

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 722 201**

51 Int. Cl.:

A61K 38/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/20 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/42 (2006.01)
G01N 1/00 (2006.01)
A61K 47/10 (2007.01)
A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.03.2011 PCT/US2011/029206**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **29.09.2011 WO11119487**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.03.2011 E 11711232 (6)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.02.2019 EP 2550018**

54 Título: **Composiciones y procedimientos útiles para estabilizar formulaciones que contienen proteínas**

30 Prioridad:

22.03.2010 US 316326 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
08.08.2019

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**JI, JUNYAN;
LIU, JUN y
WANG, YUCHANG JOHN**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 722 201 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

Composiciones y procedimientos útiles para estabilizar formulaciones que contienen proteínas

5 SOLICITUDES RELACIONADAS

La presente solicitud es una solicitud no provisional presentada conforme al párrafo 1.53(b)(1) del título 37 del CFR, que reivindica prioridad conforme al párrafo 119(e) del título 35 del USC con respecto al número de solicitud provisional 61/316326 presentada el 22 de marzo de 2010, cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia.

10 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere al uso de compuestos no tensioactivos que incluyen, por ejemplo, polioxietileno (POE) sorbitanos y polietilenglicoles (PEG), para estabilizar formulaciones que contienen proteínas y para la prevención de la agregación de proteínas en dichas formulaciones.

15 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

20 Cuando se necesita un estabilizante para una formulación de proteína para proteger una proteína de la desnaturalización tras agitación energética, agitación, cizallamiento y congelación/descongelación, o en estado inactivo en la interfase, a menudo se usa un detergente no iónico (es decir, un tensioactivo) (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.183.746). Esto se ejemplifica por el uso de polisorbatos en muchos productos que contienen proteínas. Por ejemplo, los polisorbatos 20 y 80 (Tween® 20 y Tween® 80) se usan en la formulación de productos bioterápicos tanto para prevenir la adsorción superficial y como estabilizantes frente a la agregación de proteínas (Kerwin, J. Pharm. Sci. 97(8):2924-2936 (2008)). Los polisorbatos son tensioactivos anfipáticos, no iónicos, compuestos de ésteres de ácidos grasos de polioxietileno (POE) sorbitano, siendo monolaurato de polioxietileno sorbitano para polisorbato 20 y monooleato de polioxietileno sorbitano para polisorbato 80.

30 Desafortunadamente, sin embargo, los polisorbatos pueden experimentar degradación por medio de oxidación o bien hidrólisis. Cuando una molécula de polisorbato se degrada, genera diversos subproductos de degradación que incluyen, por ejemplo, ácidos grasos, POE sorbitano, PEG, ésteres de PEG y ácidos de alquilo. Algunos de estos subproductos de degradación de polisorbato, incluyendo los ácidos grasos libres, pueden provocar un incremento de la turbidez y agregación de proteínas en formulaciones que contienen proteínas. Por lo tanto, si bien los polisorbatos se usan comúnmente como estabilizantes de proteínas, los ácidos grasos y otros subproductos de degradación liberados de la degradación de polisorbato a lo largo del tiempo pueden tener un impacto adverso sobre el efecto protector que presentan los polisorbatos en las formulaciones que contienen proteínas.

35 Como tal, existe una necesidad de obtener composiciones adicionales útiles para prevenir la agregación de proteínas en formulaciones acuosas que contienen proteínas.

40 SUMARIO DE LA INVENCION

45 La presente invención se basa en el descubrimiento novedoso de que los polioxietileno (POE) sorbitanos y los polietilenglicoles (PEG) presentes en determinadas concentraciones en formulación acuosa son útiles para estabilizar las formulaciones que contienen proteínas y péptidos y para la prevención de la agregación de proteínas en dichas formulaciones.

50 En consecuencia, en un aspecto, la invención se refiere a una composición de materia que comprende un anticuerpo u otra proteína o péptido, y un POE sorbitano. En un modo de realización, el polioxietileno sorbitano está presente en una concentración de desde aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 100.000 ppm. En otro modo de realización, la composición de materia que comprende el anticuerpo u otra proteína o péptido y un POE sorbitano, está libre de tensioactivos no iónicos, por ejemplo, libre de polisorbato. Opcionalmente, la composición de materia también puede estar libre de lioprotectores tales como, por ejemplo, glúcidos, aminoácidos libres y variantes de los mismos, etc. En determinados modos de realización, la composición de materia puede estar en forma acuosa o sólida.

60 En otro aspecto, la invención se refiere a una composición de materia que comprende un anticuerpo u otra proteína o péptido, y un polietilenglicol. En determinados modos de realización, el polietilenglicol está presente en dicha composición de materia en una concentración menor que aproximadamente 10.000 ppm. La composición de materia también puede estar opcionalmente libre de tensioactivos no iónicos, por ejemplo, libre de polisorbato. Opcionalmente, la composición de materia también puede estar libre de lioprotectores tales como, por ejemplo, glúcidos, aminoácidos libres y variantes de los mismos, etc. En determinados modos de realización, la composición de materia puede estar en forma acuosa o sólida.

65 En otro aspecto, la invención se refiere a un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene

cualquiera de las composiciones de materia descritas en el presente documento.

En otro aspecto, se proporciona un procedimiento para preparar una composición que contiene un anticuerpo estabilizado (u otra proteína o péptido) mezclando un anticuerpo u otra proteína conjuntamente con un POE sorbitano.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un procedimiento de incremento de la estabilidad de un anticuerpo u otra proteína o péptido en una formulación acuosa, que comprende mezclar el anticuerpo u otra proteína o péptido, con una cantidad estabilizante de un POE sorbitano, en el que el POE sorbitano incrementa la estabilidad del anticuerpo u otra proteína o péptido.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un procedimiento de incremento de la estabilidad de un anticuerpo en una formulación acuosa, u otra proteína o péptido, que comprende mezclar el anticuerpo, u otra proteína o péptido, con una cantidad estabilizante de un polietilenglicol, en el que el polietilenglicol incrementa la estabilidad del anticuerpo u otra proteína o péptido. En un modo de realización, el polietilenglicol está presente en una concentración menor que aproximadamente 10.000 ppm, preferentemente entre aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 10.000 ppm. En otro modo de realización, la composición de materia comprende opcionalmente al menos un POE sorbitano, y puede estar opcionalmente libre de tensioactivos no iónicos, por ejemplo, libre de polisorbato o lioprotectores tales como, por ejemplo, glúcidos, aminoácidos libres y variantes de los mismos, etc.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un procedimiento de prevención o reducción de la agregación de un anticuerpo, u otra proteína o péptido, en una formulación acuosa que comprende mezclar el anticuerpo, u otra proteína o péptido, con un POE sorbitano. La formulación acuosa está opcionalmente libre de tensioactivos no iónicos, por ejemplo, libre de polisorbato o lioprotectores tales como, por ejemplo, glúcidos, aminoácidos libres y variantes de los mismos, etc. En otro modo de realización, se induce la agregación del anticuerpo u otra proteína por agitación de la solución acuosa.

En otro aspecto, la presente invención está dirigida a un procedimiento de prevención o reducción de la agregación de un anticuerpo, u otra proteína o péptido, en una formulación acuosa que comprende mezclar el anticuerpo, u otra proteína o péptido, con un polietilenglicol. En un modo de realización, el polietilenglicol está presente en una concentración menor que aproximadamente 10.000 ppm, preferentemente entre aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 10.000 ppm. En otro modo de realización, la formulación acuosa comprende opcionalmente al menos un POE sorbitano, que puede estar presente opcionalmente en una concentración de desde aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 100.000 ppm, y puede estar opcionalmente libre de tensioactivos no iónicos, por ejemplo, libre de polisorbato, o lioprotectores tales como, por ejemplo, glúcidos, aminoácidos libres y variantes de los mismos, etc. En otro modo de realización, se induce la agregación del anticuerpo u otra proteína por agitación de la solución acuosa.

En un procedimiento de purificación de una proteína, péptido o anticuerpo de proteínas de células recombinantes u otras proteínas contaminantes, un modo de realización de la invención se refiere a la mejora que comprende añadir un POE sorbitano o polietilenglicol a la proteína, péptido o anticuerpo durante el procedimiento de purificación.

Otro aspecto de la invención es un procedimiento de fabricación de soluciones acuosas no agregadas de anticuerpos u otras proteínas o péptidos de otro modo autoagregantes mezclando al menos un POE sorbitano o polietilenglicol en una solución acuosa que comprende el anticuerpo u otra proteína o péptido autoagregante y a continuación concentrar la solución acuosa.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y ejemplos que no se deben interpretar como limitantes. El contenido de todas las referencias, patentes y solicitudes de patente publicadas citadas a través de toda la presente solicitud se incorporan expresamente en el presente documento por referencia.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra los resultados obtenidos de un análisis de turbidez de un anticuerpo anti-IL13 en combinación con diversos aditivos que incluyen polisorbato 20 (PS), ácido láurico (LA) o POE sorbitano 20 (POE).

La figura 2 muestra los resultados obtenidos de un análisis de concentración de proteína de un anticuerpo anti-IL13 en combinación con diversos aditivos que incluyen POE sorbitano 20, PEG 1000 o PEG 6000, todos en diversas concentraciones.

La figura 3 muestra los resultados obtenidos de un análisis de concentración de proteína de un anticuerpo anti-IgE en combinación con diversos aditivos que incluyen POE sorbitano 20, PEG 1000 o PEG 6000, todos en diversas concentraciones.

La figura 4 muestra los resultados obtenidos de un análisis de turbidez de un anticuerpo anti-IL13 en combinación con diversos aditivos que incluyen POE sorbitano 20, PEG 1000 o PEG 6000, todos en diversas concentraciones.

5 La figura 5 muestra los resultados obtenidos de un análisis de turbidez de un anticuerpo anti-IgE en combinación con diversos aditivos que incluyen POE sorbitano 20, PEG 1000 o PEG 6000, todos en diversas concentraciones.

10 La figura 6 muestra los resultados obtenidos de un análisis de tamaño de partícula (partículas mayores que 2 μm) de un anticuerpo anti-IL13 en combinación con diversos aditivos que incluyen POE sorbitano 20, PEG 1000 o PEG 6000, todos en diversas concentraciones.

15 La figura 7 muestra los resultados obtenidos de un análisis de tamaño de partícula (partículas mayores que 2 μm) de un anticuerpo anti-IgE en combinación con diversos aditivos que incluyen POE sorbitano 20, PEG 1000 o PEG 6000, todos en diversas concentraciones.

20 La figura 8 muestra los resultados obtenidos de un análisis de tamaño de partícula (partículas mayores que 10 μm) de un anticuerpo anti-IL13 en combinación con diversos aditivos que incluyen POE sorbitano 20, PEG 1000 o PEG 6000, todos en diversas concentraciones.

25 La figura 9 muestra los resultados obtenidos de un análisis de tamaño de partícula (partículas mayores que 10 μm) de un anticuerpo anti-IgE en combinación con diversos aditivos que incluyen POE sorbitano 20, PEG 1000 o PEG 6000, todos en diversas concentraciones.

30 La figura 10 muestra los resultados obtenidos de un análisis de tamaño de partícula (partículas mayores que 50 μm) de un anticuerpo anti-IL13 en combinación con diversos aditivos que incluyen POE sorbitano 20, PEG 1000 o PEG 6000, todos en diversas concentraciones.

35 La figura 11 muestra los resultados obtenidos de un análisis de tamaño de partícula (partículas mayores que 50 μm) de un anticuerpo anti-IgE en combinación con diversos aditivos que incluyen POE sorbitano 20, PEG 1000 o PEG 6000, todos en diversas concentraciones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DEL MODO DE REALIZACIÓN PREFERENTE

La presente invención se puede entender más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de modos de realización específicos y los ejemplos incluidos en la misma.

35 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido habitualmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento se pueden usar en la práctica o pruebas de la invención, ahora se describen los procedimientos y materiales preferentes. Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan en el presente documento por referencia en su totalidad.

40 La agregación de anticuerpos y otras proteínas está provocada principalmente por las interacciones hidrófobas que finalmente dan lugar a la desnaturalización. Cuando la región hidrófoba de una proteína parcial o totalmente desplegada se expone al agua, esto crea una situación termodinámicamente desfavorable debido al hecho de que el interior hidrófobo normalmente oculto está expuesto ahora a un entorno acuoso hidrófilo. En consecuencia, la disminución en la entropía de las moléculas de agua estructurantes alrededor de la región hidrófoba obliga a la proteína desnaturalizada a agregarse, principalmente a través de las regiones hidrófobas expuestas. Por tanto, la solubilidad de la proteína también se puede ver comprometida. En algunos casos, se puede producir la autoasociación de subunidades de proteínas, naturales o bien mal plegadas, bajo determinadas condiciones y esto puede dar lugar a precipitación y pérdida de actividad.

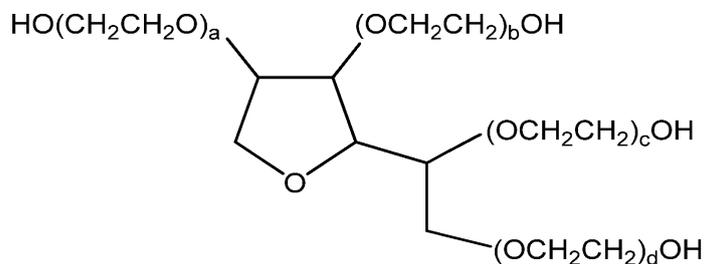
45 Los factores que afectan la agregación de proteínas en solución en general incluyen la concentración de proteína, pH, temperatura, otros excipientes y tensión mecánica. Algunos factores (por ejemplo, la temperatura) se pueden controlar más fácilmente durante la purificación, formulación, fabricación, almacenamiento y uso que otros (por ejemplo, tensión mecánica). Los estudios de formulación dictarán la(s) elección/elecciones apropiada(s) de pH y excipientes que no inducirán la agregación y/o, de hecho, ayudarán en la prevención de la agregación. La concentración de proteína está dictada por la dosis terapéutica requerida y, dependiendo de cuál sea esta concentración, determinará si existe el potencial de estados asociados más altos (dímeros, tetrámeros, etc.), que a continuación pueden dar lugar a agregación en solución. Se deben realizar estudios cuidadosos durante el desarrollo de la formulación para determinar qué factores influyen en la agregación de proteínas y a continuación cómo se pueden eliminar o controlar estos factores.

50 El deseo de identificar preparaciones de solución estables de un anticuerpo u otra proteína para su uso en administración parenteral u otra puede dar lugar al desarrollo de una metodología de prueba para evaluar el impacto de diversos aditivos sobre la estabilidad física. En base a los factores conocidos que influyen en la

agregación de proteínas y los requisitos de dichas aplicaciones, se puede evaluar la estabilidad física usando procedimientos mecánicos que implican la agitación o rotación de soluciones de proteínas. La metodología para las pruebas de tensión física para identificar la capacidad de diversos aditivos de prevenir la agregación puede implicar la exposición a agitación energética o agitación en el plano horizontal o rotación x cm desde el eje de una rueda que gira a n rev/min en el plano vertical. La turbidez resultante de la agregación normalmente se determina como una función del tiempo por inspección visual o análisis de dispersión de luz. De forma alternativa, las reducciones en el contenido de proteína soluble debido a la precipitación se pueden cuantificar por un ensayo de HPLC como una función del tiempo.

La presente invención se basa en el descubrimiento novedoso de que los polioxietileno (POE) sorbitanos y los polietilenglicoles (PEG) presentes en determinadas concentraciones en formulación líquida son útiles para estabilizar las formulaciones que contienen proteínas y para la prevención de la agregación de proteínas en dichas formulaciones.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención describe composiciones de materia que comprenden un anticuerpo u otra proteína, ya sea en alta o baja concentración, y un POE sorbitano. Como se usa en el presente documento, un "polioxietileno sorbitano" o "POE sorbitano" se refiere a un compuesto no tensioactivo que tiene la siguiente estructura química:



donde $a+b+c+d$ es preferentemente de aproximadamente 6 a aproximadamente 80, más preferentemente de aproximadamente 8 a aproximadamente 60, aún más preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 40, y aún más preferentemente de aproximadamente 10 a aproximadamente 20. Con respecto a lo anterior, se entiende en la técnica que la síntesis química de compuestos tales como los POE sorbitanos descritos en el presente documento da como resultado una mezcla de compuestos un tanto heterogénea, en lugar de una preparación completamente homogénea. Como tal, cuando se describe en el presente documento que $a+b+c+d$ es, por ejemplo, preferentemente de aproximadamente 6 a 80, se debe entender que esa definición se refiere a la mayoría de los componentes de la mezcla heterogénea que resultan de la síntesis química de los mismos.

Los POE sorbitanos se pueden emplear individualmente como un agente estabilizante de un anticuerpo u otra proteína, o se pueden emplear en combinación con otros POE sorbitanos para estabilizar un anticuerpo u otra proteína en solución acuosa. Los POE sorbitanos encuentran uso como agentes estabilizantes (o de antiagregación) de anticuerpos u otras proteínas a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones en solución acuosa. En determinados modos de realización de la presente invención, el POE sorbitano (si se emplea como un agente estabilizante único) o los POE sorbitanos (si se emplean en combinación) pueden estar presentes en la formulación acuosa que contiene anticuerpos u otras proteínas en una concentración de desde 150 ppm a aproximadamente 10.000 ppm.

En otro aspecto, la presente invención describe composiciones de materia que comprenden un anticuerpo u otra proteína, ya sea en alta o baja concentración, y un polietilenglicol.

Como se usa en el presente documento, "polietilenglicol", "PEG" y términos similares pretenden englobar polietilenglicol y diversos derivados del mismo, tales como metoxi-PEG-amina, diamina-PEG y similares. Más específicamente y en determinados modos de realización de la presente invención, el término "polietilenglicol" o "PEG" se refiere a un compuesto no tensioactivo que tiene la siguiente estructura química:



donde n es de aproximadamente 5 a aproximadamente 240 y puede contener opcionalmente algún grado de insaturación. Los PEG englobados para su uso en la presente invención pueden ser ramificados o lineales, preferentemente lineales. Con respecto a lo anterior, se entiende en la técnica que la síntesis química de compuestos tales como los PEG descritos en el presente documento da como resultado una mezcla de compuestos un tanto heterogénea, en lugar de una preparación completamente homogénea. Como tal, cuando se

describe en el presente documento que n es preferentemente de aproximadamente 5 a 240, se debe entender que esa definición se refiere a la mayoría de los componentes de la mezcla heterogénea que resultan de la síntesis química de los mismos.

5 Los PEG se pueden emplear individualmente como un agente estabilizante de un anticuerpo u otra proteína, o se pueden emplear en combinación con otros PEG para estabilizar un anticuerpo u otra proteína en solución acuosa. Los PEG encuentran uso como agentes estabilizantes (o de antiagregación) de anticuerpos u otras proteínas a lo largo de un amplio intervalo de concentraciones en solución acuosa. En determinados modos de realización de la presente invención, el PEG (si se emplea como un único agente estabilizante) o PEG (si se emplea en combinación) puede estar presente en la formulación acuosa que contiene anticuerpos u otras proteínas en una concentración de menos de aproximadamente 10.000 ppm, preferentemente de aproximadamente 20 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, más preferentemente de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 10.000 ppm, más preferentemente de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 5.000 ppm, más preferentemente de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 1.000 ppm, más preferentemente de aproximadamente 200 ppm a aproximadamente 500 ppm.

Los PEG preferentes incluyen polímeros de un peso molecular de aproximadamente 200 a 12.000, pero los polímeros de peso molecular más alto también están dentro del alcance de la invención. El PEG incluye polímeros lineales y ramificados, moléculas en estrella y copolímeros en bloque de PEG formados por el acoplamiento de al menos dos polímeros de PEG diferentes para formar un polímero de peso molecular más alto, todos los cuales son bien conocidos en la técnica.

Por "polipéptido" o "proteína" se quiere decir una secuencia de aminoácidos para los que la longitud de cadena es suficiente para producir los niveles más altos de estructura terciaria y/o cuaternaria. Por tanto, las proteínas se distinguen de los "péptidos" que son también moléculas basadas en aminoácidos que no tienen dicha estructura. Típicamente, una proteína para su uso en el presente documento tendrá un peso molecular de al menos aproximadamente 5-20 kDa, de forma alternativa al menos aproximadamente 15-20 kDa, preferentemente al menos aproximadamente 20 kDa. "Péptido" quiere decir una secuencia de aminoácidos que en general no presenta un nivel más alto de estructura terciaria y/o cuaternaria. Los péptidos tienen en general un peso molecular de menos de aproximadamente 5 kDa.

Los ejemplos de polipéptidos englobados dentro de 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; 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; encefalina; RANTES (regulación en función de la activación, expresada y segregada 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 endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurótrofo, tal como factor neurótrofo derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, 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 y transformación (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 o TGF-β5; factor insulínico de crecimiento I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor insulínico de crecimiento (IGFBP); 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 de aceleración del decaimiento; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura 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 CA125 (antígeno de cáncer de ovario) o receptor HER2, HER3 o HER4; inmuno adhesinas; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de las proteínas enumeradas anteriormente, así como anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, que se unen a cualquiera de las proteínas enumeradas anteriormente.

La proteína que se formula es preferente y esencialmente pura y de forma deseable esencialmente homogénea (es decir, libre de proteínas contaminantes). Proteína "esencialmente pura" quiere decir una composición que comprende al menos aproximadamente un 90 % en peso de la proteína, en base al peso total de la composición, preferentemente al menos aproximadamente un 95 % en peso. Proteína "esencialmente homogénea" quiere decir

una composición que comprende al menos aproximadamente un 99 % en peso de proteína, en base al peso total de la composición.

5 En determinados modos de realización, la proteína es un anticuerpo. En el presente documento, el anticuerpo está dirigido frente a un "antígeno" de interés. Preferentemente, el antígeno es una proteína biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos dirigidos frente a antígenos no proteicos (tales como antígenos glucolipídicos asociados a tumor; véase la patente de EE. UU. n.º 5.091.178). Cuando el antígeno es una proteína, puede ser una molécula transmembranaria (por ejemplo, receptor) o ligando, tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen las proteínas analizadas anteriormente. Las dianas moleculares preferentes para anticuerpos englobadas por la presente invención incluyen polipéptidos CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; miembros de la familia de receptores HER, tales como el receptor de EGF (HER1), el receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina av/b3 que incluye las subunidades a o bien b de la misma (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento, tales como VEGF; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; polipéptido C, etc. Se pueden usar antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados 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. Se pueden derivar dichas células de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranaria.

20

25 Los ejemplos de anticuerpos que se van a purificar en el presente documento incluyen, pero no se limitan a: anticuerpos contra HER2 incluyendo trastuzumab (HERCEPTIN®) (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285-4289 (1992), patente de EE. UU. n.º 5.725.856) y pertuzumab (OMNITARG™) (documento WO 01/00245); anticuerpos contra CD20 (véase a continuación); anticuerpos contra IL-8 (St John *et al.*, *Chest*, 103:932 (1993) y publicación internacional n.º WO 95/23865); anticuerpos frente al receptor de VEGF o para VEGF incluyendo anticuerpos para VEGF humanizados y/o madurados por afinidad, tales como el anticuerpo para VEGF humanizado huA4.6.1 bevacizumab (AVASTIN®) y ranibizumab (LUCENTIS®) (Kim *et al.*, *Growth Factors*, 7:53-64 (1992), publicación internacional n.º WO 96/30046 y documento WO 98/45331, publicado el 15 de octubre de 1998); anticuerpos contra PSCA (documento WO 01/40309); anticuerpos contra CD11a incluyendo efalizumab (RAPTIVA®) (patente de EE. UU. n.º 6.037.454, patente de EE. UU. n.º 5.622.700, documento WO 98/23761, Stoppa *et al.*, *Transplant Intl.* 4:3-7 (1991) y Hourmant *et al.*, *Transplantation* 58:377-380 (1994)); anticuerpos que se unen a IgE, incluyendo omalizumab (XOLAIR®) (Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151:2623-2632 (1993), y publicación internacional n.º WO 95/19181; patente de EE. UU. n.º 5.714.338, expedida el 3 de febrero de 1998 o patente de EE. UU. n.º 5.091.313, expedida el 25 de febrero de 1992, documento WO 93/04173 publicado el 4 de marzo de 1993, o solicitud internacional n.º PCT/US98/13410 presentada el 30 de junio de 1998, patente de EE. UU. n.º 5.714.338); anticuerpos contra CD18 (patente de EE. UU. n.º 5.622.700, expedida el 22 de abril de 1997, o como en el documento WO 97/26912, publicado el 31 de julio de 1997); anticuerpos del anticuerpo frente al receptor Apo-2 (documento WO 98/51793 publicado el 19 de noviembre de 1998); anticuerpos frente al factor tisular (TF) (patente europea n.º 0 420 937 B1 concedida el 9 de noviembre de 1994); anticuerpos contra la integrina $\alpha_4\alpha_7$ (documento WO 98/06248 publicado el 19 de febrero de 1998); anticuerpos contra EGFR (por ejemplo, el anticuerpo quimerizado o humanizado 225, cetuximab, ERBUTIX® como en el documento WO 96/40210 publicado el 19 de diciembre de 1996); anticuerpos contra CD3 tales como OKT3 (patente de EE. UU. n.º 4.515.893 expedida el 7 de mayo de 1985); anticuerpos contra CD25 o Tac, tales como CHI-621 (SIMULECT®) y ZENAPAX® (véase la patente de EE. UU. n.º 5.693.762 expedida el 2 de diciembre de 1997); anticuerpos contra CD4, tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy *et al.*, *Arthritis Rheum* 39(1): 52-56 (1996)); anticuerpos contra CD52, tales como CAMPATH-1H (ILEX/Berlex) (Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-337 (1988)); anticuerpos frente al receptor Fc, tales como el anticuerpo M22 dirigido frente a Fc (RI como en Graziano *et al.*, *J. Immunol.* 155(10):4996-5002 (1995)); anticuerpos contra el antígeno carcinoembrionario (CEA), tales como hMN-14 (Sharkey *et al.*, *Cancer Res.* 55(Sup. 23): 5935s-5945s (1995)); anticuerpos dirigidos frente a las células epiteliales de mama incluyendo huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani *et al.*, *Cancer Res.* 55(23): 5852s-5856s (1995); y Richman *et al.*, *Cancer Res.* 55(Sup. 23): 5916s-5920s (1995)); anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon, tales como C242 (Litton *et al.*, *Eur J. Immunol.* 26(1): 1-9 (1996)); anticuerpos contra CD38, por ejemplo, AT 13/5 (Ellis *et al.*, *J. Immunol.* 155(2):925-937 (1995)); anticuerpos contra CD33, tales como Hu M195 (Jurcic *et al.*, *Cancer Res.* 55(Sup. 23):5908s-5910s (1995)) y CMA-676 o CDP771; anticuerpos contra EpCAM, tales como 17-1A (PANOREX®); anticuerpos contra GpIIb/IIIa, tales como abciximab o Fab c7E3 (REOPRO®); anticuerpos contra el VRS, tales como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticuerpos contra el CMV, tales como PROTOVIR®; anticuerpos contra el VIH, tales como PRO542; anticuerpos contra la hepatitis, tales como el anticuerpo contra la hepatitis B OSTAVIR®; anticuerpo contra CA125 incluyendo anti-MUC16 (documento WO 2007/001851; Yin, BWT y Lloyd, KO, *J. Biol. Chem.* 276:27371-27375 (2001)) y OvaRex; anticuerpo frente al epítipo de GD3 idiotípico BEC2; anticuerpo $\alpha\beta 3$ (por ejemplo, VITAXIN®; Medimmune); anticuerpo contra el carcinoma de células renales humano, tal como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-17-1An humano (3622W94); anticuerpo anti tumor colorrectal humano (A33); anticuerpo anti melanoma humano R24 dirigido contra el gangliósido GD3; anti carcinoma epidermoide humano

(SF-25); anticuerpo contra el antígeno leucocitario humano (HLA), tal como Smart ID 10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1); anticuerpo contra CD37, tal como TRU 016 (Trubion); anticuerpo contra IL-21 (Zymogenetics/Novo Nordisk); anticuerpo anti linfocitos B (Impheron); MAb que se dirigen a linfocitos B (Immunogen/Aventis); 1D09C3 (Morphosys/GPC); LymphoRad 131 (HGS); anticuerpo contra Lym-1, tal como Lym-1Y-90 (USC) o anti-Lym-1 Oncolym (USC/Peregrine); LIF 226 (Enhanced Lifesci.); anticuerpo contra el BAFF (por ejemplo, el documento WO 03/33658); anticuerpo frente al receptor de BAFF (véase, por ejemplo, el documento WO 02/24909); anticuerpo contra BR3; anticuerpo contra Blys, tal como belimumab; LYMPHOSTAT -B™; ISF 154 (UCSD/Roche/Tragen); gomilixima (Idec 152; Biogen Idec); anticuerpo frente al receptor de IL-6, tal como atlizumab (ACTEMRA™; Chugai/Roche); anticuerpo contra IL-15, tal como HuMax-IL-15 (Genmab/Amgen); anticuerpo frente al receptor de quimiocina, tal como un anticuerpo contra CCR2 (por ejemplo, MLN1202; Millineum); anticuerpo anticomplemento, tal como el anticuerpo contra C5 (por ejemplo, eculizumab, 5G1.1; Alexion); formulación oral de inmunoglobulina humana (por ejemplo, IgPO; Protein Therapeutics); anticuerpo contra IL-12, tal como ABT-874 (CAT/Abbott); Teneliximab (BMS-224818; BMS); anticuerpos contra CD40, incluyendo S2C6 y variantes humanizadas del mismo (documento WO 00/75348) y TNX 100 (Chiron/Tanox); anticuerpos contra TNF- α incluyendo cA2 o infliximab (REMICADE®), CDP571, MAK-195, adalimumab (HUMIRA™), fragmento de anticuerpo pegilado contra TNF- α , tal como CDP-870 (Celltech), D2E7 (Knoll), anticuerpo policlonal anti-TNF- α (por ejemplo, PassTNF; Verigen); anticuerpos contra CD22, tales como LL2 o epratuzumab (LYMPHOCIDE®; Immunomedics), incluyendo epratuzumab Y-90 y epratuzumab I-131, anticuerpo contra CD22 de Abiogen (Abiogen, Italia), CMC 544 (Wyeth/Celltech), combotox (UT Southwestern), BL22 (NIH) y LympoScan Tc99 (Immunomedics).

Los ejemplos de anticuerpos contra CD20 incluyen: "C2B8", que ahora se llama "rituximab" ("RITUXAN®") (patente de EE. UU. n.º 5.736.137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con itrio [90] denominado "Y2B8" o "ibritumomab tiuxetán" (ZEVALIN®) comercialmente disponible de IDEC Pharmaceuticals, Inc. (patente de EE. UU. n.º 5.736.137; 2B8 depositado en ATCC con el n.º de acceso HB11388 el 22 de junio de 1993); IgG2a murino "B1", también llamado "tositumomab", opcionalmente marcado con ¹³¹I para generar el anticuerpo "131I-B1" o "tositumomab yodo I131" (BEXXAR™) disponible comercialmente de Corixa (véase, también, la patente de EE. UU. n.º 5.595.721); anticuerpo monoclonal murino "1F5" (Press *et al.*, *Blood* 69(2):584-591 (1987)) y variantes del mismo que incluyen 1F5 humanizado o "con parche de marco estructural" (documento WO 2003/002607, Leung, S.; depósito de ATCC HB-96450); anticuerpo 2H7 murino y 2H7 quimérico (patente de EE. UU. n.º 5.677.180); 2H7 humanizado (documento WO 2004/056312, Lowman *et al.*); 2F2 (HuMax-CD20), un anticuerpo de alta afinidad totalmente humano dirigido a la molécula CD20 en la membrana celular de los linfocitos B (Genmab, Dinamarca; véase, por ejemplo, Glennie y van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8: 503-510 (2003) y Cragg *et al.*, *Blood* 101: 1045-1052 (2003); documento WO 2004/035607; documento US 2004/0167319); los anticuerpos monoclonales humanos expuestos en los documentos WO 2004/035607 y US 2004/0167319 (Teeling *et al.*); los anticuerpos que tienen cadenas de glúcidos enlazadas a N-glucósido complejas unidas a la región Fc descrita en el documento US 2004/0093621 (Shitara *et al.*); anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno que se unen a CD20 (documento WO 2005/000901, Tedder *et al.*), tales como HB20-3, HB20-4, HB20-25 y MB20-11; moléculas de unión a CD20, tales como la serie de anticuerpos de AME, por ejemplo, los anticuerpos AME 33 como se exponen en los documentos WO 2004/103404 y US 2005/0025764 (Watkins *et al.*, Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME); moléculas de unión a CD20, tales como las descritas en el documento US 2005/0025764 (Watkins *et al.*); anticuerpo A20 o variantes del mismo, tales como el anticuerpo A20 quimérico o humanizado (cA20, hA20, respectivamente) o IMMUN-106 (documento US 2003/0219433, Immunomedics); anticuerpos de unión a CD20, incluyendo Leu-16, 1H4 o 2B8 deficitario en epítipo, opcionalmente conjugados con IL-2, como en los documentos US 2005/0069545A1 y WO 2005/16969 (Carr *et al.*); anticuerpo biespecífico que se une a CD22 y CD20, por ejemplo, hLL2xhA20 (documento WO 2005/14618, Chang *et al.*); anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 disponibles en el International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *et al.*, en: *Leukocyte Typing III* (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)); 1H4 (Haisma *et al.*, *Blood* 92:184 (1998)); conjugado anti-CD20 auristatina E (Seattle Genetics); anti-CD20-IL2 (EMD/Biovation/City of Hope); tratamiento con MAb anti-CD20 (EpiCyte); anticuerpo anti-CD20 TRU 015 (Trubion).

El término "anticuerpo" como se usa en el presente documento incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas monocatenarias, así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv). El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa de manera intercambiable con "anticuerpo" en el presente documento.

La unidad de anticuerpo de 4 cadenas básica es una glucoproteína heterotetramérica compuesta de dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste en 5 de la unidad heterotetramérica básica junto con un polipéptido adicional llamado cadena J, y contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA comprenden desde 2-5 de las unidades de 4 cadenas básicas que se pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de las IgG, la unidad de 4 cadenas es, en general, de aproximadamente 150.000 dalton. Cada cadena L se enlaza a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se enlazan entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena H tiene, en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ , y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ϵ .

Cada cadena L tiene, en el extremo N, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que residuos de aminoácido particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L conjuntamente forma un único sitio de unión a antígeno. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, *Basic and Clinical Immunology*, 8.ª edición, Daniel P. Sties, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, página 71 y capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas denominadas α , δ , ϵ , γ y μ , respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases basadas en diferencias relativamente menores en la secuencia y función de CH, por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en las secuencias entre anticuerpos. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo del alcance completo de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables llamados regiones estructurales (FR) de aproximadamente 15-30 residuos de aminoácido separados por regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables" o, en ocasiones, "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) que tienen cada una aproximadamente 9-12 residuos de aminoácido de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas por tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan y, en algunos casos, forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Rabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes 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 de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable" (también conocida como "regiones determinantes de la complementariedad" o CDR) cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que están (normalmente tres o cuatro regiones cortas de variabilidad de secuencia extrema) dentro del dominio de la región V de una inmunoglobulina que forman el sitio de unión a antígeno y son los principales determinantes de la especificidad por el antígeno. Existen al menos dos procedimientos para identificar los residuos de CDR: (1) un enfoque en base a la variabilidad de secuencia de especies cruzadas (es decir, Rabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institute of Health, Bethesda, MS 1991); y (2) un enfoque en base a estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Chothia, C. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Sin embargo, en la medida en que dos técnicas de identificación de residuos definen regiones de superposición, pero no regiones idénticas, se pueden combinar para definir una CDR híbrida.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales y/o modificaciones postraduccionales (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos frente a un sitio antigénico único. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que incluyen típicamente anticuerpos diferentes dirigidos frente a determinantes (epitopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal está dirigido frente a un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan por el cultivo de hibridoma, no contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por el procedimiento de hibridoma descrito inicialmente por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), o se pueden preparar por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de colecciones de anticuerpos en fago usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica a u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico a u homólogo a las

secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden

5 secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, cercopitécidos, simios superiores, etc.) y secuencias de la región constante humana.

Un anticuerpo "intacto" es aquel que comprende un sitio de unión a antígeno, así como un CL y al menos los dominios de la cadena pesada C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de

10 secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia natural humana) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno y/o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la patente de EE. UU. n.º 5.641.870, ejemplo 2; Zapata

15 *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de los anticuerpos produjo dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una denominación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en una cadena L completa junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y el primer dominio constante de una cadena pesada (C_{H1}). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento F(ab')₂ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab enlazados por disulfuro que tiene diferente actividad de unión a antígeno y que todavía se puede reticular con el antígeno. Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab por tener unos pocos residuos adicionales en el extremo carboxílico del dominio C_{H1}, que incluyen una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo. Fab'-SH es la denominación en el presente documento para un Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios

20 constantes portan 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.

El fragmento Fc comprende las porciones carboxiterminales de ambas cadenas H mantenidas juntas por disulfuros. Las funciones efectoras de los anticuerpos están determinadas por secuencias en la región Fc, la región que

35 también se reconoce por los receptores Fc (FcR) encontrados en determinados tipos de células.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de unión a y de reconocimiento de antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de la región variable de una cadena pesada y una ligera en estrecha asociación no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles de cada una de las cadenas H y L) que contribuyen a los residuos de aminoácido para la unión a antígeno y confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un dominio variable único (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad menor que el sitio de unión completo.

40

Los "Fv monocatenarios", también abreviados "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una única cadena polipeptídica. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

45

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con conectores cortos (de aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L de modo que se logra el emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, dando como resultado, de este modo, un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "cruzados" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen con mayor detalle, por ejemplo, en el documento EP 404.097; documento WO 93/11161; Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993).

50

Un anticuerpo que "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido particular es aquel que se une a ese polipéptido o epítipo particular en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo polipeptídico.

55

El término "fase sólida" describe una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas englobadas en el presente documento incluyen las formadas parcial o totalmente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliacrilamidas,

60

poliestireno, poli(alcohol vinílico) y siliconas. En determinados modos de realización, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otros es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la patente de EE. UU. n.º 4.275.149.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')₂ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) de secuencias en su mayoría humanas, que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable (también CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los "anticuerpos humanizados" como se usa en el presente documento pueden comprender también residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar y optimizar adicionalmente el funcionamiento del anticuerpo. El anticuerpo humanizado de manera óptima también comprenderá al menos una porción de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para obtener más detalles, véase 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).

Un "anticuerpo dependiente de la especie", por ejemplo, un anticuerpo de mamífero anti-IgE humana, es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero que la que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie se "une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1x10⁻⁷ M, de forma alternativa no más de aproximadamente 1x10⁻⁸ M, de forma alternativa no más de aproximadamente 1x10⁻⁹ M) pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 500 veces, o al menos aproximadamente 1000 veces, más débil que su afinidad de unión por el antígeno no humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos como se define anteriormente, pero es preferentemente un anticuerpo humanizado o humano.

Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptores de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

"Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o ADCC se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a receptores Fc (FcR) presente en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "equipan a" las células citotóxicas y se requieren para destruir la célula diana por este mecanismo. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de Fc en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en la patente de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, *PNAS USA* 95:652-656 (1998).

El "receptor Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferente es aquel que se une a un anticuerpo contra IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas empalmadas de forma alternativa de estos receptores, los receptores FcγRII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se identifiquen en el futuro, se engloban por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de las IgG maternas al feto. Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim *et al.*,

J. Immunol. 24: 249 (1994).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; siendo preferentes los PBMC y las células MNK. Las células efectoras se pueden aislar a partir de una fuente natural, por ejemplo, de sangre.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia con la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996).

"Aislado" cuando se usa para describir los diversos polipéptidos y anticuerpos divulgados en el presente documento, quiere decir un polipéptido o anticuerpo que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su entorno de producción. Preferentemente, el polipéptido aislado está libre de asociación con todos los demás componentes de su entorno de producción. Los componentes contaminantes de su entorno de producción, tales como el que resulta de las células transfectadas recombinantes, son materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteicos o no proteicos. En modos de realización preferentes, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna por el uso de un secuenciador de vaso giratorio, o (2) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, plata. Sin embargo, habitualmente, un polipéptido o anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" que codifica los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia habitualmente en el entorno en el que se produjo. Preferentemente, el ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes asociados con el entorno de producción. Las moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento se encuentran en una forma distinta a la forma o escenario en el que se encuentran en la naturaleza. Las moléculas de ácido nucleico aisladas, por lo tanto, se distinguen del ácido nucleico que codifica los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento que existen naturalmente en las células.

El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante enlazada de forma funcional en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para procariontes, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia operadora, y un sitio de unión a ribosoma. Es conocido que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico se "enlaza de forma funcional" cuando se dispone en relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o secuencia líder secretora se enlaza de forma funcional al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador se enlaza de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma se enlaza de forma funcional a una secuencia codificante si se sitúa de manera que facilite la traducción. En general, "enlazado de forma funcional" quiere decir que las secuencias de ADN que están enlazadas son contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, son contiguas y están en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlace se consigue por ligamiento en sitios de restricción convenientes. Si no existen dichos sitios, se usan adaptadores o conectores oligonucleotídicos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

El término "marcado con epítipo" cuando se usa en el presente documento se refiere a un polipéptido quimérico que comprende un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento fusionado a un "polipéptido marcador". El polipéptido marcador tiene suficientes residuos para proporcionar un epítipo contra el que se puede preparar un anticuerpo, aunque es suficientemente corto de modo que no interfiere en la actividad del polipéptido al que se fusiona. El polipéptido marcador también es preferentemente bastante único de modo que el anticuerpo no reacciona sustancialmente de forma cruzada con otros epítipos. Los polipéptidos marcadores adecuados, en general, tienen al menos seis residuos de aminoácido y normalmente entre aproximadamente 8 y 50 residuos de aminoácido (preferentemente, entre aproximadamente 10 y 20 residuos de aminoácido).

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento

5 y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina es típicamente una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. La secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina se puede obtener de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de un dominio de un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente documento en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En un aspecto en particular preferente, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3 o las regiones bisagra, CH1, CH2 y CH3 de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina, véase también la patente de EE. UU. n.º 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

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

15 Un anticuerpo posee "actividad biológica" en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado está dentro de aproximadamente un 10 % (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica presentada en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica, como se determina por la capacidad del anticuerpo *in vitro* o *in vivo* de unirse al antígeno y dar como resultado una respuesta biológica mensurable.

20 Una formulación "estable" o "estabilizada" es una en la que la proteína en la misma esencialmente conserva su estabilidad física y/o química tras el almacenamiento. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. Preferentemente, la formulación es estable a temperatura ambiente (~30 °C) o a 40 °C durante al menos 1 mes y/o estable a aproximadamente 2-8 °C durante al menos 1 año y preferentemente durante al menos 2 años. Por ejemplo, el grado de agregación durante el almacenamiento se puede usar como un indicador de estabilidad de las proteínas. Por tanto, una formulación "estable" puede ser una en la que menos de aproximadamente un 10 % y preferentemente menos de aproximadamente un 5 % de la proteína está presente como un agregado en la formulación. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas están disponibles en la técnica y se revisan, por ejemplo, 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).

25 El incremento de la "estabilidad" de una formulación que contiene proteínas se refiere a la reducción (en comparación con una formulación que contiene proteínas no tratadas) o la prevención de la formación de agregados de proteínas en esa formulación.

30 El término "solución acuosa" se refiere a una solución en la que el agua es el medio de disolución o disolvente. Cuando una sustancia se disuelve en un líquido, la mezcla se denomina solución. La sustancia disuelta es el soluto y el líquido que hace la disolución (en este caso, el agua) es el disolvente.

35 El término "agente estabilizante" o "estabilizante", como se usa en el presente documento, es un producto químico o compuesto que se añade a una solución o mezcla o suspensión o composición o composición terapéutica para mantenerla en un estado estable o invariable; o es aquel que se usa porque produce una reacción que implica cambios en los átomos o moléculas que dan lugar a un estado más estable o invariable.

40 El término "agregado" o "agregación", como se usa en el presente documento, quiere decir unirse o acumularse en una aglomeración o conjunto, por ejemplo, como en la agregación de péptidos, polipéptidos, anticuerpos o variantes de los mismos. Los agregados pueden ser autoagregantes o agregarse debido a otros factores, por ejemplo, agentes agregantes, agentes precipitantes, agitación u otros medios y procedimientos por los que los péptidos, polipéptidos, anticuerpos o variantes de los mismos se pueden unir.

45 La agregación inducida por agitación es la formación de agregados en una solución que contiene proteínas inducida por la agitación, donde la agitación es poner en movimiento por agitación enérgica o agitación.

50 Un anticuerpo que es "susceptible de agregación" es uno que se ha observado que se agrega a otra(s) molécula(s) de anticuerpo, especialmente tras la agitación.

55 Por "inhibir" la agregación inducida por agitación se pretende prevenir, reducir o disminuir la cantidad de agregación inducida por agitación, medida comparando la cantidad de agregado presente en una solución que contiene proteínas que comprende al menos un inhibidor de la agregación inducida por agitación con la cantidad de agregado presente en una solución que contiene proteínas que no comprende al menos un inhibidor de la agregación inducida por agitación.

60 Una cantidad que inhibe la agregación inducida por agitación es la cantidad que inhibe la agregación inducida por agitación.

Los procedimientos que pueden encontrar uso en la presente invención para medir la agregación inducida por agitación incluyen electroforesis en gel, enfoque isoeléctrico, electroforesis capilar, cromatografía tal como cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa, cartografía peptídica, cartografía de oligosacáridos, espectrometría de masas, espectroscopia de absorción ultravioleta, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia de dicroísmo circular, calorimetría de valoración isotérmica, calorimetría diferencial de barrido, ultracentrifugación analítica, dispersión dinámica de luz, proteólisis y reticulación, medición de turbidez, ensayos de retardo en filtro, ensayos inmunológicos, ensayos de unión a tinte fluorescente, ensayos de tinción de proteínas, microscopia y detección de agregados por medio de ELISA u otro ensayo de unión.

Una formulación "isotónica" es aquella que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas en general tendrán una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. El término "hipotónico" describe una formulación con una presión osmótica por debajo de la de la sangre humana. De forma correspondiente, el término "hipertónico" se usa para describir una formulación con una presión osmótica por encima de la de la sangre humana. La isotonicidad se puede medir usando un osmómetro de presión de vapor o de tipo de congelación de hielo, por ejemplo. Las formulaciones de la presente invención son hipertónicas como resultado de la adición de sal y/o tampón.

Una formulación "reconstituida" es aquella que se ha preparado disolviendo una formulación de anticuerpos o proteínas liofilizadas en un diluyente de modo que la proteína se dispersa en la formulación reconstituida. La formulación reconstituida es adecuada para la administración (por ejemplo, administración parenteral) a un paciente que se va a tratar con la proteína de interés y, en determinados modos de realización de la invención, puede ser aquella que sea adecuada para la administración subcutánea.

Los "tensioactivos" son agentes activos en superficie que pueden ejercer su efecto en las superficies de sólido-sólido, sólido-líquido, líquido-líquido y líquido-aire debido a su composición química, que contiene tanto grupos hidrófilos como hidrófobos. Estos materiales reducen la concentración de proteína en soluciones diluidas en las interfases aire-agua y/o agua-sólido donde las proteínas se pueden adsorber y potencialmente agregar. Los tensioactivos se pueden unir a las interfases hidrófobas en las formulaciones de proteína. Las proteínas en la superficie del agua se agregarán, en particular cuando se agiten, debido al despliegue y posterior agregación de la monocapa de proteínas.

Los "tensioactivos" pueden desnaturalizar las proteínas, pero también pueden estabilizarlas frente a la desnaturalización en la superficie. En general, los tensioactivos iónicos pueden desnaturalizar proteínas. Sin embargo, los tensioactivos no iónicos normalmente no desnaturalizan las proteínas incluso en concentraciones relativamente altas (1 % p/v). La mayoría de los tensioactivos no iónicos parenteralmente aceptables provienen de los grupos polisorbato o bien poliéter. El polisorbato 20 y 80 son estabilizantes de tensioactivos contemporáneos en formulaciones de proteína comercializadas. Sin embargo, otros tensioactivos usados en formulaciones de proteína incluyen Pluronic F-68 y miembros de la clase "Brij". Los tensioactivos no iónicos pueden ser a base de glucídico. Los tensioactivos a base de glucídico pueden ser alquilglucósidos. La estructura general del glucósido de alquilo es $R_1-O-(CH_2)_x-R$, donde R es independientemente CH_3 o ciclohexilo (C_6H_{11}) y R_1 es independientemente glucosa o maltosa. Los alquilglucósidos ejemplares incluyen aquellos en los que R_1 es glucosa, R es CH_3 y x es 5 (n-hexil- β -D-glucopiranosido), x es 6 (n-heptil- β -D-glucopiranosido), x es 7 (n-octil- β -D-glucopiranosido), x es 8 (n-nonil- β -D-glucopiranosido), x es 9 (n-decil- β -D-glucopiranosido) y x es 11 (n-dodecil- β -D-glucopiranosido). En ocasiones, los glucopiranosidos se llaman glucósidos. Los alquilglucósidos ejemplares incluyen adicionalmente aquellos en los que R_1 es maltosa, R es CH_3 , y x es 5 (n-hexil- β -D-maltopiranosido), x es 7 (n-octil- β -D-maltopiranosido), x es 8 (n-nonil- β -D-maltopiranosido), x es 9 (n-decil- β -D-maltopiranosido), x es 10 (n-undecil- β -D-maltopiranosido), x es 11 (n-dodecil- β -D-maltopiranosido), x es 12 (n-tridecil- β -D-maltopiranosido), x es 13 (n-tetradecil- β -D-maltopiranosido), y x es 15 (n-hexadecil- β -D-maltopiranosido). En ocasiones, los maltopiranosidos se llaman maltósidos. Los alquilglucósidos ejemplares incluyen además aquellos en los que R_1 es glucosa, x es 3, y R es ciclohexilo (3-ciclohexil-1-propil- β -D-glucósido); y en los que R_1 es maltosa, x es 4 y R es ciclohexilo (4-ciclohexil-1-butil- β -D-maltósido).

Un "ácido farmacéuticamente aceptable" incluye ácidos inorgánicos y orgánicos que no son tóxicos en la concentración y manera en la que se formulan. Por ejemplo, los ácidos inorgánicos adecuados incluyen clorhídrico, perclórico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, sulfónico, sulfínico, sulfanílico, fosfórico, carbónico, etc. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen mono, di y tricarbóxico, insaturado, saturado, heterocíclico, arilalifático, cicloalifático, cíclico, aromático, con alquilo de cadena lineal y ramificada, incluyendo, por ejemplo, fórmico, acético, 2-hidroxiacético, trifluoroacético, fenilacético, trimetilacético, t-butilacético, antranílico, propanoico, 2-hidroxiopropanoico, 2-oxopropanoico, propandioico, ciclopentanopropiónico, ciclopentanopropiónico, 3-fenilpropiónico, butanoico, butandioico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, 2-acetoxi-benzoico, ascórbico, cinámico, lauril sulfúrico, esteárico, mucónico, mandélico, succínico, embónico, fumárico, málico, maleico, hidroximaleico, malónico, láctico, cítrico, tartárico, glicólico, glucónico, pirúvico, glioxálico, oxálico, mesílico, succínico, salicílico, ftálico, palmóico, palmeico, tiocianico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2-etanodisulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, p-

toluenosulfónico, alcanforsulfónico, 4-metilbiciclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, glucoheptónico, ácido 4,4'-metileno-bis-3-(hidroxi-2-eno-1-carboxílico), hidroxinaftoico.

5 Las "bases farmacéuticamente aceptables" incluyen bases inorgánicas y orgánicas que no son tóxicas en la concentración y manera en la que se formulan. Por ejemplo, las bases adecuadas incluyen las formadas a partir de metales formadores de bases inorgánicas tales como litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, amonio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio, N-metilglucamina, morfina, piperidina y bases orgánicas no tóxicas que incluyen, amina primaria, secundaria y terciaria, aminas sustituidas, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, [por ejemplo, N(R')₄⁺ (donde R' es independientemente H o alquilo C₁₋₄, por ejemplo, amonio, Tris)], por ejemplo, 10 isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, dicitlohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaína, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperacina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Las bases orgánicas no tóxicas en particular preferentes son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, dicitlohexilamina, colina y cafeína.

15 Los ácidos y bases farmacéuticamente aceptables adicionales utilizables con la presente invención incluyen los que se derivan de los aminoácidos, por ejemplo, histidina, glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y asparagina.

20 Los tampones y sales "farmacéuticamente aceptables" incluyen los derivados tanto de sales de adición de ácido como de base de los ácidos y bases indicados anteriormente. Los tampones y/o sales específicos incluyen histidina, succinato y acetato.

25 Un "lioprotector" es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, previene o reduce significativamente la inestabilidad fisicoquímica de la proteína tras su liofilización y posterior almacenamiento. Los lioprotectores ejemplares incluyen glúcidos y sus correspondientes alditoles; un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaína; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alditoles trihídricos o de peso molecular más alto, por ejemplo, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; Pluronic®; y combinaciones de los mismos. Los 30 lioprotectores ejemplares adicionales incluyen glicerina y gelatina, y los glúcidos melibiosa, melecitosa, rafinosa, manotriosa y estaquiosa. Los ejemplos de glúcidos reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, iso-maltulosa y lactulosa. Los ejemplos de glúcidos no reductores incluyen glucósidos no reductores de compuestos polihidroxilados seleccionados de alditoles y otros polialcoholes de cadena lineal. Los alditoles preferentes son monoglucósidos, especialmente los compuestos obtenidos por reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo lateral glucosídico puede ser glucosídico o bien galactosídico. Los 35 ejemplos adicionales de alditoles son glucitol, maltitol, lactitol e iso-maltulosa. Los lioprotectores preferentes son los glúcidos no reductores trehalosa o sacarosa.

40 El lioprotector se añade a la formulación preliofilizada en una "cantidad de lioprotección", lo que quiere decir que, luego de la liofilización de la proteína en presencia de la cantidad de lioprotección del lioprotector, la proteína conserva esencialmente su estabilidad fisicoquímica tras su liofilización y almacenamiento.

45 Un "glúcido farmacéuticamente aceptable" es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, previene o reduce significativamente la inestabilidad fisicoquímica de la proteína tras el almacenamiento. Cuando la formulación está destinada a liofilizarse y a continuación reconstituirse, los "glúcidos farmacéuticamente aceptables" también se pueden conocer como "lioprotectores". Los glúcidos ejemplares y sus alditoles correspondientes incluyen: un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaína; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alditoles trihídricos o de peso molecular más alto, por ejemplo, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; Pluronic®; y combinaciones de los mismos. Los lioprotectores ejemplares adicionales incluyen 50 glicerina y gelatina, y los glúcidos melibiosa, melecitosa, rafinosa, manotriosa y estaquiosa. Los ejemplos de glúcidos reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, iso-maltulosa y lactulosa. Los ejemplos de glúcidos no reductores incluyen glucósidos no reductores de compuestos polihidroxilados seleccionados de alditoles y otros polialcoholes de cadena lineal. Los alditoles preferentes son monoglucósidos, especialmente los compuestos obtenidos por reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo lateral glucosídico puede ser glucosídico o bien galactosídico. Los ejemplos adicionales de alditoles son glucitol, maltitol, lactitol e iso-maltulosa. Los glúcidos farmacéuticamente aceptables preferentes son los glúcidos no reductores trehalosa o sacarosa.

60 Los glúcidos farmacéuticamente aceptables se añaden a la formulación en una "cantidad de protección" (por ejemplo, preliofilización), lo que quiere decir que la proteína conserva esencialmente su estabilidad fisicoquímica durante el almacenamiento (por ejemplo, después de su reconstitución y almacenamiento).

65 El "diluyente" de interés en el presente documento es aquel que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para su administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituída después de la liofilización. Los diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua

bacteriostática para inyectables (BWF1), una solución tamponada de pH (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. En un modo de realización alternativo, los diluyentes pueden incluir soluciones acuosas de sales y/o tampones.

5 Un "conservante" es un compuesto que se puede añadir a las formulaciones en el presente documento para reducir la actividad bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación de uso múltiple (dosis múltiples). Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio.
10 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. El conservante más preferente en el presente documento es alcohol bencílico.

15 "Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Quienes necesitan tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno, así como en los que se va a prevenir el trastorno.

20 "Mamífero" para propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para la práctica de deportes o mascotas, tales como perros, caballos, conejos, ganado bovino, cerdos, hámsters, jerbos, ratones, hurones, ratas, gatos, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

25 Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con la proteína. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se van a tratar en el presente documento incluyen carcinomas e inflamaciones.

30 Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es al menos la concentración mínima requerida para efectuar una mejora o prevención mensurable de un trastorno particular. Las cantidades terapéuticamente eficaces de proteínas conocidas se conocen bien en la técnica, si bien las cantidades eficaces de proteínas descubiertas a continuación en el presente documento se pueden determinar por técnicas estándar que están por completo dentro de la experiencia de un experto en la técnica, tal como un médico normal.

35 Los procedimientos para la preparación de anticuerpos (incluyendo los anticuerpos que se conjugan con una toxina) y otras proteínas que se pueden formular como se describe en el presente documento se conocen bien en la técnica y se describen en detalle, por ejemplo, en el documento WO 2007/001851.

Los anticuerpos y otras proteínas se pueden formular de acuerdo con la presente invención en forma acuosa o bien liofilizada, siendo esta última apta si se reconstituye en una forma acuosa.

40 Las formulaciones descritas en el presente documento se pueden preparar como formulaciones liofilizadas reconstituidas. Las proteínas o anticuerpos descritos en el presente documento se liofilizan y a continuación se reconstituyen para producir las formulaciones líquidas de la invención. En este modo de realización particular, después de la preparación de la proteína de interés como se describe anteriormente, se produce una "formulación preliofilizada". La cantidad de proteína presente en la formulación preliofilizada se determina teniendo en cuenta
45 los volúmenes de dosis, modo(s) de administración deseados, etc. Por ejemplo, la concentración inicial de un anticuerpo intacto puede ser de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml y lo más preferentemente de aproximadamente 20-30 mg/ml.

50 La proteína que se va a formular, en general, está presente en solución. Por ejemplo, en las formulaciones líquidas de la invención, la proteína puede estar presente en una solución tamponada de pH a un pH de aproximadamente 4-8, y preferentemente de aproximadamente 5-7. La concentración de tampón puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, de forma alternativa de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 15 mM, dependiendo, por ejemplo, del tampón y la tonicidad deseada de la formulación (por ejemplo, de la formulación reconstituida). Los tampones y/o sales ejemplares son los que son farmacéuticamente aceptables y se pueden
55 crear a partir de ácidos, bases y sales de los mismos adecuados, tales como los que se definen bajo ácidos, bases o tampones "farmacéuticamente aceptables".

60 En un modo de realización, se añade un lioprotector a la formulación preliofilizada. La cantidad de lioprotector en la formulación preliofilizada es en general tal que, tras la reconstitución, la formulación resultante será isotónica. Sin embargo, las formulaciones reconstituidas hipertónicas también pueden ser adecuadas. Además, la cantidad de lioprotector no debe ser demasiado baja como para que se produzca una cantidad inaceptable de degradación/agregación de la proteína tras su liofilización. Sin embargo, las concentraciones de lioprotector ejemplares en la formulación preliofilizada son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM, de forma
65 alternativa de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM, de forma alternativa de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM. Los lioprotectores ejemplares incluyen glúcidos y alditoles tales como

sacarosa, manosa, trehalosa, glucosa, sorbitol, manitol. Sin embargo, bajo circunstancias particulares, determinados lioprotectores también pueden contribuir a un incremento de la viscosidad de la formulación. Como tal, se debe tener cuidado para seleccionar lioprotectores particulares que minimicen o neutralicen este efecto. Los lioprotectores adicionales se describen anteriormente bajo la definición de "lioprotectores", también denominados en el presente documento "glúcidos farmacéuticamente aceptables".

La proporción de proteína con respecto a lioprotector puede variar para cada combinación particular de proteína o anticuerpo y lioprotector. En el caso de un anticuerpo como la proteína de elección y un glúcido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa) como lioprotector para generar una formulación reconstituida isotónica con una alta concentración de proteína, la proporción molar de lioprotector con respecto a anticuerpo puede ser de aproximadamente 100 a aproximadamente 1500 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo, y preferentemente de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo, por ejemplo de aproximadamente 200 a aproximadamente 600 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo.

Se puede usar una mezcla del lioprotector (tal como sacarosa o trehalosa) y un agente de relleno (por ejemplo, manitol o glicina) en la preparación de la formulación de liofilización. El agente de relleno puede permitir la producción de una torta liofilizada uniforme sin cavidades excesivas en la misma, etc. 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 preliofilizada (y/o la formulación liofilizada y/o la formulación reconstituida) siempre que no afecten de forma adversa a las características deseadas de la formulación. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen; agentes de tamponamiento adicionales; conservantes; codisolventes; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sal tales como sodio.

La formulación en el presente documento también puede contener más de una proteína según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no afecten de forma adversa a la otra proteína. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar dos o más anticuerpos que se unan a la diana deseada (por ejemplo, receptor o antígeno) en una única formulación. Dichas proteínas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o luego de la liofilización y reconstitución. De forma alternativa, la esterilidad de toda la mezcla se puede conseguir por esterilización en autoclave de los ingredientes, excepto la proteína, a aproximadamente 120 °C durante aproximadamente 30 minutos, por ejemplo.

Después de que se mezclen conjuntamente la proteína, el lioprotector opcional y otros componentes opcionales, la formulación se liofiliza. Están disponibles muchos liofilizadores diferentes para este propósito, tal como los liofilizadores Hull50™ (Hull, EE. UU.) o GT20™ (Leybold-Heraeus, Alemania). La liofilización se consigue congelando la formulación y posteriormente sublimando el hielo del contenido congelado a una temperatura adecuada para el secado primario. En esta condición, la temperatura del producto está por debajo del punto eutéctico o la temperatura de colapso de la formulación. Típicamente, la temperatura de la bandeja para el secado primario variará de aproximadamente -30 a 25 °C (siempre que el producto permanezca congelado durante el secado primario) a una presión adecuada, que varíe típicamente de aproximadamente 50 a 250 mTorr. La formulación, el tamaño y el tipo del recipiente que contiene la muestra (por ejemplo, un vial de vidrio) y el volumen de líquido determinarán principalmente el tiempo requerido para el secado, que puede variar desde unas pocas horas hasta varios días (por ejemplo, 40-60 h). Opcionalmente, también se puede realizar una fase de secado secundario dependiendo del nivel de humedad residual deseado en el producto. La temperatura a la que se lleva a cabo el secado secundario varía de aproximadamente 0-40 °C, dependiendo principalmente del tipo y tamaño del recipiente y el tipo de proteína empleada. Por ejemplo, la temperatura de la bandeja durante toda la fase de eliminación de agua de la liofilización puede ser de aproximadamente 15-30 °C (por ejemplo, aproximadamente 20 °C). El tiempo y la presión requeridos para el secado secundario serán los que produzcan una torta liofilizada adecuada, dependiente, por ejemplo, de la temperatura y otros parámetros. El tiempo de secado secundario lo dicta el nivel de humedad residual deseado en el producto y típicamente toma al menos aproximadamente 5 horas (por ejemplo, 10-15 horas). La presión puede ser la misma que la empleada durante la etapa de secado primario. Las condiciones de liofilización se pueden variar dependiendo de la formulación y el tamaño del vial.

Antes de la administración al paciente, la formulación liofilizada se reconstituye con un diluyente farmacéuticamente aceptable, de modo que la concentración de proteína en la formulación reconstituida sea de al menos aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml, de forma alternativa de aproximadamente 80 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, de forma alternativa de aproximadamente 90 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. Dichas altas concentraciones de proteína en la formulación reconstituida se considera que son particularmente útiles cuando se pretende la administración subcutánea de la formulación reconstituida. Sin embargo, para otras vías de administración, tales como la administración intravenosa, se pueden desear concentraciones más bajas de la proteína en la formulación

reconstituida (por ejemplo, de aproximadamente 5-50 mg/ml, o de aproximadamente 10-40 mg/ml de proteína en la formulación reconstituida). En determinados modos de realización, la concentración de proteína en la formulación reconstituida es significativamente más alta que en la formulación preliofilizada. Por ejemplo, la concentración de proteína en la formulación reconstituida puede ser aproximadamente 2-40 veces, de forma alternativa 3-10 veces, de forma alternativa 3-6 veces (por ejemplo, al menos tres veces o al menos cuatro veces) la de la formulación preliofilizada.

En general, la reconstitución tiene lugar a una temperatura de aproximadamente 25 °C para asegurar una hidratación completa, aunque se pueden emplear otras temperaturas según se desee. El tiempo requerido para la reconstitución dependerá, por ejemplo, del tipo de diluyente, la cantidad de excipiente(s) y la proteína. Los diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyectables (BWF), una solución tamponada de pH (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. El diluyente contiene opcionalmente un conservante. Los conservantes ejemplares se han descrito anteriormente, siendo los alcoholes aromáticos tales como alcohol bencílico o fenol los conservantes preferentes. La cantidad de conservante empleado se determina evaluando diferentes concentraciones de conservante para pruebas de compatibilidad con la proteína y eficacia del conservante. Por ejemplo, si el conservante es un alcohol aromático (tal como alcohol bencílico), puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,1-2,0 % y preferentemente de aproximadamente 0,5-1,5 %, pero lo más preferentemente de aproximadamente 1,0-1,2 %.

Preferentemente, la formulación reconstituida tiene menos de 6000 partículas por vial que tienen un tamaño de $\geq 10 \mu\text{m}$.

Las formulaciones terapéuticas se preparan para su almacenamiento mezclando el ingrediente activo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.^a edición, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042 [1990]). Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, antioxidantes que incluyen ácido ascórbico, metionina, vitamina E, metabisulfito de sodio, conservantes, isotonicificadores, estabilizantes, complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína) y/o agentes quelantes tales como EDTA.

Cuando el agente terapéutico es un fragmento de anticuerpo, es preferente el fragmento más pequeño que se une específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar fragmentos de anticuerpo o incluso moléculas peptídicas que conservan la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Dichos péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producir por tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7889-7893 [1993]).

Los tampones se usan para controlar el pH en un intervalo que optimiza la eficacia terapéutica, especialmente si la estabilidad depende del pH. Los tampones están presentes preferentemente en concentraciones que varían de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. Los agentes tamponantes adecuados para su uso con la presente invención incluyen tanto ácidos orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos. Por ejemplo, citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato. Adicionalmente, los tampones pueden comprender sales de histidina y trimetilamina, tales como Tris.

Los conservantes se añaden para retardar el crecimiento microbiano, y típicamente están presentes en un intervalo de 0,2 %-1,0 % (p/v). Los conservantes adecuados para su uso con la presente invención incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), cloruro de bencetonio; timerosal, fenol, alcohol butílico o bencílico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol.

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

Los excipientes adicionales incluyen agentes que pueden servir como uno o más de los siguientes: (1) agentes de relleno, (2) potenciadores de solubilidad, (3) estabilizantes y (4) agentes que previenen la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Dichos excipientes incluyen: alditoles polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc.; glúcidos orgánicos o alditoles tales como sacarosa, lactosa, lactitol, trehalosa, estaquirosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioininitosa, mioininitol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitoles (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea,

5 glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular tales como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; monosacáridos (por ejemplo, xilosa, manosa, fructosa, glucosa; disacáridos (por ejemplo, lactosa, maltosa, sacarosa); trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrina o dextrano.

10 Las formulaciones deben ser estériles a fin de usarse para administración *in vivo*. La formulación se puede hacer estéril por filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones terapéuticas en el presente documento en general se disponen en un recipiente que tiene una boquilla de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

15 La vía de administración es de acuerdo con los procedimientos conocidos y aceptados, tales como por inyección intravenosa rápida o infusión única o múltiple durante un período de tiempo largo de una manera adecuada, por ejemplo, inyección o infusión por vías subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intrarterial, intralesional o intrarticular, administración tópica, inhalación o por medios de liberación mantenida o de liberación prolongada.

20 La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no afecten de forma adversa al otro. De forma alternativa, o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

25 Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.^a edición, *supra*.

30 Se pueden preparar preparados de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparados de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, en las que dichas matrices se encuentran en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas, o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación mantenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietilmetacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE. UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. La microencapsulación de proteínas recombinantes para la liberación mantenida se ha realizado con éxito con hormona del crecimiento humano (rhGH), interferón- (rhIFN-), interleucina-2 y MN rpg 120. Johnson *et al.*, *Nat. Med.* 2: 795-799 (1996); Yasuda *et al.*, *Biomed. Ther.* 27: 1221-1223 (1993); Hora *et al.*, *Bio/Technology* 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems", en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell and Newman, eds., (Plenum Press: Nueva York, 1995), pp. 439-462; documento WO 97/03692; documento WO 96/40072; documento WO 96/07399; y patente de EE. UU. n.º 5.654.010.

45 Las formulaciones de liberación mantenida de estas proteínas se pueden desarrollar usando un polímero de poli(ácido láctico-coglicólico) (PLGA) debido a su biocompatibilidad y su amplia gama de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico, se pueden aclarar rápidamente dentro del cuerpo humano. Además, la degradabilidad de este polímero se puede ajustar de meses a años dependiendo de su peso molecular y composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", en *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker; Nueva York, 1990), M. Chasin y R. Langer (Eds.) pp. 1-41.

50 Si bien polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, lo que da como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenia. Se pueden ingeniar estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través de intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los residuos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

65 También se pueden usar composiciones liposómicas o proteínoides para formular las proteínas o anticuerpos descritos en el presente documento. Véase las patentes de EE. UU. n.ºs 4.925.673 y 5.013.556.

5 La estabilidad de las proteínas y anticuerpos descritos en el presente documento se puede potenciar a través del uso de "sales de metales polivalentes solubles en agua" no tóxicas. Los ejemplos incluyen Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{3+} , Al^{2+} y Al^{3+} . Los ejemplos de aniones que pueden formar sales solubles en agua con los cationes metálicos polivalentes anteriores incluyen los formados a partir de ácidos inorgánicos y/o ácidos orgánicos. Dichas sales solubles en agua tienen una solubilidad en agua (a 20 °C) de al menos aproximadamente 20 mg/ml, de forma alternativa al menos aproximadamente 100 mg/ml, como alternativa al menos aproximadamente 200 mg/ml.

10 Los ácidos inorgánicos adecuados que se pueden usar para formar las "sales de metales polivalentes solubles en agua" incluyen ácido clorhídrico, acético, sulfúrico, nítrico, tiocianico y fosfórico. Los ácidos orgánicos adecuados que se pueden usar incluyen ácido carboxílico alifático y ácidos aromáticos. Los ácidos alifáticos dentro de esta definición se pueden definir como ácidos carboxílicos C_{2-9} saturados o insaturados (por ejemplo, ácidos mono-, di- y tricarboxílicos alifáticos). Por ejemplo, los ácidos monocarboxílicos ejemplares dentro de esta definición incluyen

15 los ácidos monocarboxílicos C_{2-9} saturados acético, propiónico, butírico, valérico, caproico, enántico, caprílico, pelargónico y capríónico, y los ácidos monocarboxílicos C_{2-9} insaturados ácidos acrílico, propiólico, metacrílico, crotónico y isocrotónico. Los ácidos dicarboxílicos ejemplares incluyen los ácidos dicarboxílicos C_{2-9} saturados malónico, succínico, glutárico, adípico y pimélico, mientras que los ácidos dicarboxílicos C_{2-9} insaturados incluyen los ácidos maléico, fumárico, citracónico y mesacónico. Los ácidos tricarboxílicos ejemplares incluyen los ácidos

20 tricarboxílicos C_{2-9} saturados ácido tricarbálico y 1,2,3-butanotricarboxílico. Adicionalmente, los ácidos carboxílicos de esta definición también pueden contener uno o dos grupos hidroxilo para formar ácidos hidroxicarboxílicos. Los ácidos hidroxicarboxílicos ejemplares incluyen ácido glicólico, láctico, glicérico, tartrónico, málico, tartárico y cítrico. Los ácidos aromáticos dentro de esta definición incluyen ácido benzoico y salicílico.

25 Las sales de metales polivalentes solubles en agua comúnmente empleadas que se pueden usar para ayudar a estabilizar los polipéptidos encapsulados de la presente invención incluyen, por ejemplo: (1) las sales metálicas de ácidos inorgánicos de haluros (por ejemplo, cloruro de cinc, cloruro de calcio), sulfatos, nitratos, fosfatos y tiocianatos; (2) las sales metálicas de ácidos carboxílicos alifáticos (por ejemplo, acetato de calcio, acetato de cinc, propionato de calcio, glicolato de cinc, lactato de calcio, lactato de cinc y tartrato de cinc); y (3) las sales metálicas

30 de ácidos carboxílicos aromáticos de benzoatos (por ejemplo, benzoato de cinc) y salicilatos.

Para la prevención o tratamiento de enfermedades, la dosificación apropiada de un agente activo dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, como se define anteriormente, la gravedad y la evolución de la enfermedad, si el agente se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, el tratamiento previo, la anamnesis del

35 paciente y la reacción al agente, y la discreción del médico especialista. El agente se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

El procedimiento de la invención se puede combinar con procedimientos conocidos de tratamiento para un trastorno, como etapas de tratamientos combinados o adicionales o bien como componentes adicionales de una

40 formulación terapéutica.

Las dosificaciones y concentración de fármaco deseada de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso particular concebido. La determinación de la dosificación o vía de administración apropiada está por completo dentro de la experiencia de un experto en la técnica. Los experimentos

45 con animales proporcionan una guía fiable para la determinación de dosis eficaces para el tratamiento humano. El ajuste a escala entre especies de las dosis eficaces se puede realizar siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics", en *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *et al.*, Eds, Pergamon Press, Nueva York 1989, pp. 42-46.

50 Cuando se usa la administración *in vivo* de los polipéptidos o anticuerpos descritos en el presente documento, las cantidades de dosificación normales pueden variar desde aproximadamente 10 ng/kg hasta aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. En la literatura se proporciona orientación sobre dosificaciones y procedimientos de administración particulares; véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º

55 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Está dentro del alcance de la invención que diferentes formulaciones sean eficaces para diferentes tratamientos y diferentes trastornos, y que la administración destinada a tratar un órgano o tejido específico puede requerir el suministro de una manera diferente a la de otro órgano o tejido. Además, las dosificaciones se pueden administrar por una o más administraciones separadas, o por infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, se mantiene el tratamiento hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. La evolución de este tratamiento se sigue fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

60

Las formulaciones de la presente invención, que incluyen pero no se limitan a formulaciones reconstituidas, se administran a un mamífero que necesita tratamiento con la proteína, preferentemente un ser humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa como una inyección intravenosa rápida o

65

por infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intrarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación.

En modos de realización preferentes, las formulaciones se administran al mamífero por administración subcutánea (es decir, debajo de la piel). Para dichos propósitos, la formulación se puede inyectar usando una jeringuilla. Sin embargo, otros dispositivos para la administración de la formulación están disponibles, tales como dispositivos de inyección (por ejemplo, los dispositivos Inject-ease™ y Genject™); plumas de inyección (tales como la GenPen™); dispositivos de autoinyección, dispositivos sin agujas (por ejemplo, MediJector™ y BioJector™); y sistemas de administración de parches subcutáneos.

En un modo de realización específico, la presente invención está dirigida a kits para una única unidad de administración de dosis. Dichos kits comprenden un recipiente de una formulación acuosa de proteína o anticuerpo terapéutico, que incluye jeringuillas precargadas tanto de cámara individual como de cámaras múltiples. Las jeringuillas precargadas ejemplares están disponibles en Vetter GmbH, Ravensburg, Alemania.

La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") de la proteína dependerá, por ejemplo, de la afección que se va a tratar, la gravedad y evolución de la afección, si la proteína se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, el tratamiento previo, la anamnesis del paciente y reacción a la proteína, el tipo de proteína usada, y la discreción del médico especialista. La proteína se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos y se puede administrar al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. La proteína se puede administrar como el único tratamiento o junto con otros fármacos o tratamientos útiles en el tratamiento de la afección en cuestión.

Cuando la proteína de elección sea un anticuerpo, de aproximadamente 0,1-20 mg/kg es una dosificación inicial candidata para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de este tratamiento se sigue fácilmente por técnicas convencionales.

En otro modo de realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene la formulación y preferentemente proporciona instrucciones para su uso. El artículo de fabricación comprende un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (por ejemplo, viales de doble cámara), jeringuillas (tales como jeringuillas de cámara individual o de doble cámara) y tubos de ensayo. El recipiente se puede formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. La etiqueta, que está en, o asociada con, el recipiente que contiene la formulación puede indicar instrucciones para su reconstitución y/o uso. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o está destinada a la administración subcutánea. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial multiuso, que permite administraciones repetidas (por ejemplo, de 2-6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado (por ejemplo, BWF1). Tras mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final de proteínas en la formulación reconstituida será generalmente de al menos 50 mg/ml. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos del envase con instrucciones para su uso.

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

EJEMPLO 1 - Investigación del efecto de los ácidos grasos, polisorbatos y POE-sorbitano en la agregación de proteínas

Este ejemplo ilustra cómo los polisorbatos, ácidos grasos y POE sorbitano afectan la agregación de proteínas en solución acuosa.

Se evaluó la acción protectora de POE sorbitano frente a la agregación inducida por agitación de un anticuerpo monoclonal anti-IL13 en solución usando un análisis de agregación de proteínas inducida por agitación. Específicamente, en este estudio, se prepararon soluciones tamponadas que contenían 1 mg/ml de anticuerpo monoclonal anti-IL13 (His-OAc 20 mM, pH 5,7) en combinación con los siguientes aditivos potencialmente estabilizantes:

(i) sin aditivos, control;

(ii) ácido láurico (29 ppm);

(iii) ácido láurico (29 ppm) y polisorbato 20 (24 ppm);

(iv) POE sorbitano 20 "(a+b+c+d = 20)" (150 ppm);

(v) POE sorbitano 20 "(a+b+c+d = 20)" (150 ppm) y polisorbato 20 (24 ppm);

(vi) POE sorbitano 20 "(a+b+c+d = 20)" (150 ppm) y ácido láurico (29 ppm);

(vii) POE sorbitano 20 "(a+b+c+d = 20)" (150 ppm), ácido láurico (29 ppm) y polisorbato 20 (24 ppm);

(viii) polisorbato 20 (24 ppm).

Se depositaron nueve ml de la formulación que contenía el anticuerpo monoclonal en viales de Forma Vitrium de 15 ml (por triplicado) separados, se sellaron los viales y a continuación se dejaron agitar en un agitador de mesa (a 70 rpm) a temperatura ambiente durante 0 horas, 4 horas. o 24 horas. Tras finalización, se sometió inmediatamente el contenido de cada vial a análisis de espectrometría UV (340-360 nm) para medir la turbidez de la solución. Se obtuvo la turbidez a 25 °C usando una celda de 1 cm de longitud de trayectoria y un espectrómetro UV Agilent 8453. Se promediaron los valores de absorbancia a 340, 345, 350, 355 y 360 nm, donde ninguno de los cromóforos de las formulaciones de proteína absorbe y se pueden determinar los efectos de dispersión de los agregados de proteínas insolubles. Los valores de absorbancia promediados en las longitudes de onda anteriores representan la turbidez de la muestra. A este respecto, es bien conocido en la técnica que la turbidez de una solución que contiene proteínas se correlaciona directa y cuantitativamente con la cantidad de agregación de proteínas en la solución (por ejemplo, véase Dani *et al.*, J. Pharm. Sci., 96(6): 1504-1517 (2007)). Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 1.

Los datos mostrados en la figura 1 demuestran que determinados degradantes de polisorbato (incluyendo el ácido graso, ácido láurico) tienen un efecto adverso sobre la estabilidad de las proteínas en solución acuosa y provocan la agregación de proteínas tras la agitación. Por el contrario, la adición de POE sorbitano a las soluciones acuosas que contienen anticuerpos previno la formación de agregados de proteínas en solución tras la agitación. Por lo tanto, estos datos demuestran que el POE sorbitano tiene el efecto de prevenir la agregación de proteínas tras la agitación y, de ahí que, potencia la estabilidad de las proteínas terapéuticas en solución.

EJEMPLO 2 - Investigación del efecto de POE-sorbitano y PEG en la agregación de proteínas

Este ejemplo ilustra el uso de POE sorbitanos y PEG como estabilizantes para prevenir o reducir la agregación de proteínas.

Se evaluó la acción protectora de diversos POE sorbitanos y PEG frente a la agregación inducida por agitación de dos anticuerpos monoclonales, anti-IL13 y anti-IgE, en solución usando un análisis de agregación de proteínas inducida por agitación.

En este conjunto de estudios, se prepararon soluciones tamponadas que contenían 1 mg/ml de anticuerpo anti-IL13 (His-OAc 20 mM, pH 5,7) o bien anticuerpo anti-IgE (His-HisCl, pH 6,0) con los siguientes aditivos:

(i) sin aditivos, control;

(ii) POE sorbitano 20 "(a+b+c+d = 20)" en una concentración de 200 ppm;

(iii) POE sorbitano 20 "(a+b+c+d = 20)" en una concentración de 1000 ppm;

(iv) POE sorbitano 20 "(a+b+c+d = 20)" en una concentración de 5000 ppm;

(v) PEG 1000 en una concentración de 200 ppm;

(vi) PEG 1000 en una concentración de 1000 ppm;

(vii) PEG 1000 en una concentración de 5000 ppm;

(viii) PEG 6000 en una concentración de 200 ppm;

(ix) PEG 6000 en una concentración de 1000 ppm;

(x) PEG 6000 en una concentración de 5000 ppm.

Se depositaron nueve ml de cada formulación que contenía anticuerpo en viales de Forma Vitrium de 15 ml (por triplicado) separados, se sellaron los viales y a continuación se dejaron agitar en un agitador de mesa (a 70 rpm) a temperatura ambiente durante 0 horas, 4 horas o 24 horas. Tras finalización, se sometió inmediatamente el contenido de cada vial a cada uno de los siguientes análisis, (a) análisis de espectrometría UV para medir la concentración de proteína después de la filtración, (b) análisis de espectrometría UV (340-360 nm) para medir la turbidez de la solución, y (c) oscurecimiento ligero para la determinación del tamaño y distribución de partículas de proteínas.

A. Espectrometría UV para medir la concentración de proteína

5 Inmediatamente después de someterse a agitación enérgica como se describe anteriormente, se filtraron las
 soluciones que contenían proteínas para eliminar los agregados de proteínas y a continuación se determinó la
 concentración de proteína en el filtrado por espectrometría UV. Se obtuvieron los datos de concentración de
 proteína a 25 °C usando una celda de 0,5 o 1 cm de longitud de trayectoria y un espectrómetro UV Agilent 8453.
 Se usó un coeficiente de extinción E de 1,45 y 1,60 ml mg⁻¹ cm⁻¹ a 278 nm para determinar las concentraciones de
 anticuerpo después de la filtración a través de un filtro de jeringuilla de 0,2 µm. Se restaron los valores de
 10 absorbancia a 320 nm del valor de absorbancia a 278 nm para tener en cuenta los efectos de dispersión. A este
 respecto, es bien conocido en la técnica que la concentración de proteína en una solución que contiene proteínas
 se puede medir cuantitativamente usando análisis de absorbancia UV (por ejemplo, véase Liu *et al.*, J. Pharm. Sci.,
 94(9): 1928-1940 (2005)). Los resultados de los datos obtenidos para el anticuerpo anti-IL13 y el anticuerpo anti-
 IgE se muestran en las figuras 2 y 3, respectivamente.

15 Los datos en las figuras 2 y 3 demuestran que la agitación de las formulaciones de anticuerpo de control no tratadas
 indujo una agregación mensurable y significativa y una pérdida de proteínas tras la filtración. Por el contrario, la
 adición de POE sorbitano o PEG en todas las diversas concentraciones sometidas a prueba previno la formación
 de agregados de proteínas inducidos por agitación y, de ahí, la pérdida de proteínas tras la filtración. Estos datos
 demuestran que tanto el POE sorbitano como el polietilenglicol funcionan como estabilizantes eficaces de proteínas
 20 en soluciones acuosas al prevenir o reducir la formación de agregados de proteínas en las mismas.

B. Espectrometría UV para medir la turbidez de la solución

25 Como se describe anteriormente, la espectrometría UV a 340-360 nm proporciona un medio eficaz para determinar
 cuantitativamente la cantidad de agregado de proteínas presente en solución, en la que la turbidez se correlaciona
 directamente con la cantidad de proteínas agregadas presentes. Los resultados obtenidos de los análisis de
 turbidez para el anticuerpo anti-IL13 y el anticuerpo anti-IgE se muestran en las figuras 4 y 5, respectivamente.

30 Los datos en las figuras 4 y 5 demuestran que la agitación de las formulaciones de anticuerpo de control no tratadas
 indujo una agregación mensurable y significativa de los anticuerpos en las mismas. Por el contrario, la adición de
 POE sorbitano o PEG en todas las diversas concentraciones sometidas a prueba previno y/o redujo la formación
 de agregados de proteínas inducidos por agitación. Estos datos demuestran que tanto el POE sorbitano como el
 polietilenglicol funcionan como estabilizantes eficaces de proteínas en soluciones acuosas al prevenir o reducir la
 35 formación de agregados de proteínas en las mismas.

C. Determinación de la distribución del tamaño de partícula

40 Se analizaron también las soluciones acuosas que contienen anticuerpos descritas anteriormente para determinar
 la distribución del tamaño de partícula de las proteínas contenidas en las mismas. Específicamente, se midieron el
 número y tamaño de partículas insolubles entre 2 a 50 µm a temperatura ambiente usando un contador de
 partículas líquidas HIAC/Royco 9703 conectado a un muestreador de jeringuilla de líquidos HIAC/Royco 3000A,
 un sensor HRLD-150 y se analizaron usando el programa informático PacificSpec versión 2.0. El límite superior de
 45 detección es ~18000 partículas/ml y las muestras que exceden este umbral se diluyeron apropiadamente para la
 medición. Cada muestra se midió cuatro veces en un volumen de 1,0 ml por inyección. La primera inyección se
 descartó y se obtuvo el valor medio de las últimas tres inyecciones. Entre cada análisis de muestra, el sistema se
 enjuagó con agua para inyectables hasta el punto en el que los recuentos de partículas de 2 µm del aparato eran
 <10. Las partículas subvisibles ≥ 2, 5, 10, 15, 25, 35 y 50 µm se presentan como recuentos acumulados por ml.

50 Los resultados obtenidos de estos análisis se muestran en las figuras 6-11. Los datos en las figuras 6-11
 demuestran que la agitación de las formulaciones de anticuerpo de control no tratadas indujo una agregación
 mensurable y significativa de los anticuerpos en las mismas. Por el contrario, la adición de POE sorbitano o PEG
 en todas las diversas concentraciones sometidas a prueba previno y/o redujo la formación de agregados de
 proteínas inducidos por agitación. Estos datos demuestran que tanto el POE sorbitano como el polietilenglicol
 55 funcionan como estabilizantes eficaces de proteínas en soluciones acuosas al prevenir o reducir la formación de
 agregados de proteínas en las mismas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición acuosa estable de materia que comprende una proteína y un polioxietileno (POE) sorbitano, en la que dicho POE sorbitano está presente en una concentración de desde aproximadamente 150 ppm a 10.000 ppm, y en la que dicha composición está libre de polisorbato.
2. La composición de materia de la reivindicación 1, en la que dicho POE sorbitano se selecciona del grupo que consiste en POE sorbitano 10, POE sorbitano 20, POE sorbitano 40 y POE sorbitano 80.
- 10 3. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1 o 2, que comprende además un polietilenglicol.
4. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que dicha proteína es un anticuerpo.
- 15 5. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que está libre de un tensioactivo.
- 20 6. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes que está en forma acuosa o en forma liofilizada.
7. Un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene la composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
- 25 8. Un procedimiento de incremento de la estabilidad y/o reducción de la agregación de una proteína en solución acuosa, comprendiendo dicho procedimiento mezclar dicha proteína con un POE sorbitano, en el que dicho POE sorbitano incrementa la estabilidad y/o reduce la agregación de dicha proteína en solución acuosa; y en el que dicho procedimiento proporciona una composición acuosa de materia de acuerdo con la reivindicación 1.
- 30 9. El procedimiento de la reivindicación 8, en el que dicho POE sorbitano se selecciona del grupo que consiste en POE sorbitano 10, POE sorbitano 20, POE sorbitano 40 y POE sorbitano 80.
- 35 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 8 o 9, en el que dicha proteína es un anticuerpo.

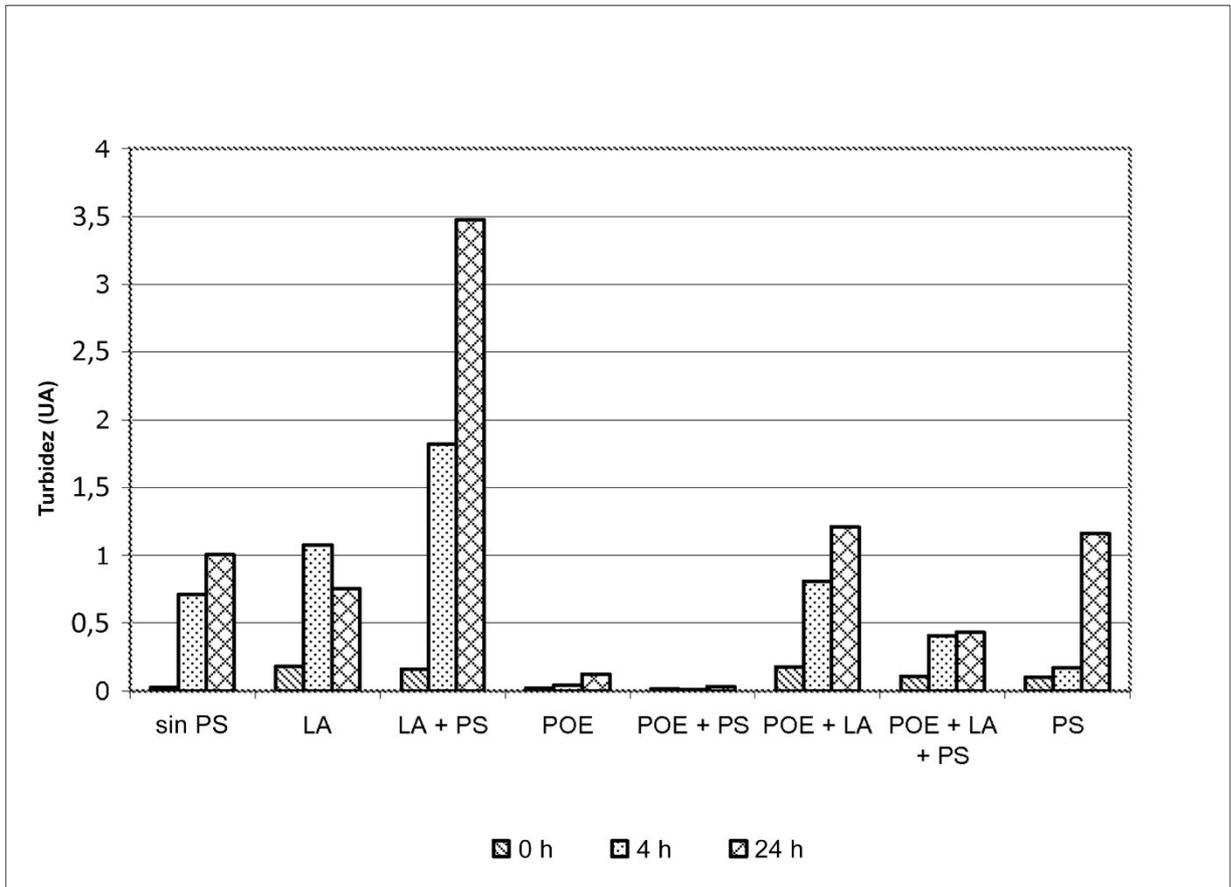


FIG. 1

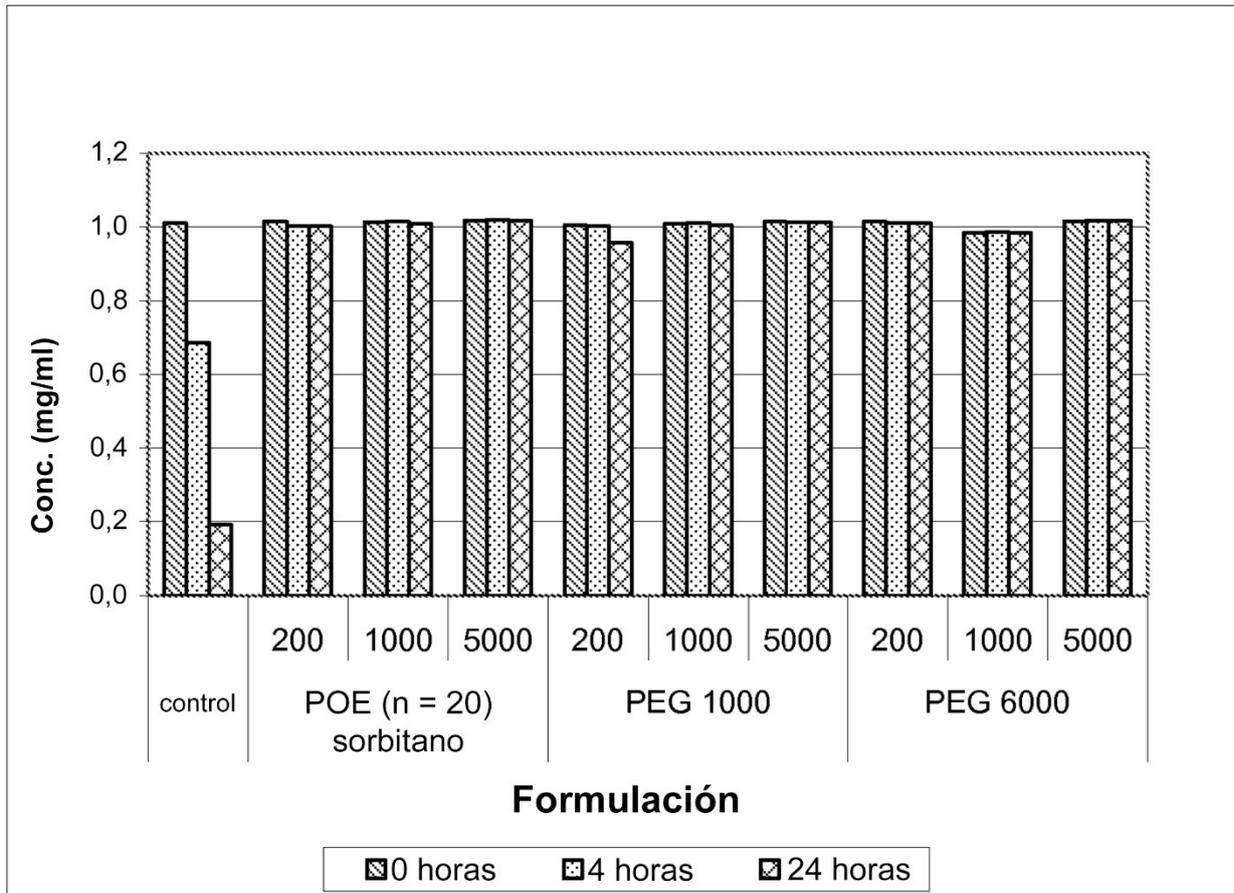


FIG. 2

FIG. 3



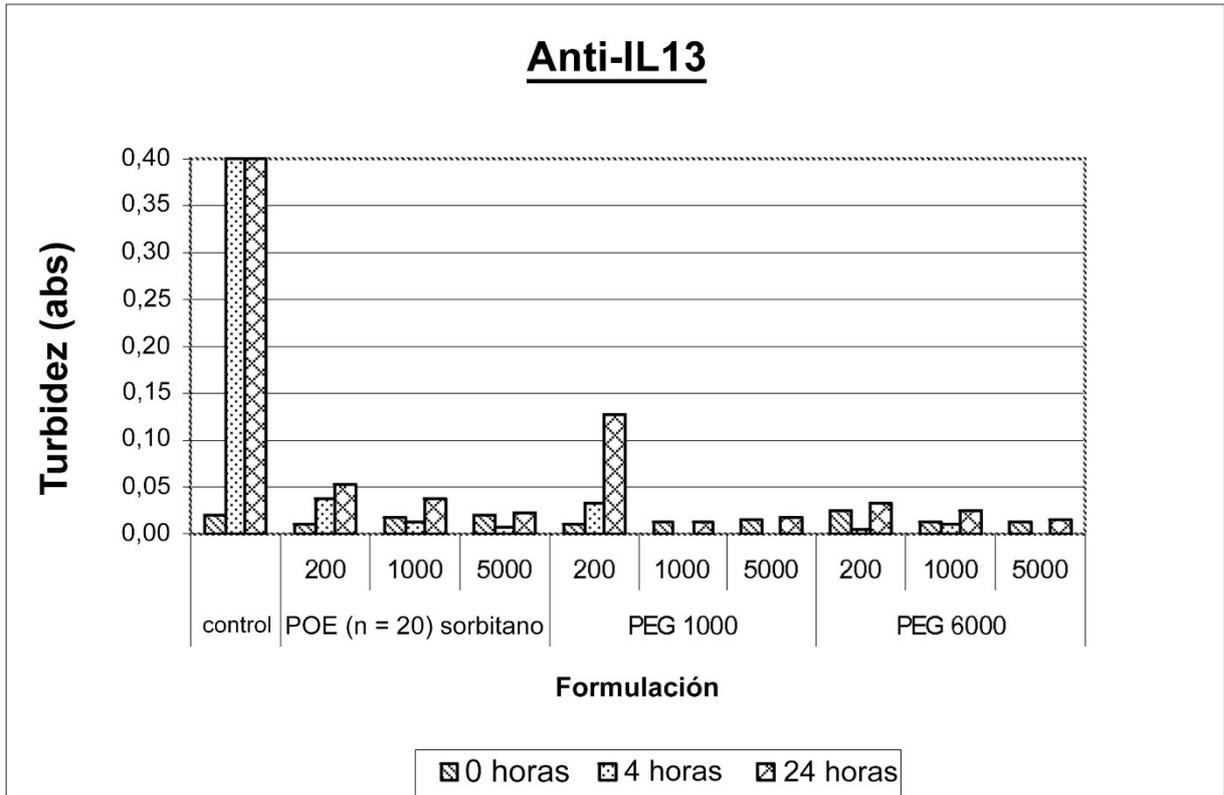
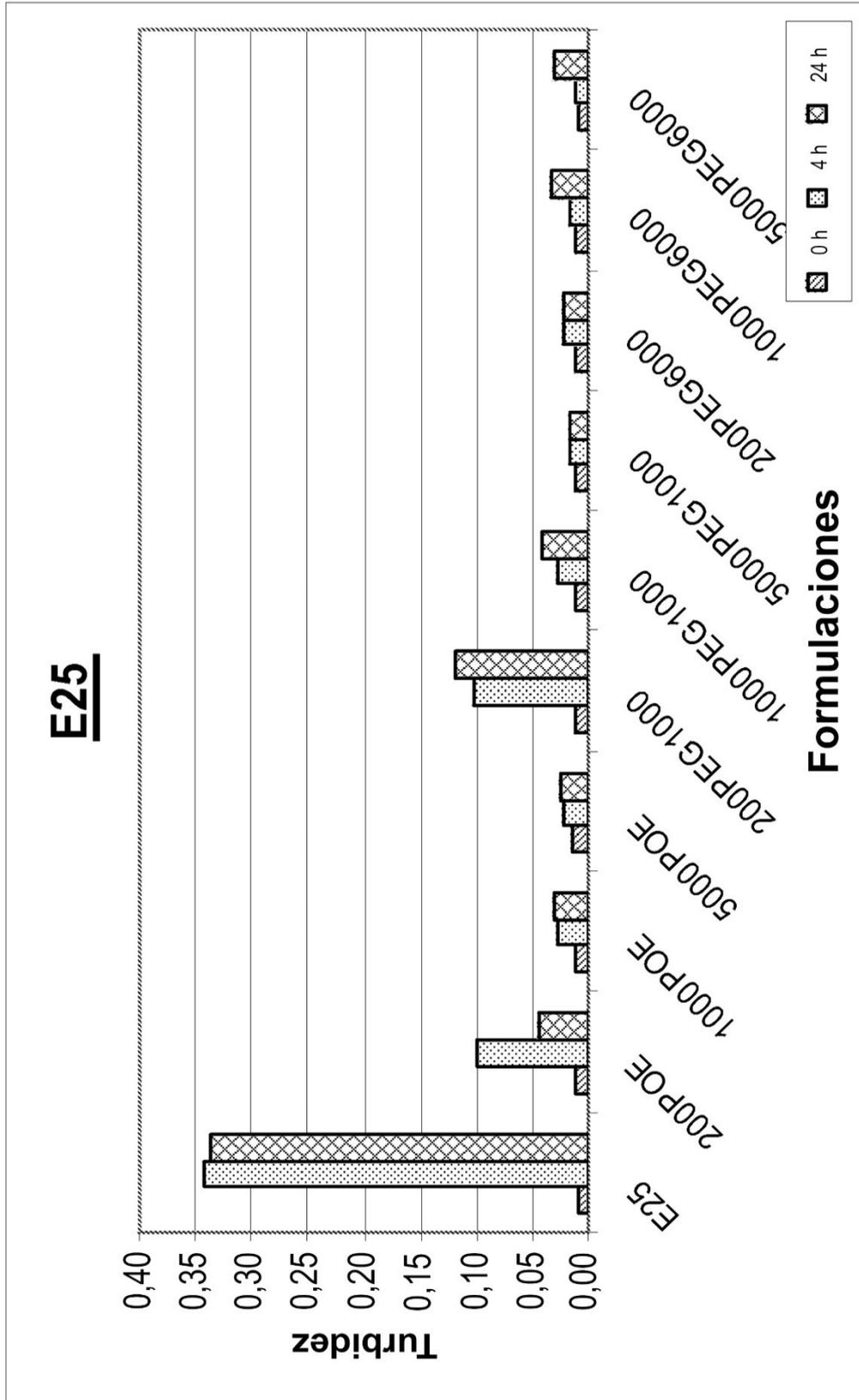


FIG. 4

FIG. 5



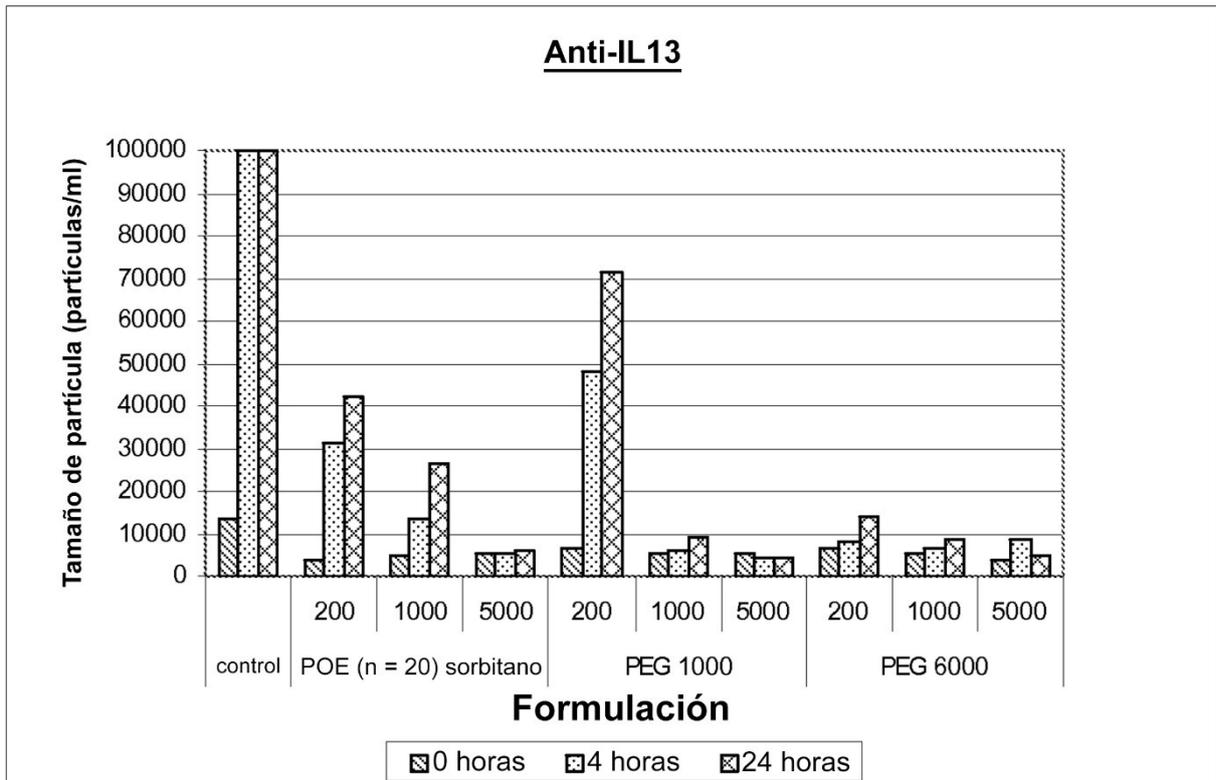
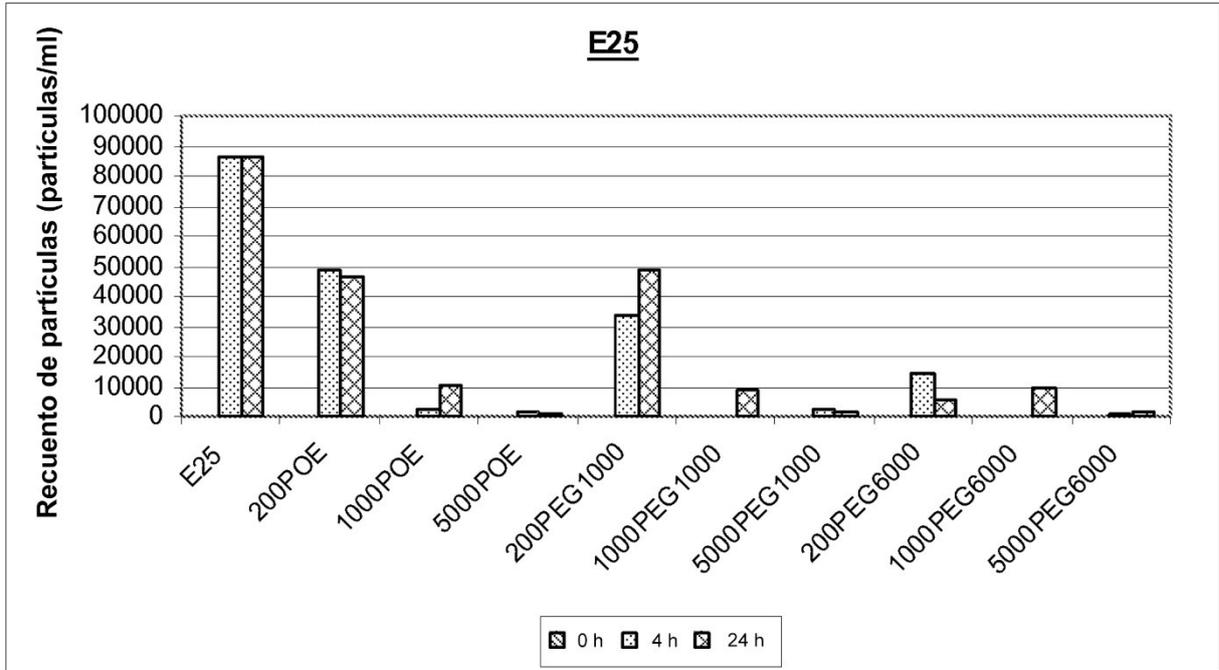


FIG. 6

FIG. 7



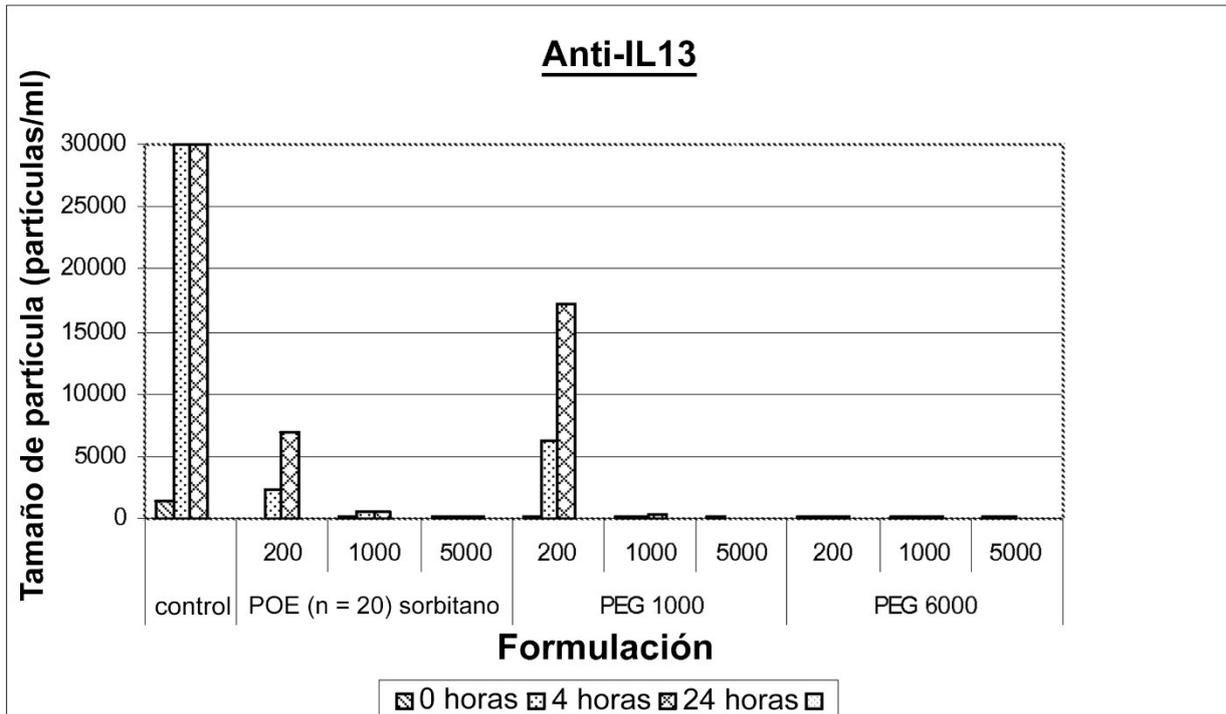


FIG. 8

FIG. 9

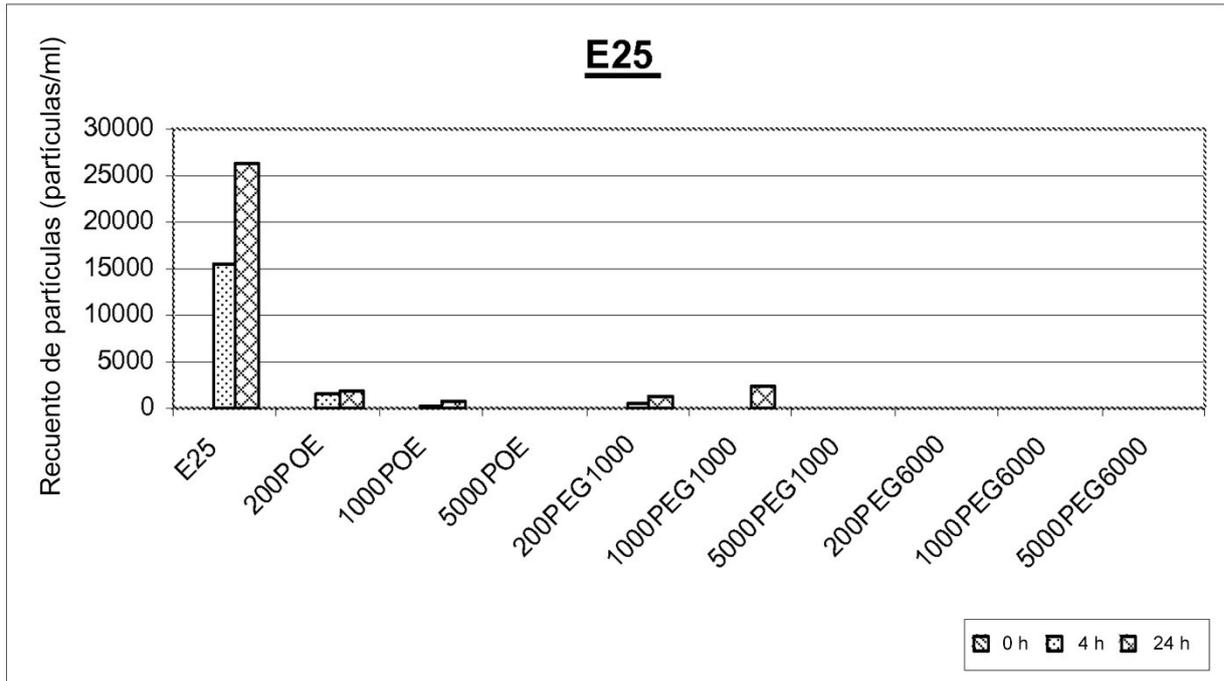


FIG. 10

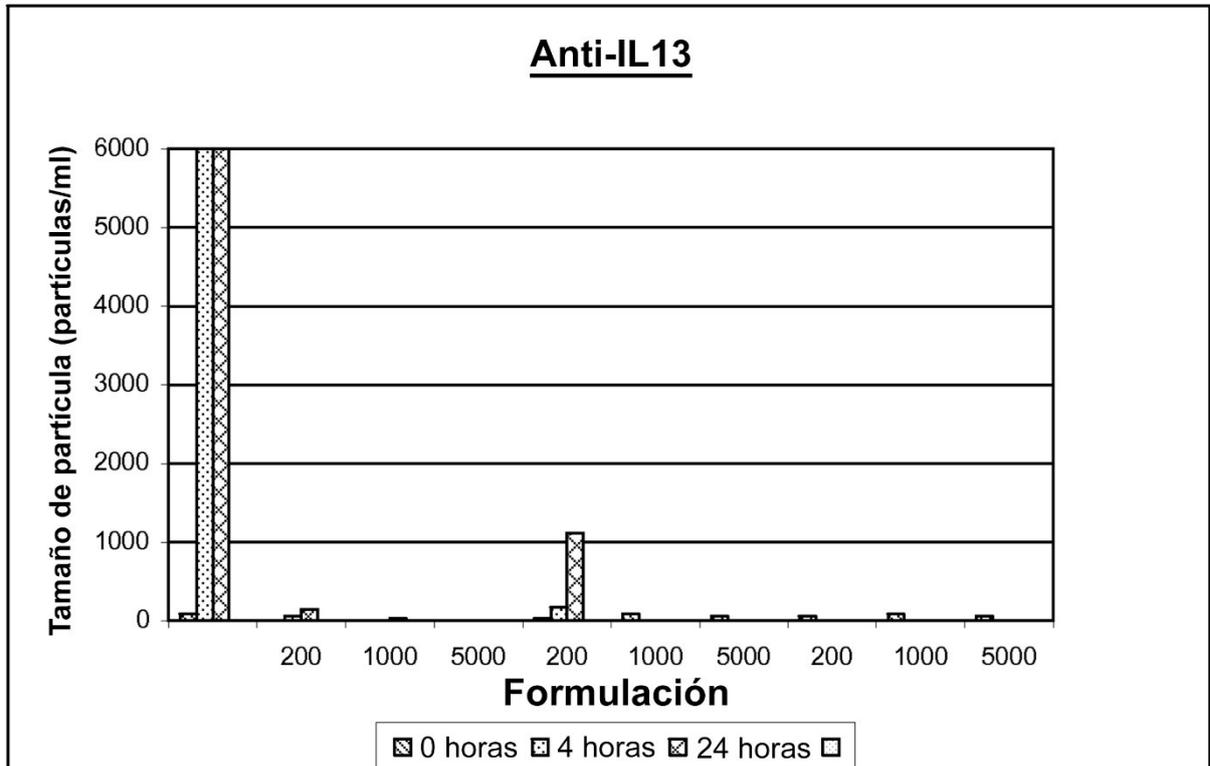


FIG. 11

