deseado aislando ADN genómico o ARNm de linfocitos seguido de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores que coincidan con los extremos 5' y 3' de genes de VH y VL reordenados como se describe en Orlandi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)*, 86: 3833-3837 (1989), preparando de este modo repertorios de genes V para su expresión. Los genes de V se pueden amplificar a partir de ADNc y ADN genómico, con los cebadores inversos en el extremo 5' del exón que codifica el dominio V maduro y los cebadores directos basados en el segmento J como se describe en Orlandi *et al.* (1989) y en Ward *et al.*, *Nature*, 341: 544-546 (1989). Sin embargo, para la amplificación a partir de ADNc, los cebadores inversos también se pueden basar en el exón líder como se describe en Jones *et al.*, *Biotechnol.*, 9: 88-89 (1991), y cebadores directos en la región constante como se describe en Sastry *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (EE. UU.)*, 86: 5728-5732 (1989). Para maximizar la complementariedad, se puede incorporar redundancia en los cebadores como se describe en Orlandi *et al.* (1989) o Sastry *et al.* (1989). En determinados modos de realización, la diversidad de la colección se maximiza usando cebadores de PCR dirigidos a cada familia de genes de V a fin de amplificar todas las disposiciones de VH y VL disponibles presentes en la muestra de ácido nucleico de la célula inmunitaria, por ejemplo, como se describe en el procedimiento de Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) o como se describe en el procedimiento de Orum *et al.*, *Nucleic Acids Res.*, 21: 4491-4498 (1993). Para la clonación del ADN amplificado en vectores de expresión, se pueden introducir sitios de restricción infrecuentes en el cebador de PCR como una etiqueta en un extremo como se describe en Orlandi *et al.* (1989), o mediante amplificación por PCR adicional con un cebador con etiqueta como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991).

Los repertorios de genes V reordenados sintéticamente se pueden derivar *in vitro* a partir de segmentos de genes de V. La mayoría de los segmentos de genes de VH humanos se han clonado y secuenciado (de lo que se informa en Tomlinson *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 227: 776-798 (1992)), y cartografiado (de lo que se informa en Matsuda *et al.*, *Nature Genet.*, 3: 88-94 (1993)); estos segmentos clonados (incluyendo todas las conformaciones principales del bucle de H1 y H2) se pueden usar para generar diversos repertorios de genes de VH con cebadores de PCR que codifican los bucles de H3 de diversa secuencia y longitud como se describe en Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992). También se pueden preparar repertorios de VH con toda la diversidad de secuencia centrada en un bucle de H3 largo de una longitud única como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4457-4461 (1992). Se han clonado y secuenciado los segmentos Yk y Vl humanos (de lo que se informa en Williams y Winter, *Eur. J. Immunol.*, 23: 1456-1461 (1993)) y se pueden usar para preparar repertorios sintéticos de la cadena ligera. Los repertorios de genes de V sintéticos, basados en una gama de pliegues de VH y VL, y longitudes de L3 y

H3, codificarán anticuerpos de considerable diversidad estructural. Tras la amplificación de los ADN que codifican genes de V, se pueden reordenar *in vitro* segmentos de genes de V de la estirpe germinal de acuerdo con los procedimientos de Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992).

5 Se pueden construir repertorios de fragmentos de anticuerpo combinando repertorios de genes de VH y VL entre sí de varias formas. Se puede crear cada repertorio en vectores diferentes y recombinar los vectores *in vitro*, por ejemplo, como se describe en Hogrefe *et al.*, *Gene*, 128: 119-126 (1993) o *in vivo* mediante infección combinatoria, por ejemplo, el sistema loxP descrito en Waterhouse *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 21: 2265-2266 (1993). El enfoque de recombinación *in vivo* aprovecha la naturaleza bicatenaria de fragmentos Fab para superar el límite del tamaño de la colección impuesto por la eficacia de transformación de *E. coli*. Los repertorios de VH y VL sin exposición previa se clonan por separado, uno en un fagémido y el otro en un vector de fago. A continuación, se combinan las dos colecciones mediante infección por fagos de bacterias que contengan fagémidos, de modo que cada célula contenga una combinación diferente y el tamaño de la colección se limite solamente por el número de células presentes (aproximadamente 10^{12} clones). Ambos vectores contienen señales de recombinación *in vivo* de modo que los genes de VH y VL se recombinen en un único replicón y se coempaqueten en viriones de fago. Estas inmensas colecciones proporcionan grandes números de diversos anticuerpos de buena afinidad (K_d^{-1} de aproximadamente 10^8 M).

20 De forma alternativa, los repertorios se pueden clonar secuencialmente en el mismo vector, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), o ensamblarse conjuntamente mediante PCR y, luego, clonarse, por ejemplo, como se describe en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). También se puede usar ensamblaje por PCR para unir los ADN de VH y VL con ADN que codifica un espaciador peptídico flexible para formar repertorios de Fv monocatenarios (scFv). En aún otra técnica, se usa "ensamblaje por PCR en células" para combinar genes de VH y VL en linfocitos mediante PCR y, a continuación, repertorios de clones de genes unidos, como se describe en Embleton *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 20: 3831-3837 (1992).

30 Los anticuerpos producidos por las colecciones sin exposición previa (naturales o bien sintéticas) pueden ser de afinidad moderada (K_d^{-1} de aproximadamente 10^6 a 10^7 M⁻¹), pero la maduración de la afinidad también se puede imitar *in vitro* construyendo y reseleccionando a partir de colecciones secundarias como se describe en Winter *et al.* (1994), *supra*. Por ejemplo, la mutación se puede introducir al azar *in vitro* usando polimerasa propensa a error (de lo que se informa en Leung *et al.*, *Technique 1*: 11-15 (1989)) en el procedimiento de Hawkins *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 226: 889-896 (1992) o en el procedimiento de Gram *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 89: 3576-3580 (1992). Adicionalmente, se puede realizar la maduración de la afinidad mutando aleatoriamente una o más CDR, por ejemplo, usando PCR con cebadores que portan secuencias aleatorias que se extienden a lo largo de la CDR de interés, en clones Fv individuales seleccionados y cribando para determinar clones de afinidad más alta. El documento WO 9607754 (publicado el 14 de marzo de 1996) describió un procedimiento para inducir mutagénesis en una región determinante de la complementariedad de una cadena ligera de inmunoglobulina para crear una colección de genes de cadena ligera. Otro enfoque eficaz es recombinar los dominios VH o VL seleccionados mediante presentación en fagos con repertorios de variantes de dominios V naturales obtenidas a partir de donantes no inmunizados y cribar para determinar la afinidad más alta en varias tandas de reorganización de cadenas como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992). Esta técnica permite la producción de anticuerpos y fragmentos de anticuerpo con afinidades de aproximadamente 10^9 M o menos.

45 El cribado de las colecciones se puede conseguir mediante diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el antígeno para recubrir los pocillos de las placas de adsorción, expresar en células huésped fijadas a placas de adsorción o usar en la clasificación de células, o conjugar con biotina para la captura con microesferas recubiertas con estreptavidina o usar en cualquier otro procedimiento para seleccionar colecciones de presentación en fago.

50 Las muestras de las colecciones de fagos se ponen en contacto con el antígeno inmovilizado en condiciones adecuadas para la unión de al menos una porción de las partículas de fago con el adsorbente. Normalmente, se seleccionan las condiciones, incluyendo pH, fuerza iónica, temperatura y similares, para imitar a las condiciones fisiológicas. Los fagos unidos a la fase sólida se lavan y, después, se eluyen mediante ácido, por ejemplo, como se describe en Barbas *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88: 7978-7982 (1991), o mediante álcali, por ejemplo, como se describe en Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o mediante competición con antígeno, por ejemplo, en un procedimiento similar al procedimiento de competición con antígeno de Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991). Los fagos se pueden enriquecer 20-1000 veces en una única tanda de selección. Además, se pueden cultivar los fagos enriquecidos en cultivos bacterianos y someterse a nuevas tandas de selección.

60 La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado y de si los múltiples fragmentos de anticuerpo en un único fago se pueden acoplar simultáneamente con el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) se pueden retener mediante el uso de lavados cortos, presentación en fago multivalente y alta densidad de recubrimiento del antígeno en fase sólida. La alta densidad no solo estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece la reunión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y buenas afinidades de unión) se puede promover mediante el uso de lavados largos y presentación en fago monovalente como se describe en Bass

et al., *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento del antígeno como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos de fago de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieran ligeramente, por el antígeno. Sin embargo, es probable que la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como se realiza en algunas de las técnicas de maduración de la afinidad) dé lugar a muchos mutantes, uniéndose la mayoría al antígeno, y unos pocos con afinidad más alta. Con antígeno limitante, el fago de alta afinidad infrecuente podría quedar fuera. Para retener todos los mutantes de afinidad más alta, los fagos se pueden incubar con exceso de antígeno biotinilado, pero con el antígeno biotinilado a una concentración de molaridad más baja que la constante de afinidad molar diana para el antígeno. A continuación, los fagos de unión de alta afinidad se pueden capturar mediante microesferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite que se seleccionen los anticuerpos de acuerdo con sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permita el aislamiento de clones mutantes con una afinidad tan solo dos veces más alta a partir de un gran exceso de fagos con afinidad más baja. También se pueden manipular las condiciones usadas en el lavado de los fagos unidos a una fase sólida para discriminar basándose en su cinética de disociación.

Se pueden seleccionar clones antiantígeno basándose en la actividad. En determinados modos de realización, la invención proporciona anticuerpos antiantígeno que se unen a células vivas que, de manera natural, expresan un antígeno o se unen a un antígeno libre o a un antígeno enlazado a otras estructuras celulares. Los clones Fv correspondientes a dichos anticuerpos antiantígeno se pueden seleccionar (1) aislando clones de antiantígeno a partir de una colección de fagos como se describe anteriormente, y opcionalmente, amplificando la población aislada de clones de fago cultivando la población en un huésped bacteriano adecuado; (2) seleccionando el antígeno y una segunda proteína frente a la que se desea actividad de bloqueo y de no bloqueo, respectivamente; (3) adsorbiendo los clones de fago antiantígeno en el antígeno inmovilizado; (4) usando un exceso de la segunda proteína para eluir cualquier clon no deseado que reconozca determinantes de unión a antígeno que se solapan o se comparten con los determinantes de unión de la segunda proteína; y (5) eluyendo los clones que permanecen adsorbidos tras la etapa (4). Opcionalmente, los clones con las propiedades de bloqueo/no bloqueo deseadas se pueden enriquecer además repitiendo una o más veces los procedimientos de selección descritos en el presente documento.

El ADN que codifica anticuerpos monoclonales derivados de hibridoma o clones Fv de presentación en fago se aísla y secuencia fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando cebadores de oligonucleótidos diseñados para amplificar específicamente las regiones codificantes de la cadena pesada y ligera de interés a partir de un molde de ADN de fago o hibridoma). Una vez aislado, el ADN se puede disponer en vectores de expresión, que, a continuación, se transfectan en células huésped, tales como células de *E. coli*, células COS de simio, células de ovario de hámster chino (CHO) o células de mieloma, que de otro modo no producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de los anticuerpos monoclonales deseados en las células huésped recombinantes. Los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifica anticuerpos incluyen Skerra *et al.*, *Curr. Opin. in Immunol.*, 5: 256 (1993) y Pluckthun, *Immunol. Revs.*, 130: 151 (1992).

El ADN que codifica los clones Fv se puede combinar con secuencias de ADN conocidas que codifican regiones constantes de la cadena pesada y/o de la cadena ligera (por ejemplo, las secuencias de ADN apropiadas se pueden obtener de Kabat *et al.*, *supra*) para formar clones que codifican las cadenas pesada y/o ligera de longitud completa o parcial. Se apreciará que se pueden usar regiones constantes de cualquier isotipo para este fin, incluyendo las regiones constantes de IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, y que dichas regiones constantes se pueden obtener a partir de cualquier especie humana o animal. Un clon Fv derivado del ADN del dominio variable de una especie animal (tal como humana) y, a continuación, fusionado a ADN de la región constante de otra especie animal para formar secuencia(s) codificante(s) de la cadena pesada y/o cadena ligera de longitud completa "híbrida" se incluye en la definición de anticuerpo "quimérico" e "híbrido" como se usa en el presente documento. En determinados modos de realización, un clon Fv derivado de ADN variable humano se fusiona con ADN humano de la región constante para formar secuencia(s) codificante(s) de las cadenas pesada y/o ligera humanas de longitud parcial o completa.

El ADN que codifica el anticuerpo antiantígeno derivado de un hibridoma también se puede modificar, por ejemplo, sustituyendo la secuencia codificante de los dominios constantes de cadena pesada y ligera humanos en lugar de secuencias murinas homólogas derivadas del clon de hibridoma (por ejemplo, como en el procedimiento de Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)). Se puede modificar además ADN que codifica un anticuerpo o fragmento derivado de hibridomas o de clones Fv uniendo de manera covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina toda o parte de la secuencia codificante de un polipéptido distinto de inmunoglobulina. De esta manera, se preparan anticuerpos "quiméricos" o "híbridos" que tienen la especificidad de unión de los anticuerpos derivados de clones de hibridomas o de clones Fv.

(iv) Anticuerpos humanizados y humanos

En la técnica se conocen diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácido no humanos se denominan a menudo residuos de "importación", que se toman típicamente de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente

- siguiendo el procedimiento de Winter y colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR o secuencias de CDR de roedor por las correspondientes secuencias de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (patente de EE. UU. n.º 4.816.567), en los que se ha sustituido sustancialmente menos de un dominio variable humano inalterado por la correspondiente secuencia de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son típicamente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.
- La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a la colección completa de secuencias de dominio variable humanas conocidas. La secuencia humana que es la más próxima a la del roedor se acepta entonces como la región estructural (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de las cadenas ligera o pesada. Se puede usar la misma región estructural para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).
- Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este propósito, de acuerdo con un modo de realización del procedimiento, se preparan anticuerpos humanizados mediante un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos de inmunoglobulina tridimensionales están disponibles comúnmente y son conocidos para los expertos en la técnica. Están disponibles programas de ordenador que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta forma, se pueden seleccionar y combinar residuos de FR a partir de las secuencias de receptor y de importación, de modo que se logre la característica del anticuerpo deseada, tal como una afinidad incrementada por el/los antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están implicados directamente y lo más sustancialmente en influir en la unión a antígeno.
- Se pueden construir anticuerpos humanos en las formulaciones y composiciones descritas en el presente documento combinando secuencia(s) del dominio variable de clones Fv seleccionadas de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos con secuencia(s) del dominio constante humana(s) conocida(s) como se describe anteriormente. De forma alternativa, se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos mediante el procedimiento de hibridoma. Las líneas de células de heteromioma ratón-humano y mieloma humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos se han descrito, por ejemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).
- Es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras su inmunización, pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión a la cadena pesada (J_H) de anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de la estirpe germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la matriz génica de inmunoglobulina de estirpe germinal humana a dichos ratones mutantes de estirpe germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Véase, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y Duchosal *et al.* *Nature* 355:258 (1992).
- También se puede usar el barajado de genes para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, en el que el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano de partida. De acuerdo con este procedimiento, que también se llama "sellado de epítomos", la región variable de la cadena pesada o bien ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido mediante técnicas de presentación en fagos como se describe en el presente documento se reemplaza por un repertorio de genes de dominio V humanos, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena humana/cadena no humana, en el que la cadena humana restablece el sitio de unión a antígeno destruido tras la eliminación de la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fagos primario, es decir, el epítopo regula (sella) la elección del ligando de cadena humana. Cuando se repite el procedimiento para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos mediante injerto de CDR, esta técnica

proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen ningún residuo de FR o CDR de origen no humano.

(v) Fragmentos de anticuerpo

Se pueden generar fragmentos de anticuerpo mediante medios tradicionales, tales como digestión enzimática o mediante técnicas recombinantes. En determinadas circunstancias, existen ventajas de usar fragmentos de anticuerpo, en lugar de anticuerpos completos. El tamaño más pequeño de los fragmentos permite un aclaramiento rápido y puede dar lugar a un acceso mejorado a tumores sólidos. Para obtener una revisión de determinados fragmentos de anticuerpo, véase Hudson *et al.* (2003) *Nat. Med.* 9:129-134.

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de digestión proteolítica de anticuerpos inalterados (véase, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992); y Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente mediante células huésped recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y ScFv se pueden expresar en y secretar de *E. coli*, permitiendo, por tanto, una fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Los fragmentos de anticuerpo se pueden aislar a partir de las colecciones de fagos de anticuerpos analizadas anteriormente. De forma alternativa, pueden recuperarse directamente los fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplarse químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar directamente fragmentos F(ab')₂ del cultivo de células huésped recombinantes. Se describen los fragmentos Fab y F(ab')₂ con semivida *in vivo* incrementada que comprenden residuos de epítipo de unión al receptor de rescate en la patente de EE. UU. n.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el experto. En determinados modos de realización, el anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véase el documento WO 93/16185; las patentes de EE. UU. n.º 5.571.894; y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación inalterados que carecen de regiones constantes; de este modo, son adecuados para la unión inespecífica reducida durante el uso *in vivo*. Las proteínas de fusión de scFv se pueden construir para producir la fusión de una proteína efectora en el extremo aminico o bien carboxílico de un scFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, *supra*. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la patente de EE. UU. n.º 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) Anticuerpos multiespecíficos

Los anticuerpos multiespecíficos tienen especificidades de unión por al menos dos epítopos diferentes, en los que los epítopos son normalmente de antígenos diferentes. Mientras que dichas moléculas solo se unirán normalmente a dos epítopos diferentes (es decir, anticuerpos biespecíficos, BsAb), los anticuerpos con especificidades adicionales, tales como los anticuerpos triespecíficos, se engloban por esta expresión cuando se usa en el presente documento. Se pueden preparar anticuerpos biespecíficos como anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos F(ab')₂).

En la técnica se conocen procedimientos para preparar anticuerpos biespecíficos. La producción tradicional de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, en la que las dos cadenas tienen especificidades diferentes (Millstein *et al.*, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la combinación aleatoria de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpo diferentes, de las cuales solo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza normalmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante engorrosa y los rendimientos del producto son bajos. Se divulgan procedimientos similares en el documento WO 93/08829 y en Traunecker *et al.*, *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991).

De acuerdo con un enfoque diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan con secuencias de dominio constante de inmunoglobulina. La fusión es preferentemente con un dominio constante de la cadena pesada de inmunoglobulina, que comprende al menos parte de las regiones bisagra CH2 y CH3. Es típico que la primera región constante de la cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión a la cadena ligera, presente en al menos una de las fusiones. Los ADN que codifican las fusiones con la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad al ajustar las proporciones mutuas de los tres fragmentos polipeptídicos en modos de realización cuando las proporciones desiguales de las tres cadenas polipeptídicas usadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas polipeptídicas en un vector de expresión cuando la expresión de al menos dos cadenas polipeptídicas en proporciones iguales da como resultado altos rendimientos o cuando las proporciones no son de particular importancia.

En un modo de realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par híbrido de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones indeseadas de cadenas de inmunoglobulina, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una forma de separación fácil. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para obtener más detalles de la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, se puede genomanipular la interfaz entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. La interfase preferente comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfaz de la primera molécula de anticuerpo se reemplazan por cadenas laterales mayores (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfaz de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácido grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales indeseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células indeseadas (patente de EE. UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por el VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados se conocen bien en la técnica y se divulgan en la patente de EE. UU. n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

También se han descrito en la bibliografía técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando enlaces químicos. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos inalterados para generar fragmentos F(ab')₂. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente que forma complejos con ditiol arsenito de sodio para estabilizar los ditioles vecinos y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten, a continuación, en derivados de tionitrobenzoato (TNB). Uno de los derivados Fab'-TNB se reconvierte entonces en Fab'-tiol mediante reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab'-TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Se pueden usar los anticuerpos biespecíficos producidos como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab'-SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de F(ab')₂ de anticuerpo biespecífico completamente humanizada. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

También se han descrito diversas técnicas para elaborar y aislar directamente fragmentos de anticuerpo biespecífico a partir del cultivo de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido anticuerpos biespecíficos usando cremalleras de leucina. Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucinas de las proteínas Fos y Jun se unieron a las porciones Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros de anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y se reoxidaron luego para formar los heterodímeros de anticuerpo. Este procedimiento también se puede utilizar para la producción de homodímeros de anticuerpos. La tecnología "diacuerpo" descrita por Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para elaborar fragmentos de anticuerpo biespecífico. Los fragmentos comprenden un dominio variable de la cadena pesada (V_H) conectado a un dominio variable de la cadena ligera (V_L) mediante un conector que es demasiado corto para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena. En consecuencia, se fuerza a los dominios V_H y V_L de un fragmento a que se aparezan con los dominios V_L y V_H complementarios de otro fragmento, formando de este modo dos sitios de unión a antígeno. También se ha informado de otra estrategia para preparar fragmentos de anticuerpos biespecíficos mediante el uso de dímeros de Fv monocatenarios (sFv). Véase Gruber *et al.*, *J. Immunol.*, 152:5368 (1994).

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

(vii) Anticuerpos de dominio único

En determinados modos de realización, un anticuerpo descrito en el presente documento es un anticuerpo de dominio único. Un anticuerpo de dominio único es una cadena polipeptídica única que comprende la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena pesada o la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena

ligera de un anticuerpo. En determinados modos de realización, un anticuerpo de dominio único es un anticuerpo de dominio único humano (Domantis, Inc., Waltham, Mass.; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 6.248.516 B1). En un modo de realización, un anticuerpo de dominio único consiste en la totalidad o una porción del dominio variable de la cadena pesada de un anticuerpo.

5

(viii) Variantes de anticuerpo

En algunos modos de realización, se contempla(n) una modificación/modificaciones de secuencia de aminoácidos de los anticuerpos descritos en el presente documento. Por ejemplo, puede ser deseable mejorar la afinidad de unión y/u otras propiedades biológicas del anticuerpo. Las variantes de secuencia de aminoácidos de un anticuerpo se pueden preparar introduciendo cambios apropiados en la secuencia de nucleótidos que codifica el anticuerpo o mediante síntesis de péptidos. Dichas modificaciones incluyen, por ejemplo, deleciones de y/o inserciones en y/o sustituciones de residuos en las secuencias de aminoácidos del anticuerpo. Se puede realizar cualquier combinación de deleción, inserción y sustitución para llegar a la construcción final, siempre que la construcción final posea las características deseadas. Las alteraciones de aminoácidos se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en que se prepara la secuencia.

10

15

(ix) Derivados de anticuerpo

Los anticuerpos en las formulaciones y composiciones de la invención se pueden modificar además para que contengan restos no proteínicos adicionales que se conocen en la técnica y están disponibles fácilmente. En determinados modos de realización, los restos adecuados para la derivatización del anticuerpo son polímeros solubles en agua. Los ejemplos no limitantes de polímeros solubles en agua incluyen, pero no se limitan a, polietilenglicol (PEG), copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, carboximetilcelulosa, dextrano, poli(alcohol vinílico), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poliaminoácidos (homopolímeros o bien copolímeros aleatorios) y dextrano o poli(n-vinilpirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (por ejemplo, glicerol), poli(alcohol vinílico) y mezclas de los mismos. El propionaldehído de polietilenglicol puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El polímero puede ser de cualquier peso molecular y puede estar ramificado o no ramificado. El número de polímeros enlazados al anticuerpo puede variar, y si se enlaza más de un polímero, pueden ser moléculas iguales o diferentes. En general, se puede determinar el número y/o tipo de polímeros usados para la derivatización basándose en consideraciones, que incluyen, pero no se limitan a, las propiedades o funciones particulares del anticuerpo que se va a mejorar, independientemente de si el derivado de anticuerpo se usará en un tratamiento en condiciones definidas, etc.

20

25

30

35

(x) Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

También se pueden producir anticuerpos usando procedimientos recombinantes. Para la producción recombinante de un anticuerpo antiantígeno, el ácido nucleico que codifica el anticuerpo se aísla e inserta en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. El ADN que codifica el anticuerpo se puede aislar y secuenciar fácilmente usando procedimientos convencionales (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que se puedan unir específicamente a genes que codifiquen las cadenas pesada y ligera del anticuerpo). Están disponibles muchos vectores. Los componentes del vector incluyen, en general, pero no se limitan a uno o más de los siguientes: una secuencia señal, un origen de replicación, uno o más genes marcadores, un elemento potenciador, un promotor y una secuencia de terminación de la transcripción.

40

45

(a) Componente de secuencia señal

Se puede producir de manera recombinante un anticuerpo en las formulaciones y composiciones descritas en el presente documento, no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterógeno, que sea preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia señal heterógena seleccionada es preferentemente una que se reconoce y se procesa (es decir, se escinde mediante una peptidasa señal) por la célula huésped. Para las células huésped procariontas que no reconocen y procesan una secuencia señal de anticuerpo natural, la secuencia señal se sustituye por una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, del grupo de las secuencias líder de fosfatasa alcalina, penicilinas, lpp o enterotoxina termoestable II. Para la secreción de levaduras, la secuencia señal natural se puede sustituir, por ejemplo, por la secuencia líder de invertasa de levadura, una secuencia líder de factor (incluyendo las secuencias líder de factor α de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o la secuencia líder de fosfatasa ácida, la secuencia líder de glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en el documento WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero, están disponibles secuencias señal de mamífero, así como secuencias líder secretoras víricas, por ejemplo, la señal gD del herpes simple.

50

55

60

(b) Origen de replicación

Tanto los vectores de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que posibilita que el

65

vector se replique en una o más células huésped seleccionadas. En general, en vectores de clonación esta secuencia es una que posibilita que el vector se replique independientemente del ADN cromosómico del huésped, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias se conocen bien para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias gramnegativas, el origen del plásmido 2 μ es adecuado para la levadura y diversos orígenes víricos (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para los vectores de clonación en células de mamífero. En general, no se necesita el componente de origen de replicación para los vectores de expresión en mamíferos (típicamente solo se puede usar el origen de SV40 porque contiene el promotor temprano).

10 (c) Componente de gen de selección

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

Un ejemplo de un esquema de selección utiliza un fármaco para detener el crecimiento de una célula huésped. Las células que se transforman con éxito con un gen heterólogo producen una proteína que confiere resistencia a fármacos y, por tanto, sobreviven al régimen de selección. Los ejemplos de dicha selección dominante usan los fármacos neomicina, ácido micofenólico e higromicina.

Otro ejemplo de marcadores seleccionables adecuados para células de mamífero son los que posibilitan la identificación de células competentes para captar ácido nucleico que codifique anticuerpos, tal como DHFR, glutamina sintetasa (GS), timidina cinasa, metalotioneína I y II, preferentemente genes de metalotioneína de primate, adenosina desaminasa, ornitina descarboxilasa, etc.

Por ejemplo, se identifican las células transformadas con el gen DHFR cultivando los transformantes en un medio de cultivo que contenga metotrexato (Mtx), un antagonista competitivo de DHFR. En estas condiciones, se amplifica el gen DHFR junto con cualquier otro ácido nucleico cotransformado. Se puede usar una línea de células de ovario de hámster chino (CHO) carente de actividad DHFR endógena (por ejemplo, ATCC CRL-9096).

De forma alternativa, se identifican las células transformadas con el gen GS cultivando los transformantes en un medio de cultivo que contiene L-metionina sulfoximina (Msx), un inhibidor de GS. En estas condiciones, el gen GS se amplifica junto con cualquier otro ácido nucleico cotransformado. Se puede usar el sistema de selección/amplificación de GS en combinación con el sistema de selección/amplificación de DHFR descrito anteriormente.

De forma alternativa, se pueden seleccionar células huésped (en particular huéspedes naturales que contengan DHFR endógena) transformadas o cotransformadas con secuencias de ADN que codifiquen un anticuerpo de interés, gen DHFR natural y otro marcador seleccionable, tal como aminoglucósido 3'-fosfotransferasa (APH) mediante crecimiento de células en medio que contenga un agente de selección para el marcador seleccionable, tal como un antibiótico aminoglucosídico, por ejemplo, canamicina, neomicina o G418. Véase la patente de EE. UU. n.º 4.965.199.

Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp 1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de la lesión de *trp1* en el genoma de la célula huésped de levadura proporciona, entonces, un entorno eficaz para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura carentes de Leu2 (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que tienen el gen *Leu2*.

Además, se pueden usar los vectores derivados del plásmido circular de 1,6 μ m pKD1 para la transformación de levaduras *Kluyveromyces*. De forma alternativa, se ha informado de un sistema de expresión para la producción a gran escala de quimosina de ternero recombinante para *K. lactis*. Van den Berg, *Bio/Technology*, 8:135 (1990). También se han divulgado vectores de expresión de múltiples copias estables para la secreción de seroalbúmina humana recombinante madura mediante cepas industriales de *Kluyveromyces*. Fleer *et al.*, *Bio/Technology*, 9:968-975 (1991).

60 (d) Componente de promotor

Los vectores de expresión y clonación contienen, en general, un promotor que se reconoce por el organismo huésped y se une funcionalmente al ácido nucleico que codifica un anticuerpo. Los promotores adecuados para uso con huéspedes procariontes incluyen el promotor *phoA*, los sistemas promotores de β -lactamasa y lactosa, el promotor de fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor

tac. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Shine-Dalgarno (S.D.) unida funcionalmente al ADN que codifica un anticuerpo.

5 Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Prácticamente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente de 25 a 30 bases en dirección 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada de 70 a 80 bases en dirección 5' del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, en la que N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de los genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la secuencia señal para la adición de la cola de poli A en el extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan adecuadamente en vectores de expresión eucariotas.

15 Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con huéspedes de levaduras incluyen los promotores para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glucolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

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

25 La transcripción de anticuerpos a partir de vectores en células huésped de mamífero se puede controlar, por ejemplo, mediante los promotores obtenidos a partir de los genomas de virus, tales como poliomavirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como adenovirus 2), papilomavirus bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y virus de simio 40 (SV40), o partir de promotores de mamífero heterólogos, por ejemplo, el promotor de actina o un promotor de inmunoglobulina, a partir de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células huésped.

35 Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación vírico de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción de HindIII E. Se divulga un sistema para expresar ADN en huéspedes de mamífero usando el papilomavirus bovino como vector en la patente de EE. UU. n.º 4.419.446. Se describe una modificación de este sistema en la patente de EE. UU. n.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, *Nature* 297:598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc de β -interferón humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina cinasa del virus del herpes simple. De forma alternativa, se puede usar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

40 (e) Componente de elemento potenciador

45 La transcripción de un ADN que codifica un anticuerpo por eucariotas superiores se incrementa a menudo insertando una secuencia potenciadora en el vector. Muchas secuencias potenciadoras se conocen ahora a partir de genes de mamífero (globina, elastasa, albúmina, α -fetoproteína e insulina). Típicamente, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (pb 100-270), el promotor/potenciador temprano del citomegalovirus, el potenciador de polio en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297:17-18 (1982) sobre los elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede cortar y empalmar en el vector en una posición 5' o 3' con respecto a la secuencia codificante del anticuerpo, pero se localiza en un sitio 5' del promotor.

(f) Componente de terminación de la transcripción

55 Los vectores de expresión usados en células huésped eucariotas (células de levaduras, de hongos, de insectos, vegetales, animales, de seres humanos o nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están disponibles comúnmente de regiones no traducidas en 5' y, ocasionalmente, en 3' de ADN o ADNc eucariotas o víricos. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida del ARNm que codifica un anticuerpo. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona del crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión divulgado en el mismo.

65 (g) Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento son las

células procariotas, de levaduras o de eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este fin incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, enterobacterias, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como *Bacilli*, tal como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, *B. licheniformis*41P divulgada en el documento DD 266,710, publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tal como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferente es *E. coli* 294 (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas, tales como *E. coli* B, *E. coli* X1776 (ATCC 31.537) y *E. coli* W3110 (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Se pueden producir anticuerpos de longitud completa, proteínas de fusión con anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en bacterias, en particular, cuando no se necesitan la glucosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) que por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen una mayor semivida en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.648.237 (Carter et al.), la patente de EE. UU. n.º 5.789.199 (Joly et al.), la patente de EE. UU. n.º 5.840.523 (Simmons et al.) que describe la región de inicio de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y la secreción. (Véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*. Después de su expresión, el anticuerpo se aísla de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar a través de, por ejemplo, una columna de proteína A o G, dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de manera similar al procedimiento para purificar el anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.

Además de los microbios procariotas, los eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es el más usado entre los microorganismos huésped eucariotas inferiores. Sin embargo, está comúnmente disponible una serie de otros géneros, especies y cepas y son útiles en el presente documento, tales como los huéspedes de *Schizosaccharomyces pombe*; *Kluyveromyces*, tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickerhamii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilum* (ATCC 36,906), *K. thermotolerans*, y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*; *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, los huéspedes de *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium*, y *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Para obtener una revisión que analice el uso de levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).

Se pueden seleccionar determinadas cepas de hongos y levaduras en las que se han "humanizado" las vías de glucosilación, dando como resultado la producción de un anticuerpo con un patrón de glucosilación parcial o completamente humano. Véase, por ejemplo, Li et al., *Nat. Biotech.* 24:210-215 (2006) (que describe la humanización de la vía de glucosilación en *Pichia pastoris*); y Gerngross et al., *supra*.

Las células huésped adecuadas para la expresión del anticuerpo glucosilado también derivan de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrado incluyen células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas y variantes baculovíricas y las correspondientes células huésped permisivas de insecto de huéspedes tales como *Spodoptera frugiperda* (oruga), *Aedes aegypti* (mosquito), *Aedes albopictus* (mosquito), *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y *Bombyx mori*. Están disponibles públicamente una variedad de cepas víricas para la transfección, por ejemplo, la variante L-1 de NPV de *Autographa californica* y la cepa Bm-5 de NPV de *Bombyx mori*, y se pueden usar dichos virus como el virus en el presente documento, en particular, para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

También se pueden utilizar como huéspedes cultivos de células vegetales de algodón, maíz, patata, soja, petunia, tomate, lenteja de agua (*Leninaceae*) alfalfa (*M. truncatula*), y tabaco. Véase, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 5.959.177, 6.040.498, 6.420.548, 7.125.978 y 6.417.429 (que describen la tecnología PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

Se pueden usar células de vertebrado como huéspedes y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejidos) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero son líneas CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para su cultivo en cultivo de suspensión, Graham et al., *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TR1 (Mather et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5;

células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR⁻ (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma, tales como NS0 y Sp2/0. Para obtener una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos, véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 255-268.

Las células huésped se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos anteriormente para la producción de anticuerpos y se cultivan en medios nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

(h) Cultivo de células huésped

Las células huésped usadas para producir un anticuerpo se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente, tales como F10 de Ham (Sigma), medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, se puede usar cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), las patentes de EE. UU. n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; el documento WO 90/03430; el documento WO 87/00195; o la patente de EE. UU. Re. 30.985 como medio de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCINTM), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario en concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

(xi) Purificación del anticuerpo

Cuando se usan técnicas recombinantes, los anticuerpos se pueden producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como una primera etapa, los restos de partículas, células huésped o bien fragmentos lisados, se eliminan, por ejemplo, mediante centrifugación o ultrafiltración. Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) describen un procedimiento para aislar anticuerpos que se secretan en el espacio periplásmico de *E. coli*. En resumen, se descongela la pasta de células en presencia de acetato de sodio (pH 3,5), EDTA y fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) durante aproximadamente 30 min. Los restos celulares se pueden eliminar mediante centrifugación. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de dichos sistemas de expresión en primer lugar se concentran, en general, usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de proteasa, tal como PMSF, en cualquiera de las etapas anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.

La composición de anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la cromatografía de afinidad una de las etapas de purificación preferentes típicas. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Se puede usar proteína A para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)) La matriz a la que se enlaza el ligando de afinidad es lo más a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Si el anticuerpo comprende un dominio C_{H3}, la resina ABXTM (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para su purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SEPHAROSETM en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poli(ácido aspártico)), cromatografía en SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

En general, diversas metodologías para preparar anticuerpos para su uso en investigación, pruebas y clínica están bien establecidas en la técnica, y están en consonancia con las metodologías descritas anteriormente y/o según se considere apropiado por un experto en la técnica para un anticuerpo particular de interés.

B. Selección de anticuerpos biológicamente activos

Los anticuerpos producidos como se describe anteriormente se pueden someter a uno o más ensayos de "actividad biológica" para seleccionar un anticuerpo con propiedades beneficiosas desde una perspectiva terapéutica. El anticuerpo se puede cribar para determinar su capacidad de unirse al antígeno contra el que se produjo. Por ejemplo, para un anticuerpo anti-DR5 (por ejemplo, drozitumab), las propiedades de unión a antígeno del anticuerpo se pueden evaluar en un ensayo que detecta la capacidad de unirse a un receptor de muerte 5 (DR5).

En otro modo de realización, la afinidad del anticuerpo se puede determinar, por ejemplo, mediante unión por saturación; ELISA; y/o ensayos de competición (por ejemplo, RIA).

Además, se puede someter el anticuerpo a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como agente terapéutico. En la técnica se conocen dichos ensayos y dependen del antígeno diana y del uso pretendido del anticuerpo.

Para cribar para determinar anticuerpos que se unan a un epítipo particular en un antígeno de interés, se puede realizar un ensayo de bloqueo cruzado rutinario, tal como el descrito en *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). De forma alternativa, se puede realizar cartografía de epítopos, por ejemplo, como se describe en Champe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270:1388-1394 (1995) para determinar si el anticuerpo se une a un epítipo de interés.

C. Preparación de las formulaciones

En el presente documento se proporcionan procedimientos de preparación de una formulación líquida que comprende una proteína y un compuesto que previene la oxidación de la proteína en la formulación líquida, en los que la proteína es un anticuerpo. La formulación líquida se puede preparar mezclando la proteína que tenga el grado de pureza deseado con un compuesto que prevenga la oxidación de la proteína en la formulación líquida. En determinados modos de realización, la proteína que se va a formular no se ha sometido a liofilización previa y la formulación de interés en el presente documento es una formulación acuosa. En algunos modos de realización, la proteína es una proteína terapéutica. En otros modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un fragmento de anticuerpo. En determinados modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa. En un modo de realización, el anticuerpo en la formulación es un fragmento de anticuerpo, tal como un $F(ab')_2$, en cuyo caso puede que no sea necesario abordar los problemas que puede que no se produzcan para el anticuerpo de longitud completa (tal como el truncamiento de lisina C terminal del anticuerpo con respecto a Fab). La cantidad terapéuticamente eficaz de proteína presente en la formulación se determina teniendo en cuenta los volúmenes de dosis y el/los modo(s) de administración deseados, por ejemplo. Desde aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, desde aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, desde aproximadamente 15 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml, desde aproximadamente 20 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, desde aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml, desde aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml, desde aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml, desde aproximadamente 30 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml o desde aproximadamente 45 mg/ml a aproximadamente 55 mg/ml es una concentración de proteínas ejemplar en la formulación. En algunos modos de realización, la proteína descrita en el presente documento es sensible a la oxidación. En algunos modos de realización, uno o más de los aminoácidos seleccionados del grupo que consiste en metionina, cisteína, histidina, triptófano y tirosina en la proteína son sensibles a la oxidación. En algunos modos de realización, el triptófano en la proteína es sensible a la oxidación. En algunos modos de realización, la metionina en la proteína es sensible a la oxidación. En algunos modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es sensible a la oxidación en la porción Fab y/o la porción Fc del anticuerpo. En algunos modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es sensible a la oxidación en un aminoácido triptófano en la porción Fab del anticuerpo. En otro modo de realización, el aminoácido triptófano sensible a la oxidación está en una CDR del anticuerpo. En algunos modos de realización, un anticuerpo proporcionado en el presente documento es sensible a la oxidación en un aminoácido metionina en la porción Fc del anticuerpo.

Las formulaciones líquidas proporcionadas por la invención en el presente documento comprenden una proteína y un compuesto que previene la oxidación de la proteína en la formulación líquida, en las que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 5-hidroxitriptófano, 5-hidroxiindol, 7-hidroxiindol, y serotonina, y en las que la proteína es un anticuerpo. En algunos modos de realización, el compuesto en la formulación está a una concentración desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 10 mM, o hasta la concentración más alta a la que el compuesto es soluble en la formulación. En determinados modos de realización, el compuesto en la formulación está a una concentración desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 9 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 8 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 7 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 6 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 5 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 4 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 3 mM, desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 2 mM, desde aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 2 mM, desde aproximadamente 0,6 mM a aproximadamente 1,5 mM o desde aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 1,25 mM. En algunos modos de realización, el compuesto en la

formulación es aproximadamente 1 mM. En algunos modos de realización, el compuesto previene la oxidación de uno o más aminoácidos en la proteína. En algunos modos de realización, el compuesto previene la oxidación de uno o más aminoácidos en la proteína seleccionados del grupo que consiste en triptófano, metionina, tirosina, histidina y/o cisteína. En algunos modos de realización, el compuesto previene la oxidación de la proteína mediante una especie reactiva del oxígeno (ERO). En otro modo de realización, la especie reactiva del oxígeno se selecciona del grupo que consiste en un oxígeno singlete, un superóxido (O_2^-), un radical alcoxilo, un radical peroxilo, un peróxido de hidrógeno (H_2O_2), un trióxido de dihidrógeno (H_2O_3), un radical hidrotroxilo (HO_2^\bullet), ozono (O_3), un radical hidroxilo y un peróxido de alquilo. En otro modo de realización, el compuesto previene la oxidación de uno o más aminoácidos en la porción Fab de un anticuerpo. En otro modo de realización adicional, el compuesto previene la oxidación de uno o más aminoácidos en la porción Fc de un anticuerpo.

En algunos modos de realización, la formulación líquida comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en un estabilizante, un tampón, un tensioactivo y un agente de tonicidad. Se prepara una formulación líquida de la invención en una solución tamponada a un pH. El tampón de la presente invención tiene un pH en el intervalo desde aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0. En determinados modos de realización, el pH está en el intervalo desde pH 4,5 a 6,5, en el intervalo desde pH 4,5 a 6,0, en el intervalo desde pH 4,5 a 5,5, en el intervalo desde pH 4,5 a 5,0, en el intervalo desde pH 5,0 a 7,0, en el intervalo desde pH 5,5 a 7,0, en el intervalo desde pH 5,7 a 6,8, en el intervalo desde pH 5,8 a 6,5, en el intervalo desde pH 5,9 a 6,5, en el intervalo desde pH 6,0 a 6,5 o en el intervalo desde pH 6,2 a 6,5. En determinados modos de realización de la invención, la formulación líquida tiene un pH de 6,2 o de aproximadamente 6,2. En determinados modos de realización de la invención, la formulación líquida tiene un pH de 6,0 o de aproximadamente 6,0. Los ejemplos de tampones que controlarán el pH en este intervalo incluyen ácidos orgánicos e inorgánicos y sales de los mismos. Por ejemplo, acetato (por ejemplo, acetato de histidina, acetato de arginina, acetato de sodio), succinato (por ejemplo, succinato de histidina, succinato de arginina, succinato de sodio), gluconato, fosfato, fumarato, oxalato, lactato, citrato y combinaciones de los mismos. La concentración de tampón puede ser desde aproximadamente 1 mM a aproximadamente 600 mM, dependiendo, por ejemplo, del tampón y de la isotonicidad deseada de la formulación. En determinados modos de realización, la formulación comprende un tampón de histidina (por ejemplo, en la concentración desde aproximadamente 5 mM a 100 mM). Los ejemplos de tampones de histidina incluyen cloruro de histidina, acetato de histidina, fosfato de histidina, sulfato de histidina, succinato de histidina, etc. En determinados modos de realización, la formulación comprende histidina y arginina (por ejemplo, cloruro de histidina-cloruro de arginina, acetato de histidina-acetato de arginina, fosfato de histidina-arginina fosfato, sulfato de histidina-sulfato de arginina, succinato de histidina-succinato de arginina, etc.). En determinados modos de realización, la formulación comprende histidina en la concentración desde aproximadamente 5 mM a 100 mM y la arginina está en la concentración de 50 mM a 500 mM. En un modo de realización, la formulación comprende acetato de histidina (por ejemplo, aproximadamente 20 mM) - acetato de arginina (por ejemplo, aproximadamente 150 mM). En determinados modos de realización, la formulación comprende succinato de histidina (por ejemplo, aproximadamente 20 mM)-succinato de arginina (por ejemplo, aproximadamente 150 mM). En determinados modos de realización, la histidina en la formulación es desde aproximadamente 10 mM a aproximadamente 35 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 30 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 25 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 20 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 15 mM, aproximadamente 15 mM a aproximadamente 35 mM, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 35 mM, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM o aproximadamente 20 mM a aproximadamente 25 mM. En otros modos de realización, la arginina en la formulación es desde aproximadamente 50 mM a aproximadamente 500 mM (por ejemplo, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 150 mM o aproximadamente 200 mM).

La formulación líquida de la invención puede comprender además un sacárido, tal como un disacárido (por ejemplo, trehalosa o sacarosa). Un "sacárido" como se usa en el presente documento incluye la composición general $(CH_2O)_n$ y derivados de la misma, incluyendo monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, alditoles, azúcares reductores, azúcares no reductores, etc. Los ejemplos de sacáridos en el presente documento incluyen glucosa, sacarosa, trehalosa, lactosa, fructosa, maltosa, dextrano, glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, manitol, melibiosa, melecitosa, rafinosa, manotriosa, estaquirosa, lactulosa, maltulosa, glucitol, maltitol, lactitol, isomaltulosa, etc.

Se puede añadir opcionalmente un tensioactivo a la formulación líquida. Los tensioactivos ejemplares incluyen tensioactivos no iónicos, tales como polisorbatos (por ejemplo, los polisorbatos 20, 80, etc.) o poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188, etc.). La cantidad de tensioactivo añadido es tal que reduce la agregación del anticuerpo formulado y/o minimiza la formación de partículas en la formulación y/o reduce la adsorción. Por ejemplo, el tensioactivo puede estar presente en la formulación en una cantidad desde aproximadamente un 0,001 % a aproximadamente un 0,5 %, desde aproximadamente un 0,005 % a aproximadamente un 0,2 %, desde aproximadamente un 0,01 % a aproximadamente un 0,1 %, desde aproximadamente un 0,02 % a aproximadamente un 0,06 %, o aproximadamente un 0,03 % a aproximadamente un 0,05 %. En determinados modos de realización, el tensioactivo está presente en la formulación en una cantidad de un 0,04 % o de aproximadamente un 0,04 %. En determinados modos de realización, el tensioactivo está presente en la formulación en una cantidad de un 0,02 % o de aproximadamente un 0,02%. En un modo de realización, la formulación no comprende un tensioactivo.

En un modo de realización, la formulación contiene los agentes identificados anteriormente (por ejemplo, anticuerpo,

tampón, sacárido y/o tensioactivo) y está esencialmente libre de uno o más conservantes, tales como alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol y cloruro de bencetonio. En otro modo de realización, se puede incluir un conservante en la formulación, en particular, cuando la formulación es una formulación de dosis múltiples. La concentración de conservante puede estar en el intervalo desde aproximadamente un 0,1 % a aproximadamente un 2 %, preferentemente desde aproximadamente un 0,5 % a aproximadamente un 1 %. Uno o más de otros vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980) se pueden incluir en la formulación siempre que no afecten de manera adversa a las características deseadas de la formulación. Los excipientes farmacéuticamente aceptables ejemplares en el presente documento incluyen además agentes de dispersión intersticial de fármacos, tales como glucoproteínas de hialuronidasa activa a pH neutro solubles (sHASEGP), por ejemplo, glucoproteínas de hialuronidasa PH-20 soluble humana, tal como rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Se describen determinadas sHASEGP ejemplares y procedimientos de uso, incluyendo rHuPH20, en las publicaciones de patente de EE. UU. 2005/0260186 y 2006/0104968. En un aspecto, se combina una sHASEGP con una o más glucosaminoglucanasas adicionales, tales como condroitinasas.

La formulación puede comprender además quelantes de iones de metal. Los quelantes de iones de metal se conocen bien por los expertos en la técnica e incluyen, pero necesariamente no se limitan a aminopolicarboxilatos, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), EGTA (ácido etilenglicol-bis(beta-aminoetiléter)-*N,N,N',N'*-tetraacético), NTA (ácido nitrilotriacético), EDDS (disuccinato de etilendiamina), PDTA (ácido 1,3-propilendiaminotetraacético), DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), ADA (ácido beta-alanindiácético), MGCA (ácido metilglicindiácético), etc. Adicionalmente, algunos modos de realización en el presente documento comprenden quelantes de fosfonatos/ácido fosfónico.

Los agentes de tonicidad están presentes para ajustar o mantener la tonicidad del líquido en una composición. Cuando se usan con biomoléculas grandes y cargadas, tales como proteínas y anticuerpos, también pueden servir como "estabilizantes" porque pueden interactuar con los grupos cargados de las cadenas laterales de aminoácidos, disminuyendo de este modo el potencial de las interacciones inter e intramoleculares. Los agentes de tonicidad pueden estar presentes en cualquier cantidad entre un 0,1 % y un 25 % en peso, o más preferentemente entre un 1 % y un 5 % en peso, teniendo en cuenta las cantidades relativas de los demás ingredientes. Los agentes de tonicidad preferentes incluyen alditoles polihídricos, preferentemente alditoles trihídricos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

La formulación en el presente documento también puede contener más una proteína o fármaco tradicional según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no afecten de manera adversa a la otra proteína. Por ejemplo, si el anticuerpo es anti-DR5 (por ejemplo, drozitumab), se puede combinar con otro agente (por ejemplo, un agente quimioterápico y un agente antineoplásico).

En algunos modos de realización, la formulación es para su administración *in vivo*. En algunos modos de realización, la formulación es estéril. La formulación se puede convertir en estéril mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Las formulaciones terapéuticas en el presente documento se disponen, en general, en un recipiente que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o frasco de solución intravenosa que tenga un tapón perforable mediante una aguja de inyección hipodérmica. La vía de administración es de acuerdo con procedimientos conocidos y aceptados, tales como inyección intravenosa rápida única o múltiple o infusión durante un largo periodo de tiempo de manera adecuada, por ejemplo, inyección o infusión por vías subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intrarterial, intralesional o intrarticular, administración tópica, inhalación o mediante medios de liberación mantenida o de liberación prolongada.

La formulación líquida de la invención puede ser estable tras su almacenamiento. En algunos modos de realización, la proteína en la formulación líquida es estable tras su almacenamiento a aproximadamente 0 °C a 5 °C durante al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 21 meses o al menos aproximadamente 24 meses (o al menos aproximadamente 52 semanas). En algunos modos de realización, la proteína en la formulación líquida es estable tras su almacenamiento a aproximadamente -20 °C durante al menos aproximadamente 12 meses, al menos aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 21 meses o al menos aproximadamente 24 meses (o al menos aproximadamente 52 semanas). En algunos modos de realización, la proteína en la formulación líquida es estable durante la fabricación de la formulación. En algunos modos de realización, la proteína en la formulación líquida es estable cuando se almacena en un recipiente de aleación de metal (por ejemplo, un recipiente de acero inoxidable). En algunos modos de realización, la proteína en la formulación líquida es estable cuando se almacena en un frasco de vidrio. En algunos modos de realización, la proteína en la formulación líquida es estable cuando se almacena en un recipiente de plástico. En algunos modos de realización, se evalúa o mide la estabilidad física, la estabilidad química o la actividad biológica de la proteína en la formulación líquida. Se puede usar cualquier procedimiento conocido en la técnica para evaluar la estabilidad y la actividad biológica. En algunos modos de realización, la estabilidad se mide mediante oxidación de la proteína en la formulación líquida después del almacenamiento. Se puede someter a prueba la estabilidad evaluando la estabilidad física, la estabilidad química y/o la actividad biológica del anticuerpo en la formulación en el momento de la formulación, así como tras el almacenamiento. La estabilidad física y/o química se puede evaluar cualitativa y/o

cuantitativamente de una variedad de formas diferentes, incluyendo la evaluación de la formación de agregados (por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño, midiendo la turbidez y/o mediante inspección visual); evaluando la heterogeneidad de carga usando cromatografía de intercambio catiónico o electroforesis capilar en zona; análisis de secuencias aminoterminales o carboxiterminales; análisis por espectrometría de masas; análisis por SDS-PAGE para comparar anticuerpos reducidos e inalterados; análisis por cartografía peptídica (por ejemplo, tripsínica o LYS-C); evaluando la actividad biológica o la función de unión a antígeno del anticuerpo, etc. La inestabilidad puede dar como resultado la agregación, desamidación (por ejemplo, desamidación de Asn), oxidación (por ejemplo, oxidación de Trp), isomerización (por ejemplo, isomerización de Asp), truncamiento de lisina C terminal/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo, fragmentación de la región bisagra), formación de succinimida, cisteína(s) desapareada(s), extensión N terminal, procesamiento C terminal, diferencias de glucosilación, etc. En algunos modos de realización, la oxidación en una proteína se determina usando una o más de RP-HPLC, CL/EM o cartografía peptídica tripsínica. En algunos modos de realización, la oxidación en un anticuerpo se determina como un porcentaje usando una o más de RP-HPLC, CL/EM o cartografía peptídica tripsínica y la fórmula de:

$$\% \text{ de oxidación de Fab} = 100 \times \frac{\text{Área del pico de Fab oxidado}}{\text{Área del pico de Fab} + \text{área de pico de Fab oxidado}}$$

$$\% \text{ de oxidación de Fc} = 100 \times \frac{\text{Área del pico de Fc oxidado}}{\text{Área de pico de Fc} + \text{área del pico de Fc oxidado}}$$

Las formulaciones que se vayan a usar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, previamente o tras la preparación de la formulación.

En el presente documento también se proporcionan procedimientos de preparación de una formulación líquida o de prevención de la oxidación de una proteína en una formulación líquida que comprenden añadir una cantidad de un compuesto que previene la oxidación de una proteína a una formulación líquida, en los que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 5-hidroxitriptófano, 5-hidroxiindol, 7-hidroxiindol, y serotonina, y en los que la proteína es un anticuerpo. En el presente documento la invención también proporciona un procedimiento de prevención de la oxidación de una proteína en una formulación líquida que comprende añadir una cantidad de un compuesto que previene la oxidación de la proteína a la formulación líquida, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 5-hidroxitriptófano, 5-hidroxiindol, 7-hidroxiindol, y serotonina, y en el que la proteína es un anticuerpo. La cantidad del compuesto que previene la oxidación de la proteína como se proporciona en el presente documento es desde aproximadamente 0,3 mM a aproximadamente 10 mM o cualquiera de las cantidades divulgadas en el presente documento.

III. Administración de formulaciones de proteínas

La formulación líquida se administra a un mamífero que necesite tratamiento con el anticuerpo, preferentemente un ser humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa como una inyección intravenosa rápida o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intrarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o de inhalación. En un modo de realización, la formulación líquida se administra al mamífero mediante administración intravenosa. Para dichos fines, la formulación se puede inyectar usando una jeringuilla o por medio de una vía intravenosa, por ejemplo. En un modo de realización, la formulación líquida se administra al mamífero mediante administración subcutánea.

La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") de la proteína dependerá, por ejemplo, de la afección que se va a tratar, de la gravedad y de la evolución de la afección, de si la proteína se administra para fines preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis y la respuesta a la proteína del enfermo, del tipo de proteína usada y del criterio del médico responsable. La proteína se administra adecuadamente al enfermo de una vez o durante una serie de tratamientos y se puede administrar al enfermo en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. La proteína se puede administrar como único tratamiento o junto con otros fármacos o tratamientos útiles en el tratamiento de la afección en cuestión. Como se usa en el presente documento, "tratamiento" indica tanto tratamiento terapéutico como medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya presentan el trastorno, así como aquellos en los que se va a prevenir el trastorno. Como se usa en el presente documento, un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento, incluyendo, pero sin limitarse a, trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión.

En un sentido farmacológico, en el contexto de la invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) se refiere a una cantidad eficaz en la prevención o tratamiento de un trastorno para el tratamiento del cual es eficaz el anticuerpo. Como proposición general, la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína administrada estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del enfermo, ya sea mediante una o más administraciones, siendo el intervalo típico de proteína usada de

aproximadamente 0,3 a aproximadamente 20 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 15 mg/kg, administrada diariamente, por ejemplo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. Por ejemplo, se puede administrar una proteína a una dosis de aproximadamente 100 o 400 mg cada 1, 2, 3 o 4 semanas o se administra una dosis de aproximadamente 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 15,0 o 20,0 mg/kg cada 1, 2, 3 o 4 semanas. La dosis se puede administrar como una dosis única o como dosis múltiples (por ejemplo, 2 o 3 dosis), tal como infusiones. El progreso de este tratamiento se supervisa fácilmente mediante técnicas convencionales.

IV. Procedimientos de cribado para determinar compuestos para la prevención de la oxidación de proteínas

En el presente documento también se proporcionan procedimientos de cribado de un compuesto que previene la oxidación de una proteína en una composición de proteínas, en los que la proteína es un anticuerpo. En algunos modos de realización, el procedimiento comprende seleccionar un compuesto que tiene un potencial de oxidación menor y menos fotosensibilidad en comparación con L-triptófano, y someter a prueba el efecto del compuesto seleccionado en la prevención de la oxidación de la proteína. En algunos modos de realización, la fotosensibilidad se mide basándose en la cantidad de H₂O₂ producido por el compuesto tras la exposición a la luz. Por ejemplo, se puede exponer una composición líquida que comprenda el compuesto a luz a 250 W/m² durante una determinada cantidad de tiempo y se cuantifica la formación de H₂O₂ resultante. Un compuesto con menos fotosensibilidad produce menos H₂O₂ tras su exposición a una determinada cantidad de luz que un compuesto que tenga una fotosensibilidad más alta tras su exposición a la misma cantidad de luz. En algunos modos de realización, se selecciona el compuesto que produce menos de aproximadamente un 15 %, menos de aproximadamente un 20 % o menos de aproximadamente un 25 % de la cantidad de H₂O₂. Se puede producir H₂O₂ mediante oxidación de los residuos de aminoácido en una proteína que son sensibles a la oxidación. En algunos modos de realización, el potencial de oxidación se mide mediante voltametría cíclica.

En algunos modos de realización, el compuesto seleccionado se somete a prueba para determinar el efecto en la prevención de la oxidación de la proteína mediante las especies reactivas del oxígeno generadas por diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH), luz y/o un reactivo de Fenton. En cualquiera de los modos de realización en el presente documento, se puede usar un procedimiento descrito en los ejemplos (por ejemplo, ejemplos 2 y 3) para cribar un compuesto que previene la oxidación de una proteína en una composición de proteínas.

V. Artículos de fabricación

En otro modo de realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene la formulación líquida de la invención y proporciona opcionalmente instrucciones para su uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, frascos y jeringas. El recipiente se puede formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio, aleación de metal (tal como acero inoxidable) o plástico. Un recipiente ejemplar es un recipiente de aleación de metal de 300 ml (por ejemplo, para almacenar a -20 °C). Un recipiente ejemplar es un frasco de vidrio de un solo uso de 3-20 ml. De forma alternativa, para una formulación de dosis múltiples, el recipiente puede ser un frasco de vidrio de 3-100 ml. El recipiente contiene la formulación y la etiqueta en o asociada al recipiente puede indicar el modo de empleo. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial o del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos del envase con instrucciones de uso.

Se considera que la memoria descriptiva es suficiente para permitir que un experto en la técnica ponga en práctica la invención.

EJEMPLOS

La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1: El antioxidante L-Trp produce ERO que oxida anticuerpos monoclonales en formulaciones de proteínas.

Los anticuerpos monoclonales han demostrado que producen ERO a través de la vía de oxidación de agua catalizada por anticuerpos (ACWOP), en la que los anticuerpos catalizan potencialmente una reacción entre agua y oxígeno singlete, generando peróxido de hidrógeno (Wentworth *et al.*, *Science* 293(5536): 1806-11 (2001); Wentworth *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 97(20):10930-5 (2000)). En la ACWOP, se generan una variedad de ERO, incluyendo anión superóxido, trióxido de dihidrógeno, ozono e incluso radical hidrotroxi en la vía hacia la producción de peróxido de hidrógeno (Zhu *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 101(8):2247-52 (2004)). Se ha demostrado que los triptófanos expuestos a la superficie en un anticuerpo anti-DR5 monoclonal, drozitumab (número CAS 912628-39-8), también denominado en el presente documento mAb1, actúan como generadores de sustrato (¹O₂ y O₂^{·-}) que facilitan la ACWOP incluso en condiciones de luz moderadas de una manera dependiente del tiempo y de la concentración (Sreedhara *et al.*, *Mol. Pharmaceutics* (2013)). Se demostró que mAb1 era, en particular, sensible a la oxidación durante el almacenamiento en condiciones farmacéuticamente pertinentes (Sreedhara *et al.*, *Mol. Pharmaceutics* (2013)). La oxidación demostró que era específica de sitio y se localizaba en Trp53 (W53) en la CDR

de la cadena pesada (Fab) como se evaluó mediante cartografía peptídica tripsínica. Adicionalmente, se usó un ensayo de HPLC de fase inversa para medir la oxidación total en las regiones Fab y Fc de HC de mAb1 por medio de una digestión con papaína, reducción con DTT y separación de fase inversa. Se identificaron los picos de RP-HPLC usando CL/EM y mostraron una fuerte correlación con los resultados de la cartografía peptídica tripsínica, lo que indica que el procedimiento de RP se podría usar como sustituto para la detección de la oxidación (es decir, % de Fab) en W53 (Sreedhara *et al.*, *Mol. Pharmaceutics* (2013)). En el procedimiento de digestión con papaína con RP, los picos de oxidación de Fab y Fc se eluyeron antes que sus respectivos picos principales, lo que permitió la cuantificación del % de oxidación de Fab y el % de oxidación de Fc en relación con sus áreas de los picos totales. El estudio demostró además que el peróxido de hidrógeno podía servir como sustituto para una serie de ERO, incluyendo superóxido y oxígeno singlete.

Para determinar si se puede usar la exposición a la luz limitada (es decir, controlada) como un modelo de agresión acelerado para estudiar la oxidación de proteínas, se usó el mismo anticuerpo IgG1 monoclonal humano (mAb1) para cribar y evaluar antioxidantes potenciales. L-triptófano (L-Trp), un antioxidante usado en formulaciones de proteínas, recientemente ha demostrado que es fotosensible (Igarashi *et al.*, *Anal Sci* 23(8):943-8 (2007)) y que tiene la capacidad de producir H₂O₂ tras la exposición a la luz. La sensibilidad de mAb1 a L-Trp con agresión lumínica se evaluó, con y sin la adición de L-metionina (L-Met), como antioxidante potencial. Se expresó mAb1 en células de ovario de hámster chino (CHO) y se purificó mediante una serie de procedimientos de cromatografía, incluyendo purificación por afinidad mediante cromatografía de proteína A y cromatografía de intercambio iónico. Se preparó mAb1 a 5 mg/ml en una formulación de acetato de histidina 20 mM, trehalosa 250 mM y polisorbato 20 al 0,02 % en un frasco de vidrio y con L-Trp 1 mM y diversas concentraciones de L-Met, que variaban desde 10 mM a 100 mM, y se expuso a ocho horas de luz a 250 W/m² en un instrumento de prueba Atlas SunTest CPS+ Xenon (Chicago, IL). Los frascos de control se envolvieron en papel metalizado y se trataron de manera similar. Después de la exposición a la luz, se prepararon soluciones para su análisis mediante HPLC de fase inversa. Para RP-HPLC, se preparó una solución de mAb1 del estudio de agresión a 1,1 mg/ml en Tris 0,1 M, EDTA 4,4 mM y cisteína 1,1 mM. Se añadieron 150 µl de papaína 0,1 mg/ml a 1,35 ml de la disolución de mAb1 antes de su incubación a 37 °C durante dos horas. Tras la incubación, se combinaron 900 µl de la solución con 100 µl de ditiotreitilo 1 M (DTT) y se incubaron durante otros treinta minutos a 37 °C. A continuación, las muestras se sometieron a un sistema de HPLC Agilent, Inc. 1100/1200 (Santa Clara, CA) equipado con detección UV a 280 nm junto con una columna de difenilo Varian, Inc. Pursuit 3 µm, 2 mm de DI × 250 mm (Palo Alto, CA). La fase A móvil fue TFA al 0,1 % en agua. La fase B móvil fue TFA al 0,1 % en acetonitrilo. El gradiente de la fase móvil se incrementó linealmente desde un 34 % de B a los 0 minutos a un 43 % de B a los 50,0 minutos, luego, a un 95 % de B a los 50,1 minutos. El gradiente permaneció en un 95 % de B hasta los 60,1 minutos, y, a continuación, disminuyó linealmente desde un 95 % de B a un 34 % de B entre los 60,1 y 60,2 minutos. El gradiente permaneció en un 34 % de B hasta el final del ciclo a los 80,2 minutos. La temperatura de la columna fue de 65 °C, el caudal total fue de 0,2 ml/min y el volumen de inyección de cada muestra fue de 6 µl. Entonces, los cromatogramas se integraron para la cuantificación de la oxidación.

Adicionalmente, se descubrió que mAb1 era estable en tampón basado en L-His a pH 6,0. El análisis de los efectos de exposición a la luz de L-Trp y L-Met en la oxidación de Fab de mAb1 mostró que el material de referencia de mAb1 (sin exposición a la luz) y el control con papel metalizado tenían un 2 % de oxidación de Fab (fig. 1A). Puesto que el control con papel metalizado y el material de referencia mostraron el mismo nivel de oxidación de Fab, era improbable que solo el calor estuviera provocando la oxidación del Fab. Cuando el mAb1 se expuso a la luz (muestra "sin excipiente"), la oxidación de Fab se duplicó en un 4 %. Con la adición de L-Trp 1 mM, la oxidación de Fab se incrementó a casi un 9 %, lo que sugiere que L-Trp libre estaba generando ERO con la exposición a la luz, lo que puede haber dado como resultado la oxidación de W53 en el Fab. La adición adicional de L-Met 10, 25, 50 y 100 mM a una formulación que contenía L-Trp 1 mM parecía reducir ligeramente la oxidación de Fab, pero incluso un exceso molar de 100 de L-Met no redujo la oxidación de Fab al nivel del control con papel metalizado (fig. 1A).

La oxidación en la región Fc de mAb1 ha demostrado que es predominantemente de los residuos de Met 254 y Met 430 (Sreedhara *et al.*, *Mol. Pharmaceutics* (2013)). El análisis de los efectos de exposición a la luz de L-Trp y L-Met en la oxidación de Fc de mAb1 mostró que el material de referencia de mAb1 y el control con papel metalizado tenían aproximadamente un 8 % de oxidación de Fc incluso antes de la exposición a la luz (fig. 1B). La exposición a la luz solo dio como resultado un incremento sin importancia en la oxidación de Fc ("sin excipiente") para mAb1 en el tampón de formulación. Sin embargo, la incubación con L-Trp 1 mM dio como resultado más de un 20 % de oxidación en estos sitios de Met en la región Fc como se observa mediante el ensayo de RP-HPLC. La adición de diversas concentraciones de L-Met (10, 25, 50 y 100 mM) a formulaciones que contenían L-Trp 1 mM redujo la cantidad de oxidación de Fc, aunque ni siquiera L-Met 100 mM redujo la oxidación de Fc al nivel de los controles (fig. 1B).

Se informó previamente de que L-Trp producía H₂O₂ por medio de ion superóxido y de una forma subestequiométrica, mientras que los anticuerpos en condiciones similares producían cantidades catalíticas (Wentworth *et al.*, *Science* 293(5536):1806-11 (2001); McCormick *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* 100:312-313 (1978)). Para someter a prueba la sensibilidad del L-Trp libre en condiciones farmacéuticamente pertinentes, tales como en condiciones de ICH y de luz ambiental, se expusieron formulaciones que comprendían L-Trp de 0,32 mM a 7,5 mM (L-Trp se disolvió en tampón de fosfato de sodio a pH 7,1) durante 3 horas a luz UV a 250 W/m² y aproximadamente 150 k lux de luz visible. Se tomaron muestras y se analizaron inmediatamente por

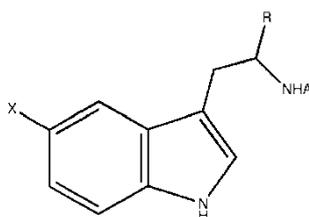
medio del ensayo Amplex para detectar la cantidad de H₂O₂ generado en estas condiciones. Se generó una gran cantidad de H₂O₂ mediante L-Trp libre tras la exposición a la luz de una manera dependiente de la concentración (fig. 2). Esta generación de H₂O₂ se redujo en gran medida en presencia de acida de sodio 50 mM, un inactivador de oxígeno singlete conocido (fig. 2). Cuando se incubó L-Trp con una combinación de NaN₃ 50 mM y 150 U de superóxido dismutasa (SOD) o SOD sola, todavía se detectaron cantidades significativas de H₂O₂ en las muestras que no contenían NaN₃. Esto indicó que, además del singlete de oxígeno, también se generó ion superóxido tras la fotoirradiación, que se convirtió en H₂O₂ mediante SOD.

Mientras se confirmaba la fotosensibilidad del L-Trp libre en condiciones de luz de ICH, se estudió el efecto de la luz ambiental que se observaba típicamente en los laboratorios. Las mediciones usando un fotómetro digital DLM1 en diversos laboratorios indicaron un promedio de 300 lux en una sobremesa de laboratorio (con iluminación fluorescente blanca), un promedio de 3000 lux en una campana de flujo laminar (con iluminación fluorescente blanca) y aproximadamente 10000 lux para un alféizar de una ventana expuesto a la luz solar sureste. En estas condiciones, L-Trp en tampones de formulación que contenían 50 mg/ml de mAb1 produjo peróxido de hidrógeno en el intervalo micromolar como se detectó usando el ensayo Amplex Ultra Red (fig. 3A). La producción de peróxido se incrementó tanto con la luminosidad (300, 3000 y 10000 lux) como con el tiempo (1, 3 y 7 días). Se analizaron además las muestras de proteínas usando el ensayo de RP-HPLC específica de mAb1 y mostraron una oxidación de Fab de la cadena pesada incrementada correspondiente a la oxidación en W53 con luminosidad incrementada (fig. 3B). Al mismo tiempo, el % de oxidación de Fc en mAb1 en estas condiciones se incrementó desde un 5 a un 40 % entre 300 y 10000 lux, respectivamente. Se determinó que estos niveles de exposición a la luz y al tiempo eran farmacéuticamente pertinentes para la manipulación de las sustancias farmacéuticas bajo luz ambiental y a temperatura ambiente antes de las operaciones de llenado/acabado y potencialmente mientras se inspeccionaban los frascos de las especialidades farmacéuticas. Estos resultados respaldaron que L-Trp es fotosensible y que produce varias especies reactivas del oxígeno, incluyendo oxígeno singlete, superóxido y H₂O₂, que pueden ser perjudiciales para la calidad del producto de mAb y que se debe tener cuidado al manipular y almacenar los tampones que contienen L-Trp.

Ejemplo 2: Cribado de compuestos antioxidantes candidatos.

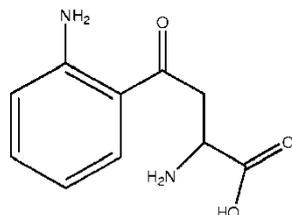
El triptófano (Trp) es un aminoácido rico en electrones que se somete a reacciones de adición electrófila y oxidativa en presencia de ERO, tal como radicales hidroxilo y oxígeno singlete. Cualquier antioxidante potencial para proteger la oxidación de Trp en proteínas debe tener una reactividad similar, si no superior, hacia estas ERO. Se evaluaron una serie de compuestos que estaban basados en la estructura de L-Trp o de los que se informó que tenían propiedades antioxidantes. Los compuestos cribados para determinar su capacidad antioxidante en este estudio incluían derivados de triptófano, indol, ácidos aromáticos, tales como ácido salicílico y ácido antranílico, y algunas vitaminas. Las estructuras químicas de los diversos compuestos usados se basaron en (A) derivados de triptófano, (B) cinurenina, (C) derivados de indol y (D) derivados de ácido aromático:

(A) Derivados de triptófano

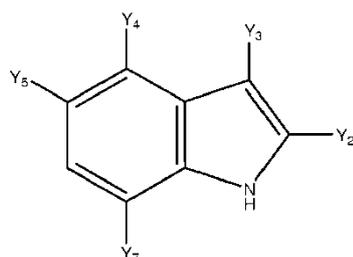


Nombre	R	X	A
L-triptófano	COOH	H	H
5-hidroxi-triptófano	COOH	OH	H
5-metoxi-triptófano	COOH	OCH ₃	H
5-amino-triptófano	COOH	NH ₂	H
5-fluoro-triptófano	COOH	F	H
N-acetil-triptófano	COOH	H	CH ₃ C(O)
Triptamina	H	H	H
Triptófanoamida	CONH ₂	H	H
Serotonina	H	OH	H
Melatonina	H	OCH ₃	CH ₃ C(O)

(B) Cinurenina



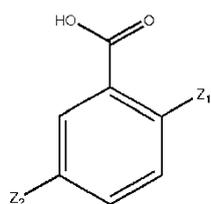
5 (C) Derivados de indol



Nombre	Y ₂	Y ₃	Y ₄	Y ₅	Y ₇
Indol	H	H	H	H	H
Ácido indol-3-acético	H	CH ₂ COOH	H	H	H
4-hidroxiindol	H	H	OH	H	H
5-hidroxiindol	H	H	H	OH	H
Ácido 5-hidroxiindol-3-acético	H	CH ₂ COOH	H	OH	H
7-hidroxiindol	H	H	H	H	OH
Ácido 7-hidroxiindol-2-carboxílico	COOH	H	H	H	OH

10

(D) Derivados de ácido aromático



Nombre	Z ₁	Z ₂
Ácido salicílico	OH	H
Ácido 5-hidroxisalicílico	OH	OH
Ácido antranílico	NH ₂	H
Ácido 5-hidroxiantranílico	NH ₂	OH

Compuestos antioxidantes candidatos obtenidos a partir de un ensayo de cribado por fotosensibilidad.

15

20

25

Aunque L-Trp puede haber sido un antioxidante eficaz en determinadas circunstancias, su fotosensibilidad puede limitar su utilidad durante el procesamiento normal sin precauciones especiales. De ahí que se investigara la fotosensibilidad de las moléculas anteriores y se clasificara la capacidad de generación de H₂O₂ por las moléculas con respecto a L-Trp. Como herramienta de cribado, los candidatos antioxidantes se expusieron a la luz durante cuatro horas a 250 W/m² y se cuantificó la formación de H₂O₂ resultante mediante el ensayo Amplex Ultra Red. Específicamente, se prepararon antioxidantes a 1 mM en tampón de acetato de histidina 20 mM a pH 5,5. Las soluciones antioxidantes 1 mM se dividieron en alícuotas en frascos de vidrio (2 ml/frasco de vidrio) y se expusieron a cuatro horas de luz a 250 W/m² en un instrumento de prueba Atlas SunTest CPS+ Xenon (Chicago, IL). La dosis de UV total fue de 90 vatios-hora/metro cuadrado y la dosis de luz visible total fue de 0,22 millones de lux horas durante el periodo de 4 horas. Los frascos de control se envolvieron en papel metalizado y se trataron de manera similar. La cantidad de peróxido de hidrógeno generado después de la exposición a la luz se midió usando el ensayo

Amplex® Ultra Red (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. Tras la adición de peroxidasa de rábano picante (HRP), el tinte reaccionó estequiométricamente 1:1 con H₂O₂, dando como resultado la producción del producto de oxidación fluorescente resorufina. En este estudio, se obtuvieron lecturas de fluorescencia usando un lector de microplacas Spectra Max M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), fijándose la excitación y la emisión a 560 nm y 590 nm, respectivamente. Se determinaron las concentraciones de H₂O₂ finales usando una curva estándar que variaba desde 0 µM a 20 µM.

El análisis de generación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por derivados de triptófano tras la exposición a la luz demostró que, en condiciones similares de luz (correspondientes a 0,22 millones de lux horas durante un periodo de 4 horas) y tampón (acetato de L-His 20 mM, pH 5,5), 5-hidroxi-L-triptófano (5-HT) producía aproximadamente una décima parte del H₂O₂, mientras que la cinurenina producía aproximadamente una quinta parte del H₂O₂, en comparación con L-Trp (fig. 4A). Otros derivados de triptófano produjeron entre un 30 % y un 105 % del H₂O₂ producido mediante L-Trp. En comparación con L-Trp, Trolox (un derivado de vitamina E soluble en agua) produjo 123 veces más H₂O₂, y piridoxina (Vitamina B6) produjo 5 veces más H₂O₂ (tabla 1). El indol, que tiene una estructura básica similar a L-Trp, se comportó de manera similar a L-Trp, pero el ácido indol-3-acético llegó a producir el doble de H₂O₂ (fig. 4B). Los derivados de hidroxil de indol se comportaron como 5-HT al producir cantidades insignificantes de H₂O₂ tras la exposición a la luz. También se sometieron a prueba varios derivados bioquímicamente pertinentes de L-Trp, a saber, triptamina, serotonina y melatonina. La triptamina produjo aproximadamente la mitad de H₂O₂ que L-Trp (tabla 1). Curiosamente, la serotonina (5-hidroxitriptamina) se comportó mucho como los derivados de 5-OH de indol y triptófano, produciendo muy poco H₂O₂ tras la exposición a la luz, mientras que la melatonina (*N*-acetil-5-metoxitriptamina) produjo menos de un tercio del H₂O₂ producido por L-Trp (tabla 1).

Tabla 1: Proporción de producción de peróxido de hidrógeno entre los compuestos sometidos a prueba y L-Trp

Compuesto	(H ₂ O ₂ producido por el compuesto)/(H ₂ O ₂ producido por L-Trp)
L-Trp	1
L-Trpamida	0,43
<i>N</i> -acetil-L-Trp	0,31
<i>N</i> -acetil-L-Trpamida	0,34
5-fluoro-L-Trp	0,71
5-hidroxi-L-Trp	0,09
5-metoxi-DL-Trp	1,05
5-amino-DL-Trp	0,29
L-cinurenina	0,20
Trolox	122,75
Piridoxina	5,16
Indol	0,95
Ácido indol-3-acético	2,40
4-hidroxiindol	0,00
5-hidroxiindol	-0,08
Ácido 5-hidroxiindol-3-acético	0,11
7-hidroxiindol	-0,03
Ácido 7-hidroxiindol-2-carboxílico	0,15
Triptamina	0,53
Serotonina (5-hidroxitriptamina)	0,03
Melatonina (<i>N</i> -acetil-5-metoxitriptamina)	0,28
Ácido salicílico	0,03
Ácido 5-hidroxisalicílico	0,84
Ácido antranílico	2,50
Ácido 5-hidroxiantranílico	0,44

Para entender la ERO formada durante la fotoirradiación, se sometieron a prueba varios de los derivados de Trp en presencia de NaN_3 50 mM, un inactivador de oxígeno singlete conocido, con exposición a la luz como se describe anteriormente. Todos los compuestos sometidos a prueba mostraron una disminución sustancial de la cantidad de peróxido de hidrógeno generado en estas condiciones, lo que indica que el oxígeno singlete fue una ERO principal creada tras la fotoirradiación de Trp y sus derivados (fig. 5).

Otros compuestos aromáticos, tales como ácido salicílico y derivados, también se sometieron a prueba basándose en sus propiedades antioxidantes informadas (Baltazar *et al.*, *Curr Med Chem* 18(21):3252-64 (2011)). El ácido salicílico produjo muy poco H_2O_2 tras la exposición a la luz, mientras que su derivado de 5-OH se comportó como L-Trp (tabla 1). Por otro lado, el ácido antranílico llegó a producir hasta el doble de H_2O_2 que L-Trp, pero el ácido 5-OH-antranílico produjo solo la mitad de H_2O_2 en comparación con L-Trp (tabla 1).

Compuestos antioxidantes candidatos obtenidos a partir de un ensayo de cribado por VC.

Basándose en los resultados del ensayo de cribado por fotosensibilidad, los compuestos con sustituciones en el anillo aromático parecían influir en la cantidad de peróxido de hidrógeno generado. Puesto que el propósito era la oxidación preferente del excipiente en lugar del fármaco de proteínas, los excipientes que tenían potenciales de oxidación bajos podían haber servido de antioxidantes eficaces. Se investigaron las características de oxidación/reducción de los compuestos. Se evaluaron varios compuestos, incluyendo L-Trp y derivados, frente a la protección de la oxidación de Trp en proteínas usando voltametría cíclica (VC) y se ordenaron basándose en sus potenciales de oxidación (tabla 2). Específicamente, se disolvieron los antioxidantes candidatos en agua desionizada y, después, se añadieron a una solución de electrolito de perclorato de litio 0,2 M. Las soluciones se caracterizaron con un polarógrafo/voltámetro EG&G de Princeton Applied Research, modelo 264A, con un electrodo de carbono vítreo para RDE, modelo 616, como electrodo de trabajo. Las soluciones se sometieron a barrido desde -0,10 V a +1,50 V a una velocidad de barrido de 100 o 500 mV/s. La celda analítica se purgó durante cuatro minutos con nitrógeno antes de someter a barrido cada solución antioxidante. La entrada fue un barrido lineal del potencial de un electrodo de trabajo y la salida fue la medición de la corriente resultante. A medida que el potencial se sometía a barrido (incrementado o disminuido linealmente), las especies electroquímicamente activas en la celda de VC se sometieron a reacciones de oxidación y reducción en la superficie del electrodo de trabajo, lo que dio como resultado una corriente que se medía continuamente. Las reacciones de oxidorreducción se caracterizaron por incrementos o disminuciones bruscos en la corriente (picos). El potencial al que se produjo una reacción de oxidación se denominó potencial de pico anódico (o potencial de oxidación) y el potencial al que se produjo una reducción se denominó potencial de pico catódico (o reducción).

Los potenciales de oxidación de los excipientes en este estudio variaron desde 0,410 a 1,080 V frente a Ag/AgCl (tabla 2). En estas condiciones, L-Trp tuvo un potencial de oxidación irreversible de 0,938 V frente a Ag/AgCl. Se descubrió que nueve compuestos tenían un potencial de oxidación menor que L-Trp, incluyendo todos los compuestos de 5-OH que tenían potenciales de oxidación entre 0,535 y 0,600 V frente a Ag/AgCl. De todos los compuestos sometidos a prueba, el 5-amino-DL-triptófano tuvo el menor potencial de oxidación a 0,410 V, mientras que los compuestos de *N*-acetilo (0,730-0,880 V) y 5-metoxi-DL-triptófano (0,890 V) también estaban por debajo de L-Trp. Siete compuestos tuvieron un potencial de oxidación más alto que L-Trp (tabla 2). Estos fueron ácido indol-3-acético, 5-fluoro-L-triptófano, triptamina, L-triptofanamida, L-cinurenina, 5-nitro-DL-triptófano y ácido salicílico. El ácido salicílico tuvo el potencial de oxidación más alto en este estudio (1,080 V frente a Ag/AgCl). Todos los compuestos sometidos a prueba mostraron VC no reversible, lo que indicaba que, una vez oxidada, la especie no tendía a recibir electrones y probablemente no podría intervenir en otras reacciones electroquímicas.

Tabla 2: Potenciales de oxidación de los excipientes

Compuesto	Potencial de oxidación (V frente a Ag/AgCl)
5-amino-DL-triptófano	0,410
Ácido 5-hidroxiindol-3-acético	0,535
5-hidroxi-L-triptófano	0,565
5-hidroxiindol	0,580
Serotonina HCl (5-hidroxitriptamina HCl)	0,600
Melatonina (<i>N</i> -acetil-5-metoxitriptamina)	0,730
<i>N</i> -acetil-L-triptófano	0,875
<i>N</i> -acetil-L-triptofanamida	0,880
5-metoxi-DL-triptófano	0,890
L-triptófano	0,938

Compuesto	Potencial de oxidación (V frente a Ag/AgCl)
Ácido indol-3-acético	0,948
5-fluoro-L-triptófano	0,965
Triptamina HCl	1,010
L-triptofanamida	1,015
L-cinurenina	1,040
5-nitro-DL-triptófano	1,055
Ácido salicílico	1,080

Se midieron los potenciales de oxidación (pico anódico) usando voltametría cíclica con un electrodo de trabajo de carbono vítreo en perclorato de litio 0,2 M.

Se determinó una correlación entre el potencial de oxidación y la generación de H₂O₂ inducida por la luz para 16 compuestos que tenían potenciales de oxidación por encima y por debajo del potencial de oxidación de L-Trp y niveles de producción de H₂O₂ por encima y por debajo de los de L-Trp (fig. 6). Puesto que el indol y el triptófano se comportaron de manera similar en la producción de H₂O₂ con exposición a la luz, era posible que las sustituciones en la posición C₃ del anillo de 5 miembros no afectaran a esta propiedad. Sin embargo, la triptamina con una sustitución -CH₂CH₂NH₂ y el ácido indol-3-acético con una sustitución CH₂COOH en la posición C₃ produjeron dos veces menos y dos veces más H₂O₂, respectivamente, que L-Trp. Estos datos indicaron que las sustituciones en C₃ desempeñaban un papel en la fotoactivación y en la generación de peróxido. Las sustituciones en C₃ no afectan a los potenciales de oxidación de las moléculas, mientras que el indol *per se* tuvo un potencial de oxidación significativamente menor que L-Trp en estas condiciones experimentales. Las sustituciones en C₅ del anillo aromático de 6 miembros se comportaron de manera bastante predecible. En general, los compuestos con grupos donantes de electrones, tales como -NH₂ y -OH, tuvieron potenciales de oxidación menores que sus compuestos originales y también mostraron niveles bajos de producción de H₂O₂ tras la fotoactivación (por ejemplo, 5-amino-DL-triptófano, ácido 5-hidroxiindol-3-acético, 5-hidroxi-L-triptófano, 5-hidroxiindol, serotonina). De manera similar, los compuestos con un potencial de oxidación alto produjeron más H₂O₂ (5-metoxi-DL-triptófano, L-Trp, ácido indol-3-acético, 5-fluoro-L-triptófano) en estas condiciones. Hubo excepciones a esta correlación; algunos compuestos tuvieron un potencial de oxidación alto, pero no produjeron mucho H₂O₂ (por ejemplo, ácido salicílico y L-cinurenina), lo que indicaba que existían potencialmente otros mecanismos que desempeñaban un papel importante para estos compuestos aromáticos de seis miembros que se podían no haber observado con compuestos que contenían la cadena principal de indol de L-Trp. El área de interés fue el cuadrante que contenía los compuestos con un potencial de oxidación menor y producción de H₂O₂ menor tras la exposición a la luz que L-Trp (fig. 6, recuadro a trazos). Los compuestos con estas dos cualidades se consideraron antioxidantes candidatos nuevos porque podían (1) oxidarse más rápido que Trp en la proteína y (2) producir muy poco H₂O₂ durante el almacenamiento a largo plazo y/o el procesamiento ambiente durante la producción de la especialidad farmacéutica y, por lo tanto, podían proteger a la proteína de la oxidación adicional en estas condiciones.

Ejemplo 3: Los compuestos antioxidantes candidatos redujeron la oxidación de las formulaciones de anticuerpos monoclonales.

Se eligieron compuestos que, en comparación con L-Trp, produjeron menos H₂O₂ tras el tratamiento con luz, así como aquellos con potenciales de oxidación menores que L-Trp para la evaluación de sus posibles propiedades antioxidantes usando AAPH, luz y reacción de Fenton como modelos de agresión oxidativa (tabla 3). Se usó mAb1 como proteína modelo para evaluar la eficacia de los antioxidantes candidatos seleccionados para proteger frente a la oxidación de Trp mediante los diferentes modelos de agresión oxidativa. Cada modelo de agresión producía oxidación a través de un mecanismo diferente y, por lo tanto, cada uno era valioso en la evaluación de la estabilidad biofarmacéutica. Se usa AAPH, o diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano), como modelo de agresión para imitar a los peróxidos de alquilo generados potencialmente a partir de excipientes de formulación, tales como polisorbato degradado. La descomposición de AAPH genera radicales alquilo, alcoxilo y alquilperoxilo que han demostrado que oxidan los residuos de aminoácido en las proteínas, incluyendo residuos de metionina, tirosina y triptófano (Ji *et al.*, *J Pharm Sci* 98(12):4485-500 (2009); Chao *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(7):2969-74 (1997)). De manera similar, se podría usar luz controlada como un modelo de agresión para imitar a la exposición a la luz ambiental que pueden experimentar los fármacos durante el procesamiento y el almacenamiento. La oxidación inducida por la luz de los biofármacos demostró que se desarrollaba a través de un mecanismo con singlete de oxígeno (¹O₂) y/o anión superóxido (O₂⁻) (Sreedhara *et al.*, *Mol. Pharmaceutics* (2013)). La reacción de Fenton también se usa comúnmente como modelo de agresión oxidativa. Esta mezcla de H₂O₂ e iones de Fe genera oxidación a través de un mecanismo con radicales hidroxilo catalizado por metal (Prousek *et al.*, *Pure and Applied Chemistry* 79(12):2325-2338 (2007)) y se usa para modelar el residuo de metal de las superficies de acero inoxidable usadas en la fabricación y el almacenamiento de fármacos.

Tabla 3: Modelos de agresión oxidativa

Modelo de agresión	Mecanismo	Propósito
AAPH	Peróxidos de alquilo, catalizados por radical alquilo	Imitar los peróxidos de alquilo de polisorbato degradado
Luz	Oxígeno singlete (1O_2), anión superóxido (O_2^-), H_2O_2	Imitar la exposición a la luz ambiental durante el procesamiento y el almacenamiento
Fenton (H_2O_2 + Fe)	Radical hidroxilo, catalizado por metal	Imitar el residuo de metal de las superficies de acero inoxidable

5

La oxidación de triptófano (W53) en mAb1 se caracterizó exhaustiva y previamente usando un procedimiento de RP-HPLC y CL-EM (Sreedhara *et al.*, *Mol. Pharmaceutics* (2013)). En resumen, mAb1 se digirió con papaína para generar Fab de la cadena pesada (HC), Fc de HC y fragmentos de la cadena ligera. Los fragmentos se redujeron con DTT, y, después, se separaron e identificaron por medio de cromatografía de líquidos-espectrometría de masas (CL-EM). Se descubrió que las versiones oxidadas de Fab de HC y Fc de HC se eluían antes que sus equivalente naturales. Se usó la comparación del área integrada bajo los picos oxidados y naturales para cuantificar la oxidación de Fab y Fc de HC. Además, CL-EM/EM y la cartografía peptídica (mediante digestión con tripsina y mediante digestión con Lys-C) mostraron que la oxidación de Fab de HC era principalmente de un residuo de Trp, W53, mientras que la oxidación de Fc de HC se atribuía predominantemente a la oxidación de dos residuos de Met, M254 y M430. Usando el procedimiento de RP-HPLC con digestión con papaína en el presente estudio fue posible investigar la oxidación de residuos de Trp cuantificando la oxidación de Fab de HC y la oxidación de residuos de Met cuantificando la oxidación de Fc de HC.

Se calcularon el % de oxidación de Fab y el % de oxidación de Fc como sigue (téngase en cuenta que cada molécula de anticuerpo tiene dos Fab; por lo tanto, el % de oxidación de Fab obtenido no reflejaba el % de anticuerpo inalterado oxidado que contenía la oxidación de Fab):

$$\% \text{ de oxidación de Fab} = 100 \times \frac{\text{Área del pico de Fab oxidado}}{\text{Área del pico de Fab} + \text{área de pico de Fab oxidado}}$$

$$\% \text{ de oxidación de Fc} = 100 \times \frac{\text{Área del pico de Fc oxidado}}{\text{Área de pico de Fc} + \text{área del pico de Fc oxidado}}$$

Para el estudio de agresión lumínica de mAb1, se preparó mAb1 a 5 mg/ml en una formulación de acetato de histidina 20 mM, pH 6,0, trehalosa 250 mM y polisorbato 20 al 0,02 %. Se añadieron antioxidantes a 1 mM (concentración final) a partir de soluciones madre 10 mM preparadas en acetato de histidina 20 mM, pH 6,0, trehalosa 250 mM y polisorbato 20 al 0,02 %. La excepción fue L-Met que se añadió a una concentración final de 1, 10, 25, 50 y 100 mM a partir de una solución madre de L-Met 200 mM en el mismo tampón (es decir, acetato de histidina 20 mM, pH 6,0, trehalosa 250 mM y polisorbato 20 al 0,02 %). Los frascos de vidrio que contenían estas formulaciones se expusieron a luz a 250 W/m² en un instrumento de prueba Atlas SunTest CPS+ Xenon (Chicago, IL) a temperatura ambiente. Los frascos de control se envolvieron en papel metalizado y se trataron de manera similar. Después de la exposición a la luz, se prepararon soluciones para su análisis mediante HPLC de fase inversa como se describe anteriormente.

Para el estudio de agresión con AAPH de mAb1, se preparó mAb1 a 4 mg/ml en una formulación de acetato de histidina 20 mM, pH 6,0, trehalosa 250 mM y polisorbato 20 al 0,02 %. Se añadieron antioxidantes a 1 mM (concentración final) a partir de soluciones madre 10 mM preparadas en acetato de histidina 20 mM, pH 6,0, trehalosa 250 mM y polisorbato 20 al 0,02 %. Se añadieron 200 µl de AAPH 10 mM a 2 ml de cada solución de mAb1 y, después, se incubó a 40 °C durante 24 horas. Después de la incubación, se intercambié el tampón de cada solución con tampón de formulación (acetato de histidina 20 mM, pH 6,0, trehalosa 250 mM y polisorbato 20 al 0,02 %) usando una columna PD-10 de modo que la concentración final de mAb1 era de 2,3 mg/ml. Después del intercambio de tampón, cada solución se preparó para su análisis por HPLC de fase inversa como se describe anteriormente.

Para el estudio de agresión con Fenton de mAb1, se preparó mAb1 a 3 mg/ml en una formulación de clorhidrato de histidina 20 mM, pH 6,0. Se añadieron antioxidantes a una concentración final de 1 mM a partir de soluciones madre 10 mM preparadas en clorhidrato de histidina 20 mM. Se añadieron una concentración final de 0,2 mM de FeCl₃ y 10 ppm de H₂O₂ a cada solución de mAb1 y, después, se incubó a 40 °C durante 3 horas. Después de la incubación, cada reacción se inactivó mediante la adición de L-Met 100 mM (preparada a partir de una solución madre de L-Met

200 mM en clorhidrato de histidina 20 mM) y, a continuación, se preparó para su análisis mediante HPLC de fase inversa como se describe anteriormente.

Se determinó que la incubación de mAb1 con AAPH durante 24 horas a 40 °C daba como resultado un 27 % de oxidación de Fab (residuo de Trp) (fig. 7A) y un 47 % de oxidación de Fc (residuo de Met) (fig. 7B). Se incubaron siete excipientes que se habían cribado previamente usando agresión lumínica y voltametría cíclica con mAb1 en las condiciones de AAPH para evaluar las capacidades antioxidantes. Se descubrió que seis de los siete compuestos reducían significativamente la oxidación de Fab inducida por AAPH (fig. 7A). Los seis compuestos contenían la cadena principal de indol. Además, todos los derivados hidroxilados sometidos a prueba (5-hidroxi-L-Trp, 5-hidroxiindol, 7-hidroxiindol, y serotonina) redujeron la oxidación de Fab a niveles próximos al control (aproximadamente un 2 %). Mientras tanto, el ácido salicílico prácticamente no tuvo ningún efecto en la oxidación de Fab con agresión con AAPH. Ninguno de los excipientes parecía influir en el nivel de oxidación de Fc inducida por AAPH (fig. 7B).

Para el estudio de agresión lumínica, se expuso mAb1 a 16 horas de luz a 250 W/m² mientras se sometieron a prueba los siete excipientes mencionados anteriormente (fig. 8). La exposición de mAb1 a la luz ("sin excipiente") incrementó la oxidación de Fab 3,5 veces frente al nivel del control ("Mat. de ref. de mAb1", fig. 8A). Se demostró previamente que L-Trp podía proteger frente a la oxidación de Trp en la proteína modelo hormona paratiroidea (PTH) Ji *et al.*, *J Pharm Sci* 98(12):4485-500 (2009)). Sin embargo, este estudio descubrió que la adición de L-Trp 1 mM a mAb1 incrementaba la oxidación de Fab más de 11 veces, probablemente a través de la producción de ERO, tal como oxígeno singlete mediante L-Trp expuesto a la luz (fig. 2). La adición de los compuestos hidroxilados (5-hidroxi-L-Trp, 5-hidroxiindol, 7-hidroxiindol, y serotonina) protegió frente a la oxidación de Fab inducida por la luz, reduciendo la oxidación de Fab a niveles próximos al control (fig. 8A). Por otro lado, el ácido salicílico actuó de manera similar a L-triptofanamida, incrementando la oxidación de Fab 8 veces frente al nivel del control. Se observaron resultados similares para la oxidación de Fc con agresión lumínica (fig. 8B). La exposición a la luz de mAb1 dio como resultado un incremento de un 40 % en la oxidación de Fc frente al nivel del control, mientras que la adición de L-Trp incrementó la oxidación de Fc a 7 veces el nivel del control. En comparación con el control (sin excipiente), la L-triptofanamida y el ácido salicílico también dieron como resultado más oxidación de Fc. Los compuestos hidroxilados produjeron una oxidación de Fc similar al control sin excipiente potencialmente porque producían muchas menos ERO que L-Trp con exposición a la luz. El cribado lumínico y los resultados del estudio con NaN₃ en el ejemplo 2 mostraron una buena correlación entre la cantidad de H₂O₂ generado mediante un excipiente y la oxidación de Met en Fc de mAb1.

La reacción de Fenton, usando una mezcla de H₂O₂ e iones de Fe, genera oxidación a través de una reacción con radicales hidroxilo catalizada por metal (Prousek *et al.*, *Pure and Applied Chemistry* 79(12):2325-2338 (2007)). Esta reacción generó la oxidación de Fab, es decir, triptófano, en mAb1. La reacción también se llevó a cabo en presencia de antioxidantes seleccionados que fueron útiles frente AAPH y la oxidación inducida por la luz como se informa anteriormente. Se analizaron los datos relacionados con las propiedades antioxidantes frente a la reacción mediada de Fenton usando el ensayo de RP-HPLC como se describe anteriormente (fig. 9). En las condiciones sometidas a ensayo, la reacción de Fenton produjo aproximadamente cuatro veces la oxidación en la región Fab de mAb1 frente al control. La mayoría de los antioxidantes sometidos a prueba, salvo el ácido salicílico, mostraron propiedades de inactivación de radicales hidroxilo similares con respecto a L-Trp, lo que protegía la oxidación de Fab en aproximadamente un 25 % con respecto al caso sin excipiente (figura 9A). Con respecto a la protección frente a la oxidación de Fc, los excipientes sometidos a prueba (distintos del ácido salicílico) se comportaron ligeramente mejor que L-Trp (fig. 9B).

Las sustituciones de donación de electrones en el anillo aromático pueden facilitar la formación del catión radical indolilo y una reactividad potencialmente más rápida con los radicales. Los grupos hidroxilo enlazados a los anillos aromáticos son donantes de electrones, ya que el átomo de oxígeno tiene un par de electrones solitarios que pueden estar implicados en la estructura resonante que da lugar a potenciales de oxidación menores y potencialmente más sensibilidad al ataque electrófilo. Como se ve en la tabla 2, las sustituciones con hidroxilo dieron lugar a potenciales de oxidación sustancialmente menores, lo que indica que estos compuestos podrían producir mejores antioxidantes que el L-Trp y/o el indol. Los derivados de indol sustituido con hidroxilo y de Trp también produjeron la menor cantidad de peróxido de hidrógeno tras la irradiación con luz (tabla 1). Esto se podía haber debido a la baja eficacia cuántica de estas moléculas en la transferencia de energía lumínica al oxígeno molecular, junto con sus altas constantes de inactivación como se demuestra para 5-hidroxi-L-triptófano (Dad *et al.*, *J Photochem Photobiol B*, 78(3):245-51 (2005)). Como se muestra en las fig. 7 y fig. 8, los derivados de indol sustituido con hidroxilo y de triptófano proporcionaron una protección considerable frente a la oxidación inducida por AAPH, luz y Fenton en W53 en la región Fab de mAb1. Sin embargo, ninguno de estos compuestos proporcionó una protección antioxidante sustancial frente a la oxidación de Met en la región Fc de mAb1 en la degradación inducida por AAPH. Por el contrario, los derivados de indol y de triptófano se comportaron como se esperaba con la oxidación mediada por la luz. Las moléculas que produjeron cantidades más altas de peróxido tras la fotoactivación (por ejemplo, L-Trp y Trp-amida) también produjeron una oxidación de Met más alta en la región Fc de mAb1, mientras que los derivados de -OH produjeron menos H₂O₂ y también menor de oxidación de Met en la región Fc en condiciones de fotooxidación. La metionina se oxidó fácilmente a sulfóxido de metionina mediante H₂O₂ y peróxidos de alquilo a través de una reacción de sustitución nucleófila (Li *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering*

48:490-500 (1995)). La fotooxidación de metionina a sulfóxido de metionina se produce por medio de oxígeno singlete, aunque esta reacción se produce por medio de un producto intermedio diferente (Li *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 48:490-500 (1995)). AAPH se degrada con agresión térmica para dar tanto peróxidos de alquilo como radicales alcoxilo que tienen diferente reactividad frente a Met y Trp, respectivamente (Werber *et al.*, *J Pharm Sci* 100(8):3307-15 (2011)). Los estudios previos han demostrado que L-Trp podría prevenir la oxidación de Trp en PTH inducida por AAPH y que L-Trp no previno la oxidación de Met en PTH en las mismas condiciones (Ji *et al.*, *J Pharm Sci* 98(12):4485-500 (2009)). De manera similar, L-Met podría proteger a PTH frente a la oxidación inducida por AAPH, pero no protegió la oxidación de Trp. Estas observaciones estaban en línea con los mecanismos de reacción en los que la oxidación de Met es predominantemente por medio de reacciones de sustitución nucleófila, mientras que la oxidación de Trp es principalmente por medio de mecanismos de radicales libres.

En la fig. 10 se muestra un supuesto mecanismo de fotoactivación de L-Trp que da lugar al oxígeno singlete y finalmente a H₂O₂ y a la formación e inactivación del oxígeno singlete mediante 5-HT.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación líquida que comprende una proteína y un compuesto que previene la oxidación de la proteína en la formulación líquida, en la que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 5-hidroxitriptófano, 5-hidroxiindol, 7-hidroxiindol, y serotonina, y en la que la proteína es un anticuerpo.
2. La formulación de la reivindicación 1, que es acuosa.
- 10 3. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que el compuesto en la formulación es desde 0,3 mM a 5 mM.
4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el compuesto en la formulación es 1 mM.
- 15 5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el compuesto previene la oxidación de triptófano y/o metionina en la proteína.
6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el compuesto previene la oxidación de la proteína mediante una especie reactiva del oxígeno.
- 20 7. La formulación de la reivindicación 6, en la que la especie reactiva del oxígeno se selecciona del grupo que consiste en oxígeno singlete, un superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno, un radical hidroxilo y un peróxido de alquilo.
- 25 8. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que la proteína es sensible a la oxidación.
9. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que el triptófano en la proteína es sensible a la oxidación.
- 30 10. La formulación de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un fragmento de anticuerpo.
- 35 11. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la concentración de proteínas en la formulación es de 1 mg/ml a 250 mg/ml.
12. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-11, que comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en un estabilizante, un tampón, un tensioactivo y un agente de tonicidad.
- 40 13. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 3-12, en la que la formulación tiene un pH de 4,5 a 7,0.
- 45 14. Un procedimiento de prevención de la oxidación de una proteína en una formulación líquida que comprende añadir una cantidad de un compuesto que previene la oxidación de la proteína a la formulación líquida, en el que el compuesto se selecciona del grupo que consiste en 5-hidroxitriptófano, 5-hidroxiindol, 7-hidroxiindol, y serotonina, y en el que la proteína es un anticuerpo.

Figura 1

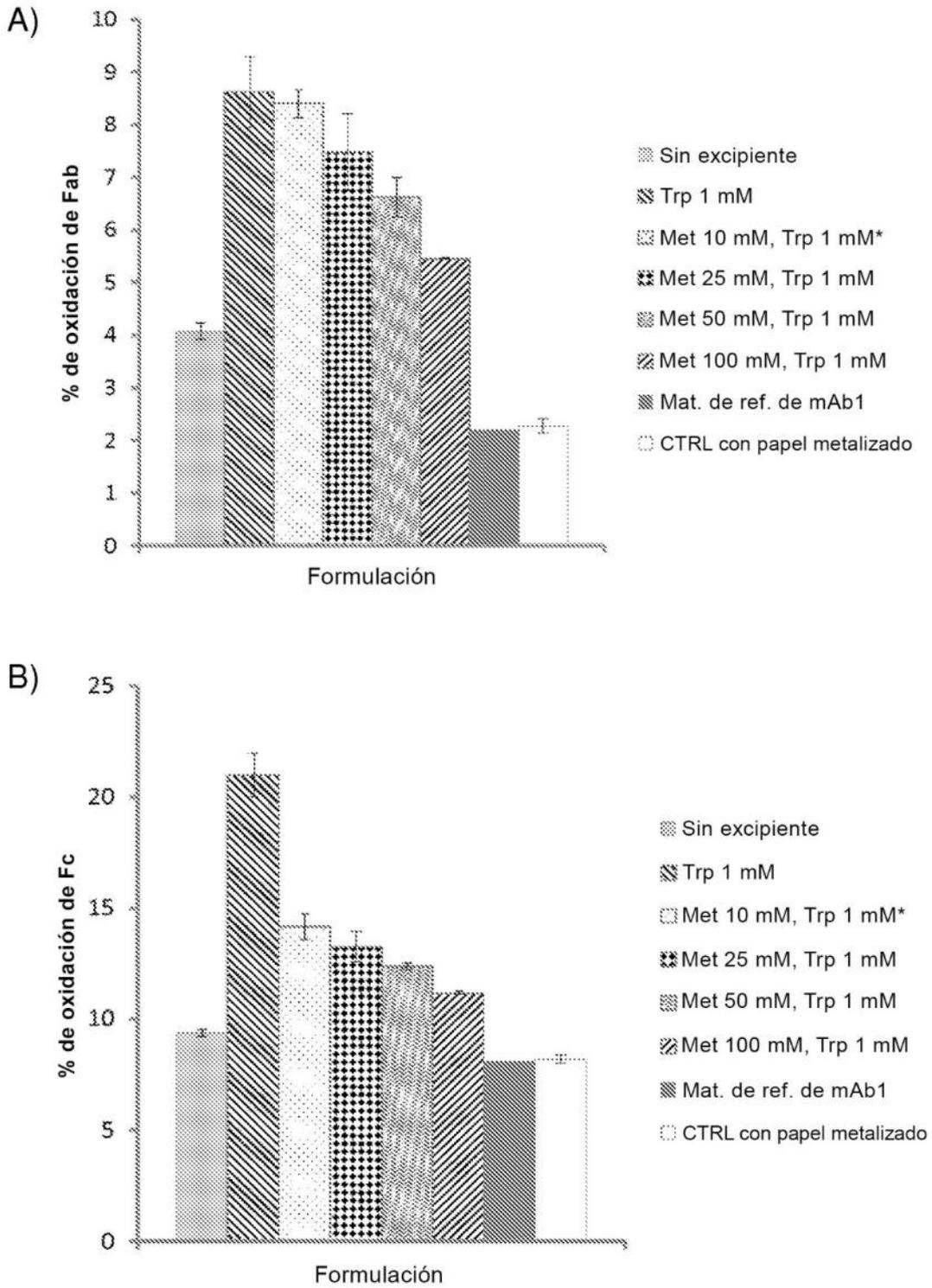


Figura 2

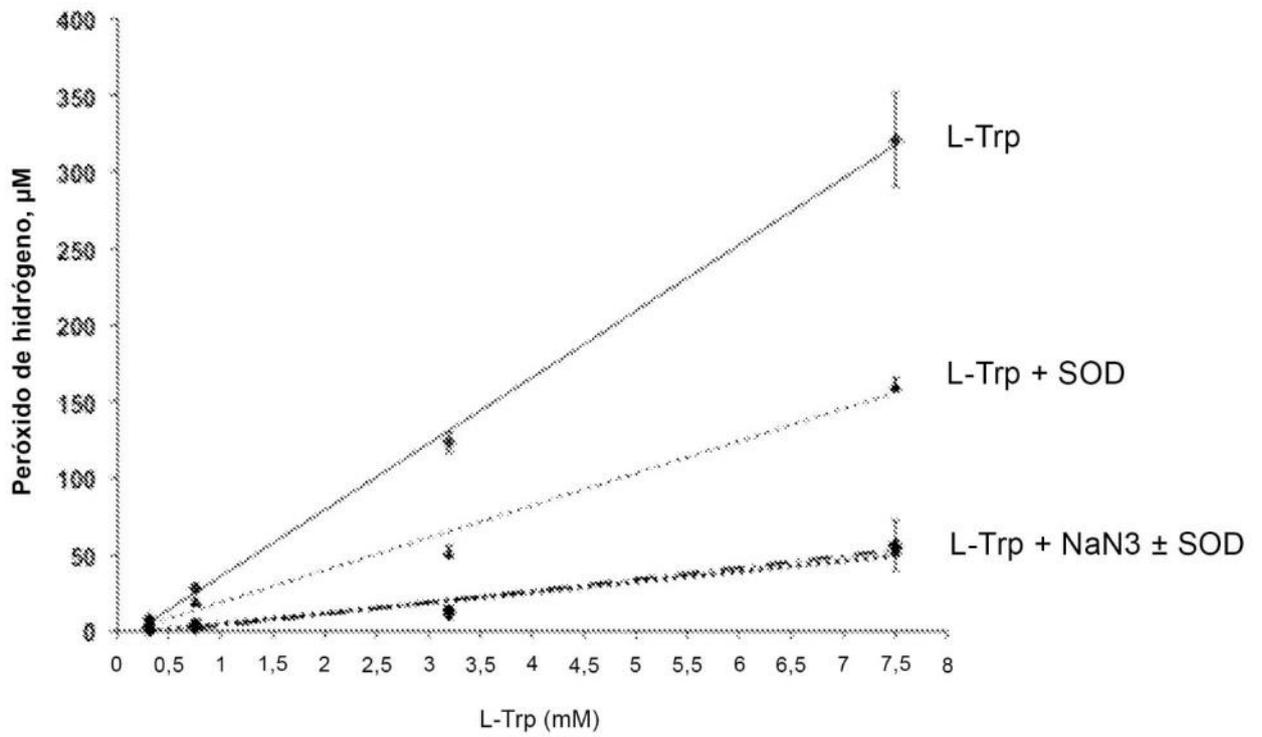


Figura 3

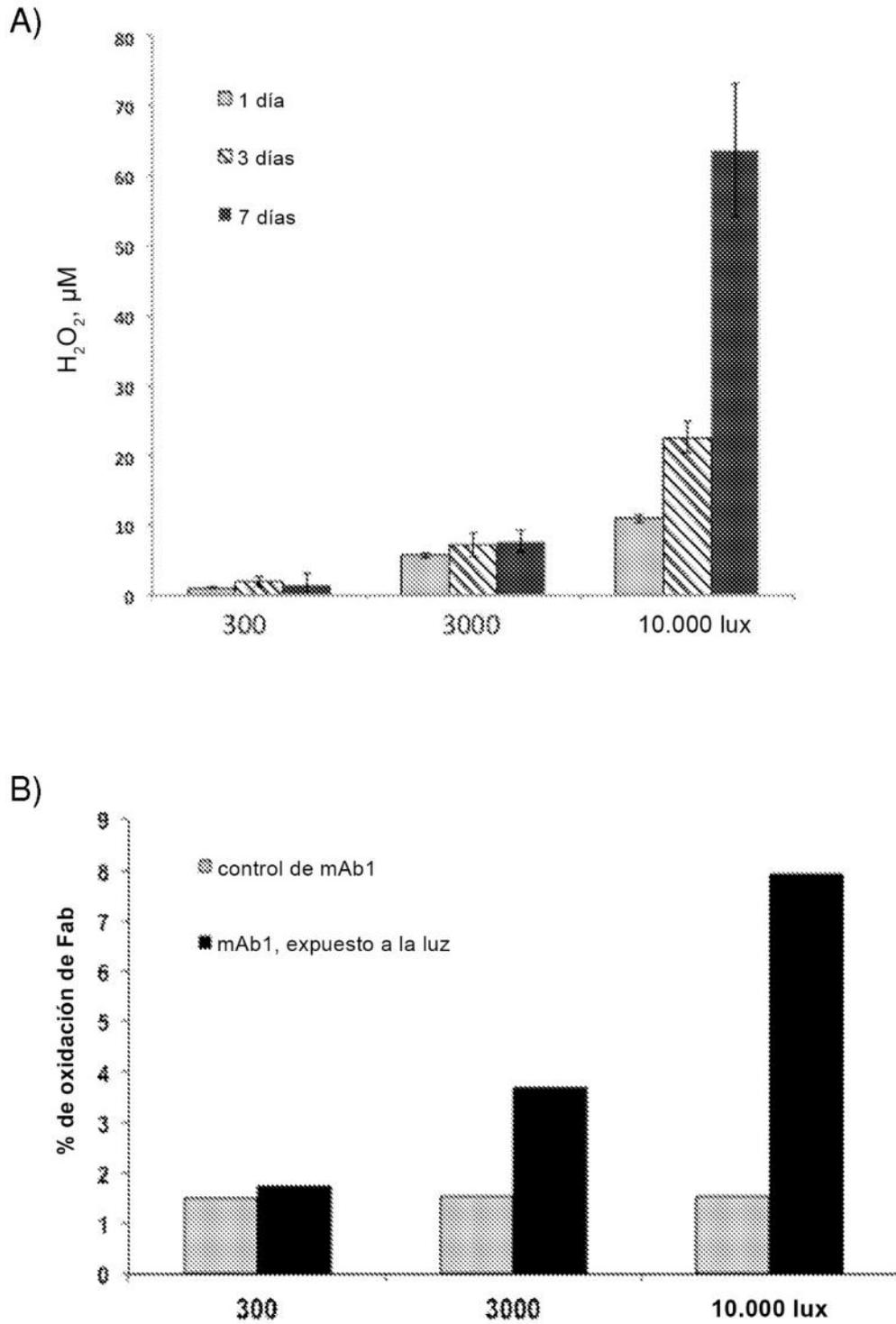


Figura 4

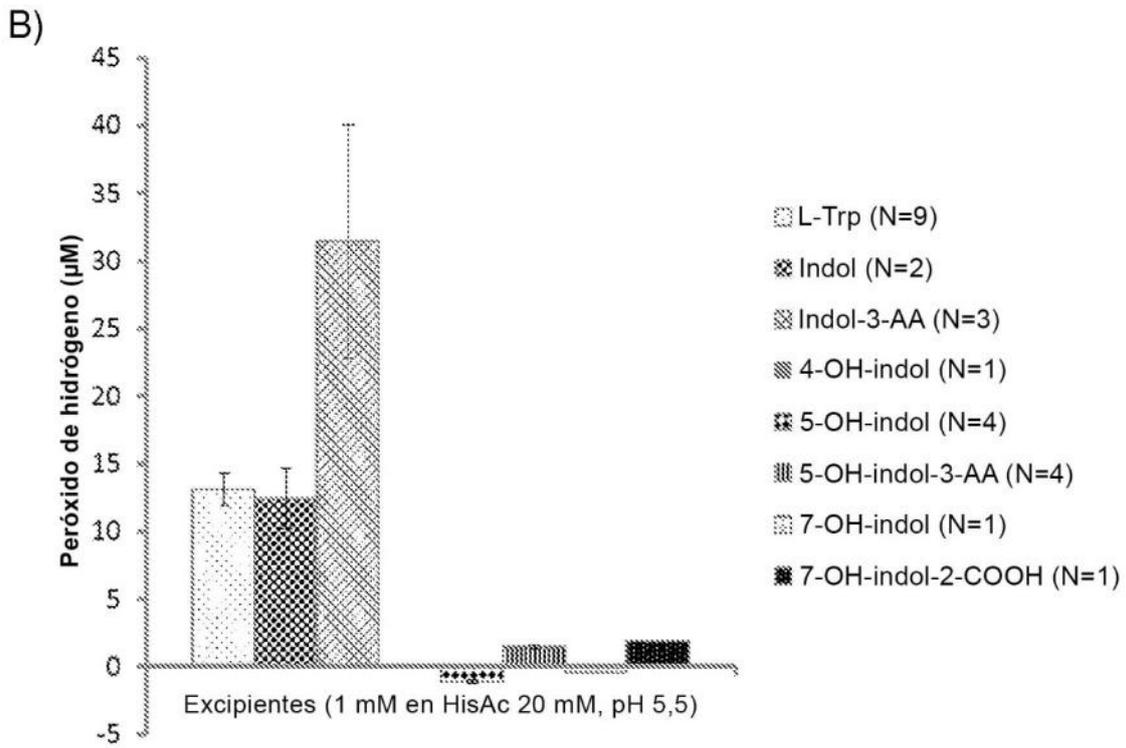
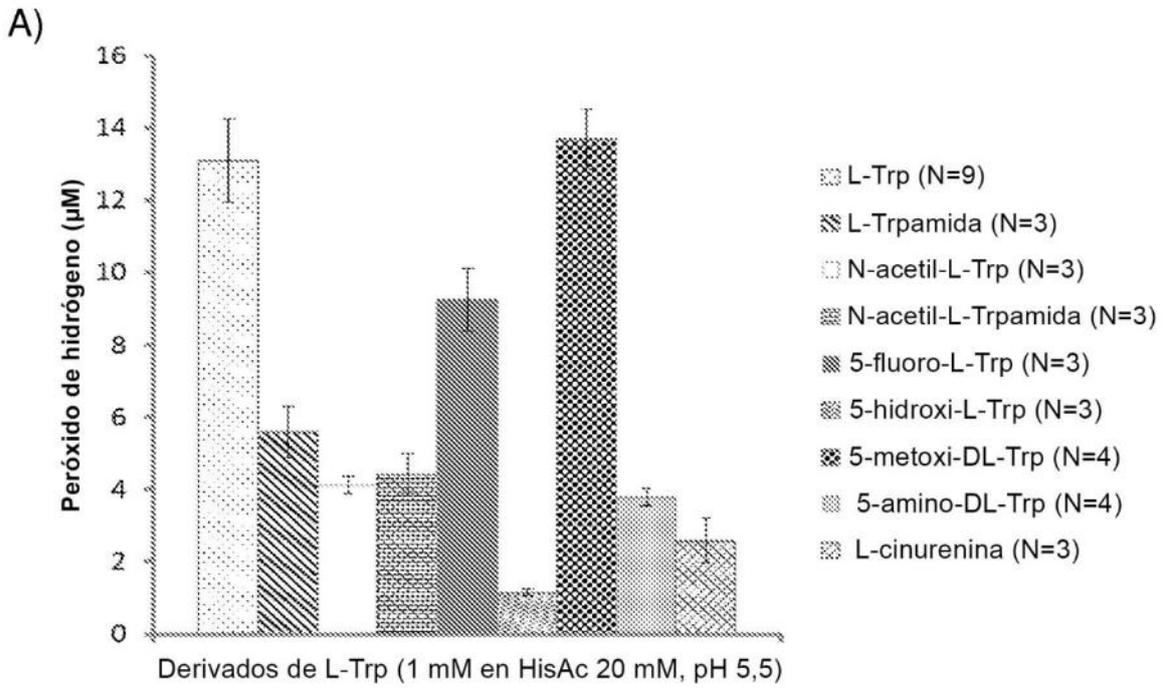


Figura 5

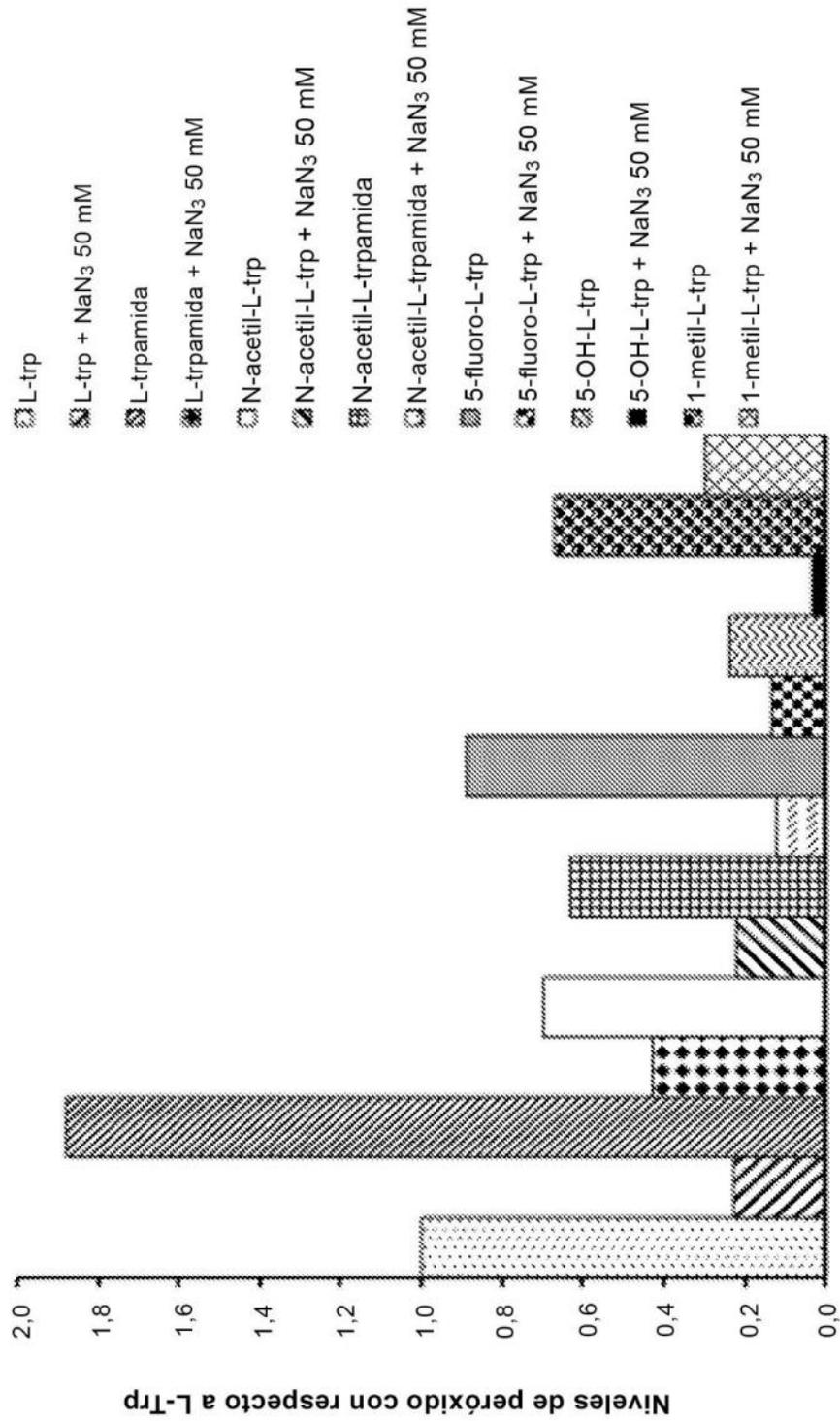


Figura 6

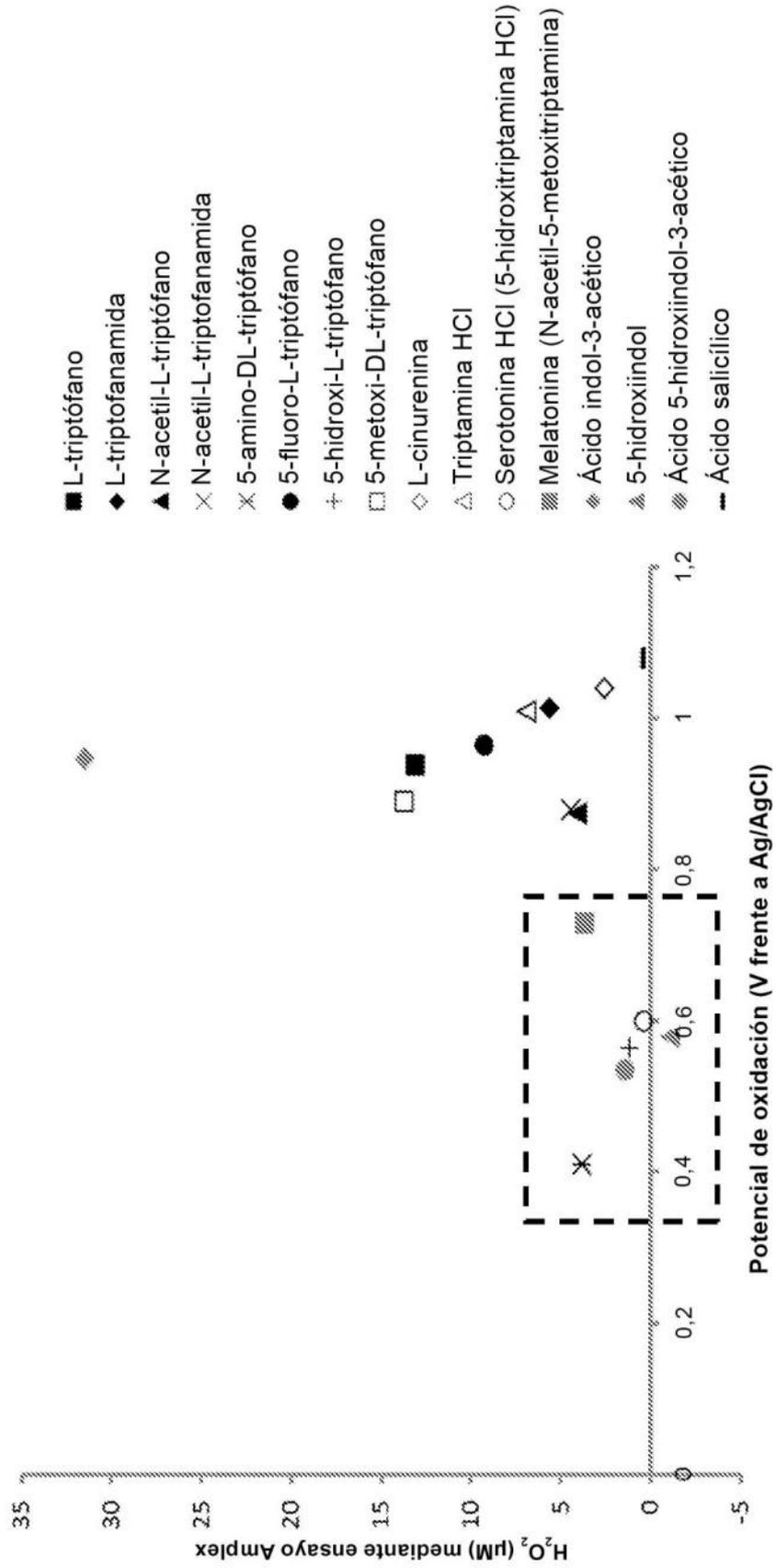


Figura 7

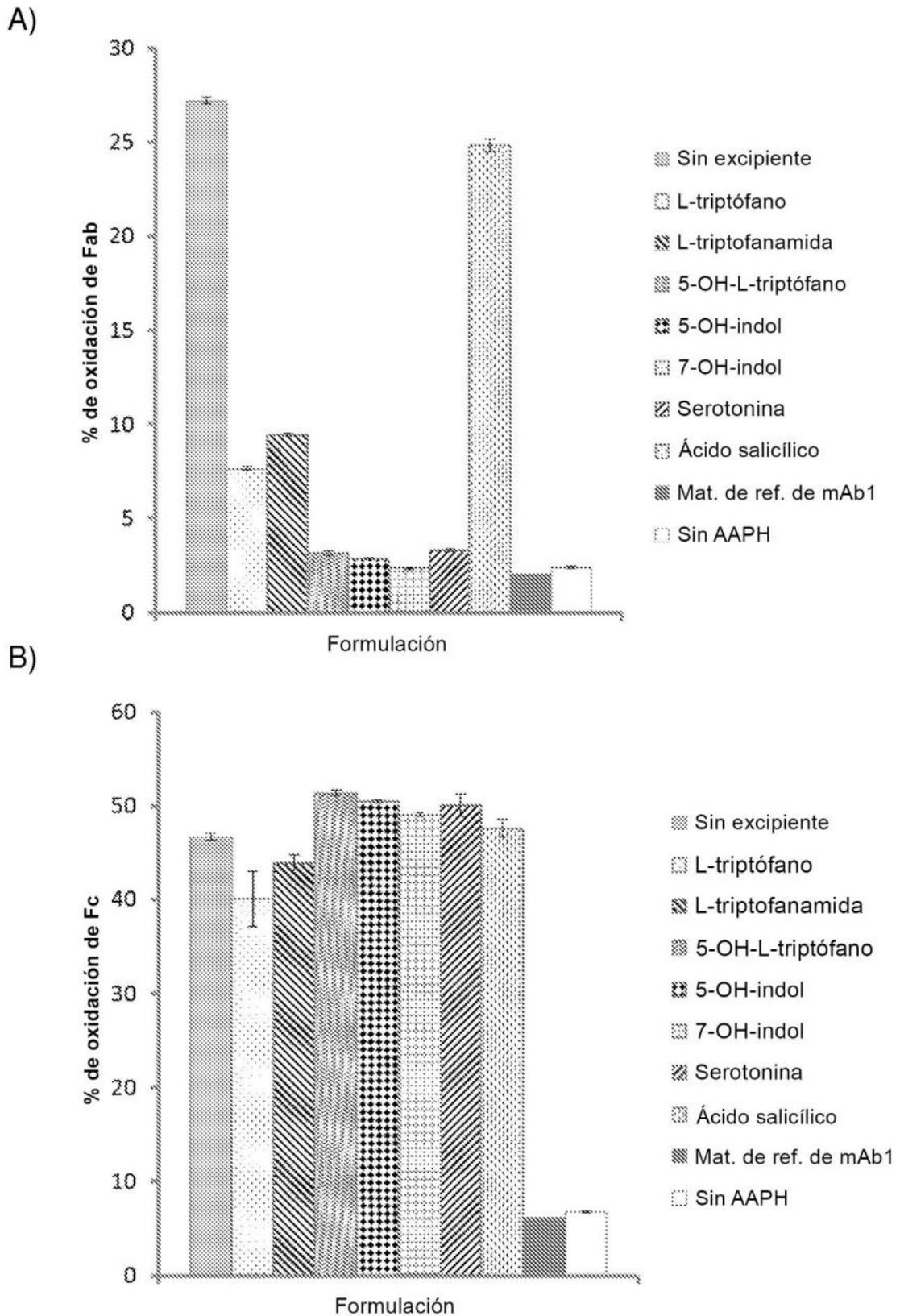


Figura 8

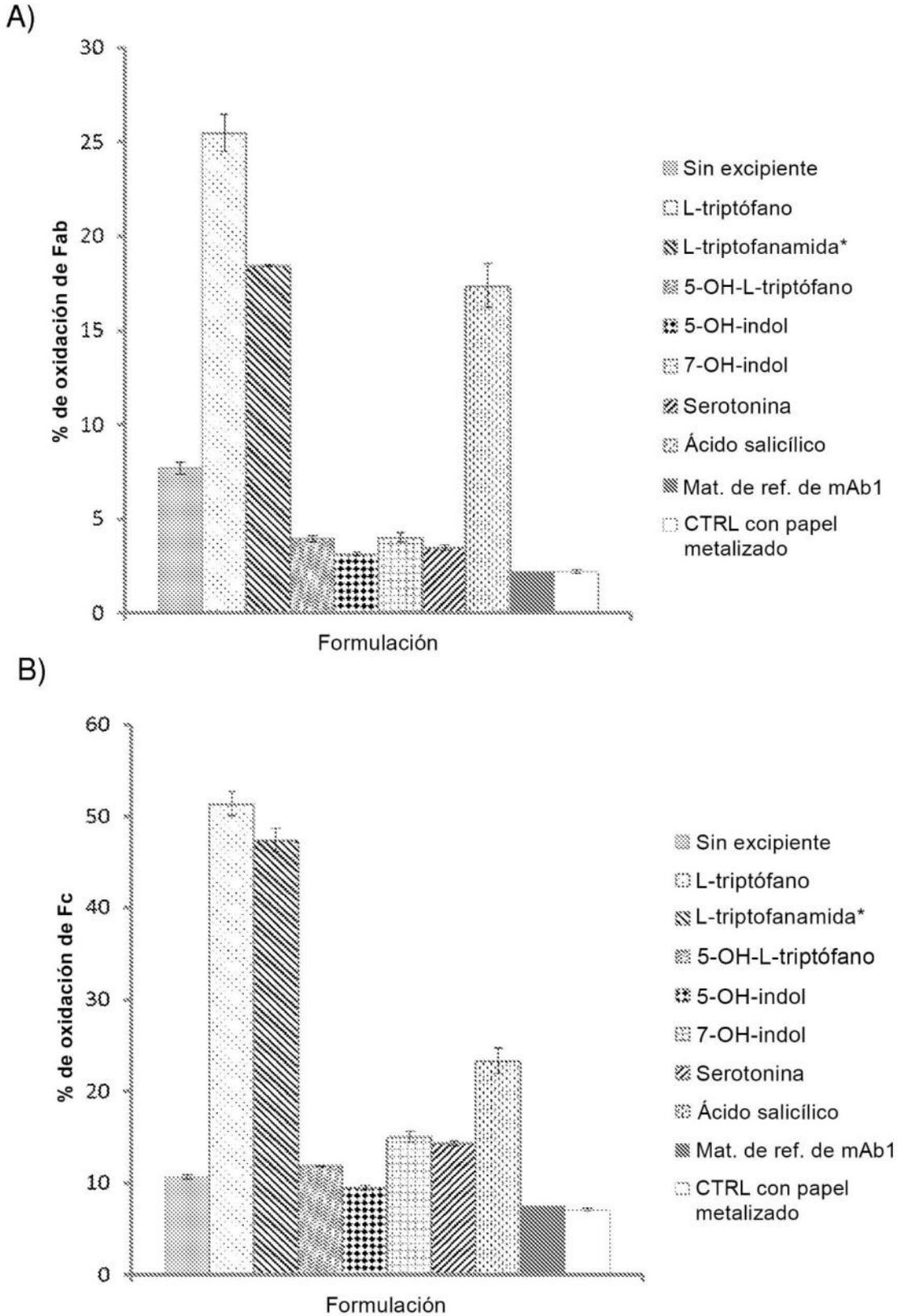
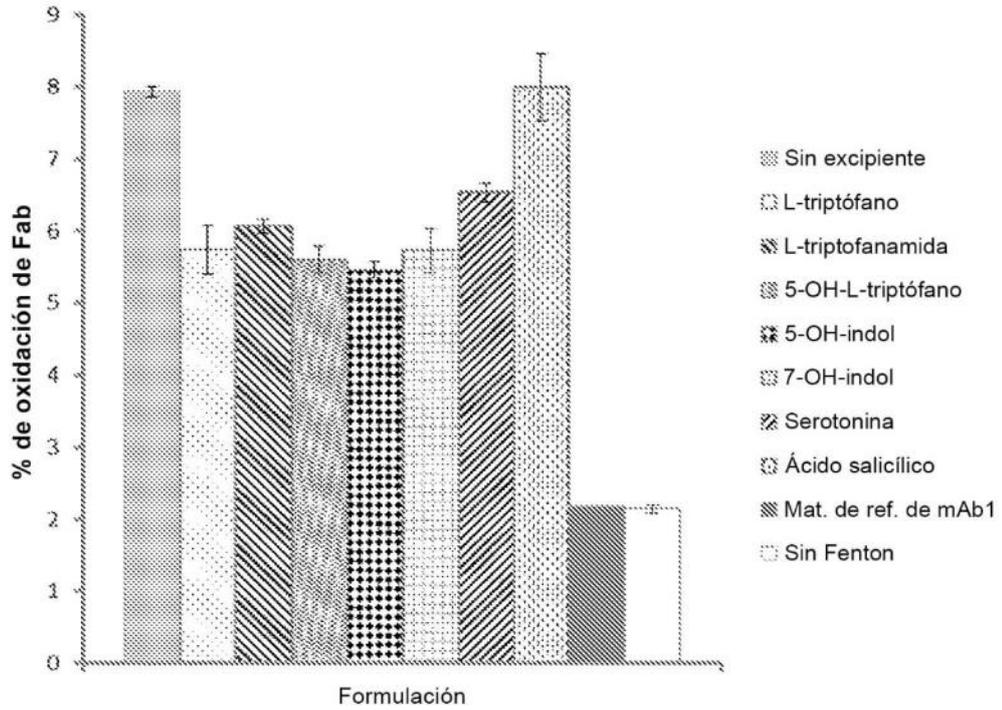


Figura 9

A)



B)

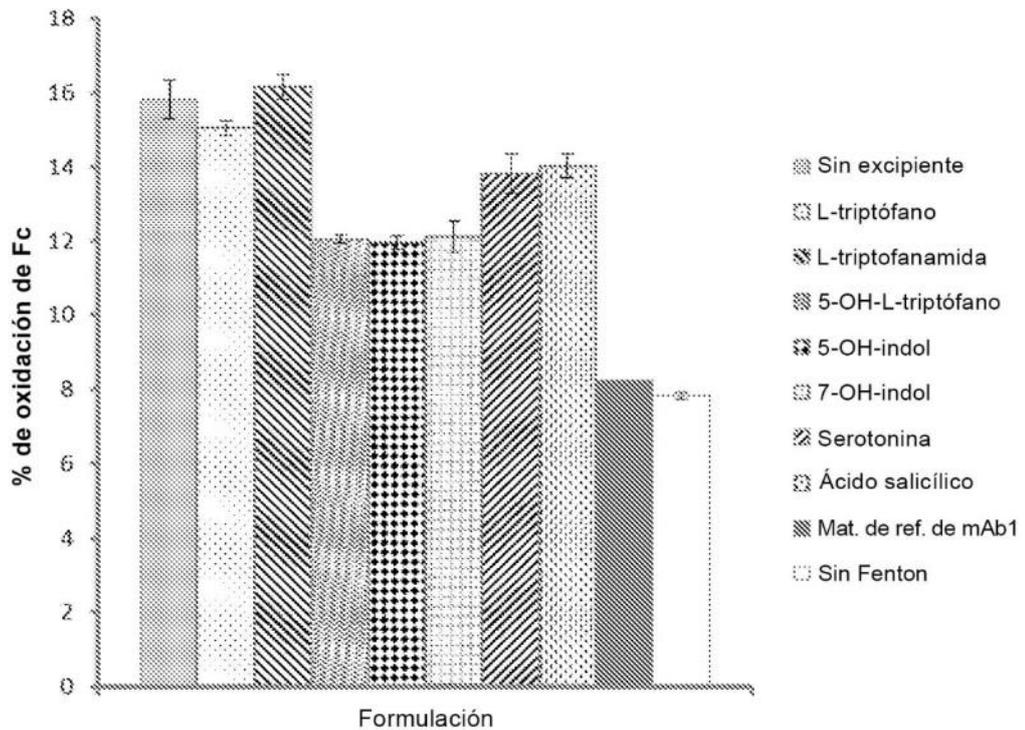
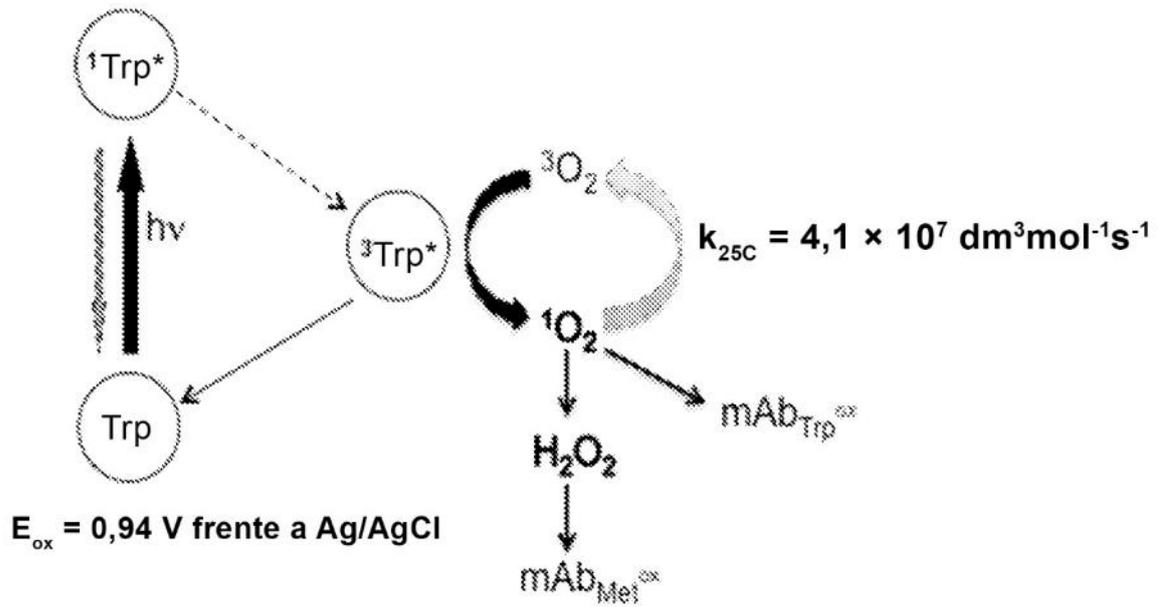


Figura 10

A)



B)

