

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 749 977**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16	(2006.01)
A61K 9/50	(2006.01)
A61K 38/17	(2006.01)
C07K 16/24	(2006.01)
A61K 38/27	(2006.01)
C07K 1/113	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.07.2011 PCT/US2011/044485**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.01.2012 WO12012388**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.07.2011 E 11810258 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 2600843**

54 Título: **Composiciones de proteínas terapéuticas que tienen inmunogenia reducida y/o eficacia mejorada**

30 Prioridad:

19.07.2010 US 365728 P

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

24.03.2020

73 Titular/es:

**PRESSURE BIOSCIENCES, INC. (50.0%)
14 Norfolk Avenue
South Easton, MA 02375, US y
THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF
COLORADO, A BODY CORPORATE (50.0%)**

72 Inventor/es:

**SEEFELDT, MATTHEW;
RANDOLPH, THEODORE W.;
FRADKIN, AMBER HAYNES y
CARPENTER, JOHN**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 749 977 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 de proteínas terapéuticas que tienen inmunogenia reducida y/o eficacia mejorada

5 **Prioridad**

La presente solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud Provisional de los EE.UU. N.º 61/365.728, presentada el 19 de julio de 2010, que se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.

10 **Declaración de apoyo gubernamental**

La presente invención se realizó con el apoyo del gobierno con el número de subvención R01-EB006006 otorgada por los Institutos Nacionales de Salud de los EE.UU. El gobierno tiene determinados derechos en la invención.

15 **Antecedentes**

Las proteínas terapéuticas recombinantes han tenido un impacto significativo en el tratamiento clínico de enfermedades, incluyendo el cáncer, en las últimas décadas. Existen más de 630 proteínas y péptidos recombinantes en desarrollo comercial y las opciones terapéuticas derivadas de proteínas continúan creciendo rápidamente con respecto a las opciones terapéuticas de moléculas pequeñas. A medida que entran más proteínas recombinantes en el mercado farmacéutico, los riesgos potenciales asociados a estos productos son cada vez más preocupantes. En particular, las proteínas terapéuticas, a diferencia de las moléculas pequeñas, pueden ser inestables y propensas a la agregación (Chi et al., *Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation*, *Pharmaceutical Research* 20 (9): 1325-1336 (2003)). La agregación de proteínas puede comprometer la seguridad y la eficacia del producto.

Aunque la industria y las agencias reguladoras son conscientes de la agregación y tienen políticas y directrices para su detección en composiciones de proteínas terapéuticas, algunos agregados aún siguen sin detectarse, en parte debido a limitaciones de las técnicas analíticas aceptadas convencionalmente. Por ejemplo, la USP actualmente no tiene directrices para la detección de partículas de 0,1 a 10 micrómetros de tamaño. Los agregados de proteínas de menos de 0,1 micrómetros se detectan mediante métodos analíticos tales como la cromatografía de exclusión por tamaño, y las partículas de más de 10 micrómetros se detectan mediante la técnica de oscurecimiento de luz USP <788>. No hay recomendaciones claras para la detección de partículas de más de aproximadamente 0,1 micrómetros, pero de menos de aproximadamente 10 micrómetros y no se ha demostrado la importancia de estas partículas para el potencial inmunógeno del producto. Esta brecha en la detección de partículas subvisibles deja una oportunidad para que existan agregados de proteínas en productos comerciales aprobados y productos biológicos actuales que están en desarrollo.

La agregación de proteínas se produce debido a la inestabilidad coloidal o de conformación que permite que las proteínas se ensamblen con la pérdida simultánea de estructura y actividad nativas. Las agresiones tales como la congelación-descongelación, la agitación (por ejemplo, la superficie de contacto aire-agua) y la exposición a la luz ultravioleta se encuentran habitualmente durante el procesamiento, el envío y el almacenamiento de un producto terapéutico y se sabe que agregan proteínas (Chi et al. 2003). Los agregados también pueden generarse durante la purificación de proteínas a medida que la proteína se mueve a través de diversos intercambios de soluciones a concentraciones altas de proteínas en las superficies de las columnas. La agregación de proteínas puede transcurrir a través de vías específicas que se inician por la inestabilidad de la conformación nativa de las proteínas o la inestabilidad de coloide asociada a las interacciones proteína-proteína. Las condiciones tales como la temperatura, el pH de la solución, los ligandos y los cosolutos, el tipo y la concentración de sal, los conservantes y los tensioactivos modulan la estructura de la proteína y las interacciones proteína-proteína y, por tanto, la propensión a la agregación.

Los agregados producidos como resultado de diferentes agresiones pueden presentar diferentes distribuciones de tamaño y sus proteínas componentes pueden contener diferentes estructuras secundarias y terciarias, que presumiblemente exponen diferentes epítomos, lo que puede provocar respuestas inmunitarias (Seefeldt et al., *High-pressure studies of aggregation of recombinant human interleukin1 receptor antagonist: thermodynamics, kinetics, and application to accelerated formulation studies*, *Protein Sci.* 14 (9): 2258-66 (2005)).

Los agregados de proteínas presentes en las composiciones de proteínas terapéuticas pueden no ser reconocidos como "naturales" por el sistema inmunitario. Esto podría deberse a la exposición de un nuevo epítomo en la proteína agregada que no está expuesto en la proteína no agregada, o a la formación en el agregado de un nuevo epítomo, con el resultado de que el sistema inmunitario se sensibiliza al agregado de proteína recombinante administrado. Mientras que en algunos casos el sistema inmunitario produce anticuerpos contra los agregados que no neutralizan el efecto terapéutico de la proteína, en otros casos, se producen anticuerpos que se unen a la proteína recombinante e interfieren con la actividad terapéutica, lo que da como resultado una disminución de la eficacia de la proteína terapia.

La administración repetida de una proteína recombinante puede provocar reacciones inmunitarias agudas y crónicas (Schellekens, H., *Nephrol. Dial. Transplant.* 18: 1257 (2003); Schellekens, H., *Nephrol. Dial. Transplant.* 20 [Supl. 6]: vi3-vi9 (2005); Purohit et al. *J. Pharm. Sci.* 95: 358 (2006)). Esta pérdida o "ruptura" de la tolerancia puede tener graves efectos, incluyendo el desarrollo de enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, tras la administración repetida de una proteína recombinante, la tolerancia puede romperse, y una respuesta inmunitaria producida contra la proteína recombinante puede reaccionar de forma cruzada con la proteína endógena del individuo. Se demostró un mecanismo para romper la auto tolerancia en ratones transgénicos inmunotolerantes al interferón alfa 2 humano. Cuando se administraron preparaciones que contenían agregados de interferón alfa 2b humano recombinante a los ratones, los ratones perdieron la tolerancia al interferón alfa 2 de manera dependiente de la dosis (véase Hermeling et al., *J Pharm Sci.* 95: 1084 (2006)).

Se observó una pérdida de tolerancia a una proteína producida endógenamente en pacientes que usaban una preparación de eritropoyetina recombinante. Se descubrió que determinadas preparaciones de eritropoyetina comercializadas con la marca comercial EPREX (Johnson & Johnson, New Brunswick, Nueva Jersey) en Europa rompen la tolerancia inmunitaria de los pacientes a su propia eritropoyetina endógena, lo que conduce a aplasia de glóbulos rojos pura (AGRP) mediada por anticuerpos. La preparación de eritropoyetina exógena, que se administró para corregir una deficiencia en la producción de glóbulos rojos, provocó que el sistema inmunitario del paciente produjese anticuerpos que neutralizaron la eritropoyetina producida endógenamente, provocando un bloqueo completo de la diferenciación de los glóbulos rojos. La causa de la respuesta inmunitaria se ha atribuido a los lixiviados en la preparación que formaron adyuvantes con eritropoyetina (Boven et al., *Nephrol. Dial. Transplant.* 20 Supl 3: iii33 (2005)), aunque otros factores, tales como los agregados, también pueden estar implicados (Schellekens y Jiskoot, *Nature Biotech.* 24: 613 (2006)).

En consecuencia, se necesitan nuevas estrategias de modificación por ingeniería genética y fabricación de proteínas para minimizar la inmunogenia de proteínas terapéuticas y mejorar la eficacia de la terapia.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona métodos para reducir y/o evaluar el potencial inmunógeno de una preparación de proteínas terapéuticas. La presente invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas de proteínas terapéuticas y métodos de tratamiento con las mismas, las composiciones que tienen bajo potencial inmunógeno y/o eficacia mejorada. La divulgación logra estos objetivos mediante la evaluación de preparaciones de proteínas terapéuticas para partículas subvisibles, que pueden contribuir significativamente al potencial inmunógeno general de la preparación de proteínas. Adicionalmente, manteniendo el contenido de dichas partículas subvisibles por debajo de un nivel inmunógeno, es menos probable que la composición farmacéutica resultante dé como resultado una pérdida de tolerancia (por ejemplo, tras la administración repetida), mejorando de este modo tanto el perfil de seguridad como la eficacia de la opción terapéutica.

Por tanto, en un aspecto, la divulgación proporciona un método para evaluar una preparación de proteínas terapéuticas para determinar su potencial inmunógeno. La divulgación comprende el uso de formación de imágenes de micro-flujo (IMF), u otra metodología tal como difracción láser y/o contador Coulter, para evaluar el número, los tamaños y/o las formas de las partículas en muestras de proteínas y en particular en el intervalo subvisible (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 micrómetros o de 0,1 a aproximadamente 10 micrómetros de tamaño). La presencia y/o el nivel de dichas partículas subvisibles son indicativos de una preparación inmunógena.

De acuerdo con la invención, el agente terapéutico puede ser una preparación de proteínas recombinantes. De acuerdo con la invención, la proteína terapéutica comprende un anticuerpo monoclonal (que puede ser quimérico o humanizado), un dominio de unión a antígeno o anticuerpo monocatenario, o una proteína que contiene un dominio Fc (por ejemplo, ENBREL), o es una interleucina o interferón (por ejemplo, un interferón alfa, interferón beta o interferón gamma), hormona proteínica o peptídica o factor de crecimiento (por ejemplo, insulina, GLP, eritropoyetina, GM-CSF u hormona de crecimiento humana), factor de coagulación (por ejemplo, Factor VII, Factor VIII), o enzima para la terapia de reemplazo (por ejemplo, uricasa, MYOZYME, fenilalanina hidroxilasa o fenilalanina amoniaco liasa). La proteína puede producirse de forma recombinante en un sistema de expresión de *E. coli*, levadura o mamífero (por ejemplo, células CHO) y a escala de laboratorio o escala de fabricación. La proteína puede recuperarse de las células en forma soluble o puede recuperarse en forma insoluble (por ejemplo, cuerpos de inclusión) y puede solubilizarse para su evaluación.

La preparación de proteínas, por ejemplo, antes de la evaluación y/o el tratamiento para reducir la inmunogenia como se describe en el presente documento, puede estar sustancialmente libre de agregados visibles como se determina mediante oscurecimiento de luz, por ejemplo, y/o puede estar sustancialmente libre de partículas subvisibles pequeñas de menos de aproximadamente 0,1 micrómetros de tamaño como se determina, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por tamaño. La preparación de proteínas puede tener más de aproximadamente el 90 %, o aproximadamente el 95 %, o aproximadamente el 99 % de proteína monomérica. En algunas realizaciones, la preparación de proteínas es sustancialmente cromatográficamente pura. En este contexto, "sustancialmente cromatográficamente pura" significa que la preparación de proteínas no contiene agregados

detectables mediante análisis por CET o contiene menos del 1 % de agregados en peso de proteína mediante análisis por CET.

5 En otro aspecto, la invención proporciona un método para reducir la inmunogenia de una proteína terapéutica y/o formular una proteína terapéutica de manera que tenga un bajo potencial inmunógeno. El método comprende reducir la cantidad de partículas en un intervalo subvisible (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 micrómetros o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 micrómetros de tamaño). En determinadas realizaciones, el nivel de dichas partículas se reduce mediante tratamiento a presión alta de la preparación de proteínas como se describe en detalle en el presente documento. Las condiciones y/o parámetros para el tratamiento a presión alta pueden seleccionarse y/o guiarse mediante IMF, así como otras técnicas que se desvelan en el presente documento, de manera de reducir o eliminar eficazmente las partículas subvisibles de la preparación, favoreciendo al mismo tiempo la proteína monomérica plegada adecuadamente. Como se desvela en el presente documento, el análisis por IMF mostró agregados de partículas en formulaciones comerciales que no eran detectables mediante CET o inspección visual, y se descubrió que estas soluciones eran inmunógenas en ratones. 10 Dosis de agregados de partículas tan bajas como de 1,6 ng/dosis rompieron la tolerancia en los ratones e indujeron respuestas inmunitarias a la proteína monomérica. Cuando la preparación se trató con presión hidrostática alta, las partículas se redujeron a un nivel de dosis de 0,02 ng/dosis y la inmunogenia se eliminó. 15

20 Como se desvela en el presente documento, una preparación de mGH cromatográficamente pura, que convencionalmente se consideraría libre de agregados (y, en consecuencia, la inmunogenia del producto se asociaría convencionalmente a algo distinto de la agregación), tiene agregados presentes que no pueden detectarse mediante cromatografía, pero son detectables por IMF. Como se muestra en el presente documento, estas partículas subvisibles son inmunógenas puesto que, mediante el uso de presión alta (por ejemplo), el contenido de partículas subvisibles puede disminuirse junto con la inmunogenia. 25

Adicionalmente, y como se desvela en el presente documento, si el tratamiento a presión convencional (por ejemplo, guiado mediante análisis por CET) como se describe en la técnica se aplica a una preparación de proteínas terapéuticas tal como Enbrel, no se detectaría ningún cambio en el nivel de agregado a partir del tratamiento. Sin embargo, mediante el empleo de IMF, se observa una clase diferente de agregados, partículas subvisibles, que 30 pueden reducirse a través de presión, en una ventana de presión específica.

Aún adicionalmente, como se muestra en el presente documento, el Betaseron también contiene partículas subvisibles, lo que anteriormente se desconocía.

35 Por tanto, en otros aspectos más, la invención proporciona composiciones farmacéuticas y formulaciones que comprenden una proteína terapéutica, así como métodos de tratamiento con la misma. La composición contiene partículas subvisibles (por ejemplo, de proteínas) (por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a aproximadamente 10 micrómetros de tamaño) a una dosis inferior a una dosis inmunógena. La composición farmacéutica puede formularse para la administración de manera que, convencionalmente, tenga una tendencia a inducir reacciones inmunitarias al agente terapéutico, tal como la administración intramuscular, subcutánea o intravenosa. La composición farmacéutica de acuerdo con la invención tiene un potencial inmunógeno bajo (incluso para posologías de tratamiento repetidas y/o crónicas), puede tener un perfil de seguridad y eficacia mejor, así como una estabilidad durante el almacenamiento mejor. 40

45 Otros objetivos y aspectos de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y las reivindicaciones adjuntas.

Descripción de las figuras

50 La **Figura 1** muestra la detección de agregados en las formulaciones de Producto A y Producto B, incluso después de agresiones de congelación-descongelación (FT) y agitación.

La **Figura 2** muestra un aumento del contenido de monómeros de las formulaciones de Producto A y Producto B después del tratamiento a presión alta.

55 La **Figura 3** muestra niveles de monómeros y agregados para muestras utilizadas en modelos transgénicos.

La **Figura 4** muestra la conservación del contenido α -helicoidal de agregados producidos mediante agitación y congelación-descongelación, como se determina mediante espectroscopía infrarroja.

60 La **Figura 5** muestra la conservación de más contenido α -helicoidal y contenido de lámina β en agregados de congelación-descongelación, en comparación con los agregados agitados de formulaciones de Producto B, como se determina mediante espectroscopía de DC.

65 La **Figura 6** muestra que, en ratones no tratados anteriormente y sensibilizados neonatalmente, se observaron niveles máximos de anticuerpos contra hGH en muestras de suero recogidas en la semana 4.

La **Figura 7** muestra los resultados del tratamiento a presión alta sobre la inmunogenia de las muestras de Producto A y Producto B en el modelo en ratón estimulado neonatalmente.

5 La **Figura 8** muestra los resultados del tratamiento a presión alta sobre la inmunogenia de las muestras de Producto A y Producto B en el modelo en ratón adulto no tratado anteriormente.

La **Figura 9** muestra que no se observaron respuestas inmunitarias en el modelo en ratón transgénico.

10 La **Figura 10** muestra el número de partículas de 1-50 μm de tamaño en preparaciones de mGH de reserva (panel a), agitadas (panel b) y de congelación-descongelación (panel c) antes y después del tratamiento a presión alta, representadas por las barras de color negro y gris respectivamente.

15 La **Figura 11** muestra el número de partículas de 1-50 μm de tamaño para mGH adsorbida en alumbre (panel a) y vidrio (panel b).

20 La **Figura 12** muestra la segunda espectroscopía infrarroja derivativa de preparaciones de mGH agregadas. La mGH adsorbida en alumbre y micropartículas de vidrio están representadas por líneas continuas de color negro y líneas discontinuas de guiones de color gris, respectivamente. Los agregados de mGH producidos en congelación-descongelación y agitación se muestran como líneas discontinuas de guiones de color gris oscuro y líneas discontinuas de puntos de color gris, respectivamente.

25 **Figura 13** Gráfico de Stern-Volmer de mGH nativa, desplegada y adsorbida en partículas. Las soluciones de proteínas nativas y desplegadas están representadas por círculos de color negro sólidos (●) con línea discontinua de guiones y triángulos de color gris (▼) con línea discontinua de puntos de color gris respectivamente. La proteína adsorbida a Alhydrogel y las partículas de vidrio se muestran como diamantes de color gris (◆) y cuadrados de color gris oscuro (■) respectivamente. Algunas barras de error son más pequeñas que los símbolos de puntos de datos.

30 La **Figura 14** muestra la producción de anticuerpos IgG1 para cada preparación de mGH. Las respuestas de anticuerpos de hemorragias de los días 21, 35, 42 y 49 se representan como barras de color negro (■), gris medio (▨), gris oscuro (▩) y gris claro (▧), respectivamente. Solo se promediaron los ratones positivos. Las barras de error representan intervalos de confianza del 95 %. Los números sobre las barras indican el número de ratones positivos.

35 La **Figura 15** muestra la producción de anticuerpos IgG2 para cada preparación de mGH. Los resultados para IgG2a, IgG2b e IgG2c se muestran en los gráficos A, B y C, respectivamente. Las respuestas de anticuerpos de las hemorragias de los días 21, 35, 42 y 49 se representan como barras de color negro (■), gris medio (▨), gris oscuro (▩) y gris claro (▧), respectivamente. Solo se promediaron los ratones positivos. Las barras de error representan intervalos de confianza del 95 %. Los números sobre las barras indican el número de ratones positivos.

45 La **Figura 16** muestra la producción de anticuerpos IgG3 para cada preparación de mGH. Las respuestas de anticuerpos de hemorragias de los días 21, 35, 42 y 49 se representan como barras de color negro (■), gris medio (▨), gris oscuro (▩) y gris claro (▧), respectivamente. Solo se promediaron los ratones positivos. Las barras de error representan intervalos de confianza del 95 %. Los números sobre las barras indican el número de ratones positivos.

50 La **Figura 17** muestra el análisis de partículas totales por IMF de Betaseron.

55 La **Figura 18** muestra el análisis de distribución de tamaño de partícula por IMF de Betaseron. Para obtener una masa aproximada de proteína en las partículas subvisibles presentes en la formulación de Betaseron, la masa de cada partícula se determinó suponiendo una densidad de las partículas esféricas de 1,2 g/ml. Una aproximación del porcentaje de masa de la proteína total que forma partículas subvisibles es del 2,36 % +/- 0,83 %.

60 La **Figura 19** muestra la potencia relativa de anticuerpos séricos Log10 de anticuerpos de unión contra BaroFeron, Avonix y Betaseron. Los datos de BaroFeron se muestran en color rojo, los de Avonix en color verde y los de Betaseron en color azul. La dosificación de Betaseron dio como resultado un desarrollo significativo de anticuerpos de unión contra Betaseron monomérico con respecto al valor basal. Ni Avonix ni BaroFeron desarrollaron una respuesta significativa.

La **Figura 20** muestra que Etanercept tiene agregados en su formulación final. Se diluyó Etanercept 5 veces en tampón de formulación y se analizó mediante HPLC-CET (A) e IMF (B).

65 La **Figura 21** muestra Etanercept diluido a 10 mg/ml, tratado a presión y analizado mediante HPLC-CET. No

puede detectarse diferencia entre las muestras tratadas a presión atmosférica y con presión con este método analítico.

La **Figura 22** muestra que la presión disminuye las partículas en >25 % en el intervalo de 100-200 MPa (1000-2000 bar)). Se diluyó Etanercept a 10 mg/ml, se trató a presión y se analizó mediante IMF.

Figura 23 La presión de 200 MPa (2000 bar) disminuye las partículas subvisibles en >30 % en formulaciones de Etanercept. Se trató Etanercept por cuadruplicado a 200 MPa (2000 bar) y se analizó mediante IMF. El panel A muestra datos para todas las muestras y el panel B para el promedio de tratamiento a 200 MPa (2000 bar) y presión atmosférica.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona métodos para reducir y/o evaluar el potencial inmunógeno de una preparación de proteínas terapéuticas. La presente invención proporciona adicionalmente composiciones farmacéuticas y formulaciones de proteínas terapéuticas, y métodos de tratamiento con las mismas, las composiciones y formulaciones que tienen potencial inmunógeno bajo y/o eficacia mejorada.

Una "preparación de proteínas terapéuticas" es cualquier composición que comprenda una proteína para terapia humana o veterinaria. La preparación es generalmente una composición líquida que comprende proteína soluble y, por tanto, también puede comprender uno o más diluyentes y/o excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como agua, tampón, un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o una solución desnaturalizante. También puede haber presentes componentes que no sean farmacéuticamente aceptables, pero que sean útiles en la fabricación y purificación de proteínas recombinantes. Dichos componentes se retiran de la formulación comercial.

La proteína terapéutica puede estar destinada a la administración aguda o crónica, tal como, por ejemplo, una administración aproximadamente diaria, semanal o mensual durante un período de meses (por ejemplo, al menos 6 meses) o incluso años (por ejemplo, 1, 2 o 3 o más años). Por ejemplo, la proteína terapéutica puede estar indicada para el tratamiento de una enfermedad crónica, tal como diabetes mellitus, infección vírica crónica (por ejemplo, hepatitis), asma, EPOC o un trastorno autoinmunitario, tal como esclerosis múltiple (u otro trastorno desmielinizante) o artritis reumatoide, o coagulación o deficiencia enzimática. La proteína terapéutica puede estar indicada para el tratamiento del cáncer. Proporcionando composiciones de proteínas terapéuticas que tienen un potencial inmunógeno bajo, la invención permite una terapia prolongada sin romper la tolerancia y/o sin disminuir el efecto terapéutico.

La preparación de proteínas puede ser una muestra de laboratorio, una preparación farmacéutica a granel o una unidad de dosificación individual. En algunas realizaciones, la preparación de proteínas se suministra en una formulación adecuada para la administración, para evaluar su potencial inmunógeno y/o para reducir adicionalmente su potencial inmunógeno como se describe en el presente documento. Como alternativa, la preparación de proteínas terapéuticas puede ser a una escala de laboratorio mayor o a escala de fabricación (por ejemplo, 10 l, 100 l, 1000 l, 10.000 l, 20.000 l o más), para la reducción de su potencial inmunógeno mediante la retirada (o monomerización) de agregados de proteínas solubles de tamaños visibles y subvisibles (por ejemplo, incluyendo partículas subvisibles en el intervalo de 0,1 a 10 micrómetros) y/u otras proteínas no nativas. Entonces, la preparación de proteínas terapéuticas puede ajustarse para comprender una formulación adecuada para la administración como fármaco con potencial inmunógeno bajo.

La proteína puede ser una proteína terapéutica recombinante. La proteína comprende un anticuerpo monoclonal, que puede ser quimérico o humanizado, un dominio de unión a antígeno o un anticuerpo monocatenario o una proteína que contiene un dominio Fc (por ejemplo, ENBREL), y el anticuerpo o dominio puede ser de cualquier isotipo humano, tal como como un isotipo IgG, o la proteína es una interleucina o interferón (por ejemplo, un interferón alfa, interferón beta o interferón gamma), hormona proteínica o peptídica o factor de crecimiento (por ejemplo, insulina, GLP, eritropoyetina, GM-CSF, u hormona de crecimiento humana), factor de coagulación (por ejemplo, Factor VII, Factor VIII), o enzima para terapia de reemplazo (por ejemplo, uricasa, MYOZYME, fenilalanina hidroxilasa, fenilalanina amoniaco liasa). La proteína terapéutica puede comprender proteínas de longitud completa, o porciones funcionales de las mismas, y puede contener modificaciones conocidas en la técnica para potenciar la actividad y/o la estabilidad de la molécula.

La proteína terapéutica recombinante puede ser una proteína grande de una o más de una subunidad. Por ejemplo, la proteína puede tener un tamaño superior a aproximadamente 500 kDa, 400 kDa, 200 kDa, 100 kDa, 75 kDa, 50 kDa, 40 kDa, 30 kDa, 20 kDa, 10 kDa, 5 kDa, 2 kDa o 0,25 kDa. En determinadas realizaciones, la proteína recombinante comprende una pluralidad de cadenas polipeptídicas, que pueden estar conectadas opcionalmente por uno o más enlaces disulfuro.

Las proteínas terapéuticas de ejemplo incluyen interferón alfa; interferón alfa 2a (Roferon-A; Pegasys); interferón beta 1b (Betaseron); interferón beta 1a (Avonex); insulina (por ejemplo, Humulin-R, Humalog); ADNasa (Pulmozyme); Neupogen; Epogen Procrit (Epoetin Alpha); Aranesp (Procrit de 2da generación); Intron A (interferón alfa 2b);

Rituxan (Rituximab anti-CD20); IL-2 (Proleukin); IL-1 ra (Kineret); BMP-7 (Osteogenina); TNF-alfa la (Beromun); HUMIRA (MAB anti-TNF-alfa); tPA (Tenecteplasa); PDGF (Regranex); interferón-gamma Ib (Actimmune); uPA; GMCSF; Factor VII, Factor VIII; Remicade (infliximab); Enbrel (Etanercept); Betaferon (interferón beta-la); Saizen (somatotropina); Erbitux (cetuximab); Norditropin (somatotropina); Nutropin (somatotropina); Genotropin (somatotropina); Humatrope (somatotropina); Rebif (interferón beta la); Herceptin (trastuzumab); abatacept (Orencia) y Humira (adalimumab); Xolair (omalizumab); Avastin (bevacizumab); Neulasta (pegfilgrastim); Cerezyme (imiglucerasa); y motavizumab. La secuencia de aminoácidos y/o la estructura de dichas proteínas terapéuticas se conocen en la técnica y dichas secuencias/estructuras se incorporan en el presente documento como referencia.

10 La proteína terapéutica puede contener una o una pluralidad de glucosilaciones o puede comprender una o una pluralidad de cadenas de PEG unidas covalentemente. En otras realizaciones, la proteína terapéutica es una proteína de fusión recombinante con un compañero de fusión que prolonga la semivida (por ejemplo, albúmina o dominio Fc de anticuerpo).

15 La proteína puede producirse de forma recombinante en un sistema de célula de *E. coli*, de levadura (por ejemplo, *Pichia*), de mamífero (por ejemplo, células CHO) u otro sistema, y a una escala de fabricación como se describe. La proteína puede recuperarse en forma soluble para evaluar y/o reducir su potencial inmunógeno como se describe en el presente documento. En otras realizaciones, la preparación de proteínas se recupera de las células en una forma insoluble (por ejemplo, cuerpos de inclusión o precipitado) y, posteriormente, se solubiliza para evaluar y/o reducir el potencial inmunógeno como se describe en el presente documento.

20 La preparación de proteínas, antes de la evaluación o el tratamiento para reducir el potencial inmunógeno, puede estar sustancialmente libre de agregados visibles como se determina, por ejemplo, mediante técnicas de oscurecimiento de luz. Dichos agregados visibles pueden ser del tamaño de aproximadamente 50 micrómetros o más. La preparación de proteínas puede estar adicionalmente sustancialmente libre de agregados de proteínas solubles pequeños (por ejemplo, agregados subvisibles) de menos de aproximadamente 0,2 o aproximadamente 0,1 micrómetros de tamaño, como se determina, por ejemplo, mediante cromatografía de exclusión por tamaño. En otras realizaciones, la preparación contiene adicionalmente cantidades significativas de agregados visibles y/o agregados solubles pequeños, cuyo nivel o concentración puede reducirse adicionalmente de acuerdo con la invención. La preparación de proteínas puede ser una proteína monomérica al 90 % o al 95 % o al 97 % o al 98 % o al 99 %, en algunas realizaciones, puede ser sustancialmente cromatográficamente pura como se determina mediante CET.

25 La preparación de proteínas puede contener una cantidad inmunógena de partículas subvisibles en el intervalo de 0,1 a 10 micrómetros, tal como superior a 2 ng/ml, superior a aproximadamente 5 ng/ml, superior a aproximadamente 10 ng/ml, superior a aproximadamente 50 ng/ml, superior a aproximadamente 100 ng/ml, superior a aproximadamente 200 ng/ml o superior a aproximadamente 500 ng/ml de dichas partículas subvisibles. El potencial inmunógeno de la preparación puede determinarse y/o cuantificarse mediante un método que se describe en el presente documento, que incluye la capacidad de la preparación de proteínas para inducir anticuerpos en un modelo animal adecuado y/o población humana.

30 En algunas realizaciones, la preparación de proteínas se ha resolubilizado usando tratamiento con caotropo. Las proteínas producidas en sistemas microbianos por lo general son insolubles y, por tanto, requieren un tratamiento con caotropo para la solubilización y renaturalización. Normalmente, se requieren altas concentraciones de productos químicos (por ejemplo, GdnHCl 6 M o urea 8 M) para disolver los agregados. Después de la disolución de la proteína, el caótroto se diluye para disminuir la concentración de proteína y permitir que las moléculas de proteína vuelvan a su conformación nativa. Este proceso requiere desnaturalización antes del replegamiento. Debido a que las proteínas tienden a (re)agregarse durante el replegamiento, los rendimientos de proteínas plegadas adecuadamente nunca son del 100 % en los procesos a base de caotropos. En consecuencia, la invención, en determinadas realizaciones, evita el uso del tratamiento con caotropo.

35 Con el fin de evaluar la preparación de proteínas para determinar el potencial inmunógeno, la invención emplea formación de imágenes de micro-flujo (IMF) para evaluar los números de partículas y los tamaños de partículas de muestras de proteínas y, en particular, en el intervalo subvisible (por ejemplo, de un tamaño de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 micrómetros). La presencia y/o el nivel de dichas partículas subvisibles son indicativos de una preparación inmunógena.

40 Como alternativa, las partículas en el intervalo subvisible pueden detectarse y/o cuantificarse mediante difracción láser o Contador Coulter. La preparación de proteínas puede evaluarse mediante un contador Coulter, que puede determinar el recuento de partículas en el intervalo de 400 nm a 1,7 μ m y está limitado por la conductividad de la solución de proteínas. Puede usarse dispersión de luz estática (difracción láser) para evaluar el contenido de partículas en un intervalo de 40 nm a 8 μ m, sin embargo, esta técnica generalmente no se considera cuantitativa y no puede contar el número de partículas presentes o la distribución de tamaño de las partículas.

45 Aunque la industria y las agencias reguladoras son conscientes de la agregación y tienen políticas y directrices para su detección en composiciones de proteínas terapéuticas, algunos agregados aún siguen sin detectarse, en parte debido a limitaciones de las técnicas analíticas aceptadas convencionalmente. Por ejemplo, la USP actualmente no

tiene directrices para la detección de partículas de 0,1 a 10 micrómetros de tamaño. Los agregados de proteínas de menos de 0,1 micrómetros se detectan mediante métodos analíticos tales como la cromatografía de exclusión por tamaño, y las partículas de más de 10 micrómetros se detectan mediante la técnica de oscurecimiento de luz USP <788>. No hay recomendaciones claras para la detección de partículas de más de aproximadamente 0,1 micrómetros, pero de menos de aproximadamente 10 micrómetros y no se ha demostrado la importancia de estas partículas para el potencial inmunógeno del producto. Esta brecha en la detección de partículas subvisibles deja una oportunidad para que existan agregados de proteínas en productos comerciales aprobados.

Más específicamente, la caracterización de agregados y partículas en formulaciones finales ha sido difícil anteriormente (Carpenter et al., *Overlooking Subvisible Particles in Therapeutic Protein Products: Gaps That May Compromise Quality Product*, *J. Pharmaceutical Sciences* 98: 4 (2009). HPLC-CET es la técnica habitual de la industria debido a su alto rendimiento y relativa robustez. Sin embargo, las partículas y agregados superiores a aproximadamente 0,1 micrómetros pueden filtrarse en el cabezal de la columna, evitando una evaluación precisa de todos los agregados que están presentes en la solución. Métodos más sofisticados tales como la ultracentrifugación analítica pueden controlar el contenido de agregado y el tamaño sin una columna, sin embargo, las partículas grandes se depositan demasiado rápido y no pueden cuantificarse. El reciente desarrollo de formación de imágenes de micro-flujo proporciona una nueva tecnología para medir visiblemente el contenido de partículas de una solución y puede evaluar agregados que anteriormente no se han identificado o caracterizado. Durante la formación de imágenes de micro-flujo, se toman imágenes de microscopía digital de una solución de proteínas con respecto a un blanco y el contenido de agregado se mide cuantificando el tamaño y el número de partículas presentes. Existe un aparato para la formación de imágenes de micro-flujo disponible en el mercado en Brightwell Technologies, Inc.

Las preparaciones de proteínas pueden caracterizarse adicionalmente por su contenido de agregados o de partículas mediante una o una pluralidad de técnicas analíticas adicionales seleccionadas entre las siguientes.

La preparación de proteínas puede evaluarse mediante ultracentrifugación analítica. El uso de la ultracentrifugación analítica para la caracterización de la agregación de proteínas terapéuticas se analiza en Philo, J. S., *American Biotechnology Laboratory*, página 22, octubre de 2003. Los experimentos que pueden realizarse usando ultracentrifugación analítica incluyen los experimentos de velocidad de sedimentación y de equilibrio de sedimentación, que pueden realizarse para determinar si existen múltiples solutos en una solución (por ejemplo, monómero, dímero, trímero, etc.) y proporcione una estimación de los pesos moleculares para los solutos.

La preparación de proteínas puede evaluarse mediante cromatografía de exclusión por tamaño y cromatografía de permeación en gel, que puede estimar los pesos moleculares y los números de agregación de proteínas. Dichas técnicas también separan diversos agregados de proteínas. Véase Wu, C-S. (editor), *Handbook of Size Exclusion Chromatography and Related Techniques*, Segunda Edición (*Chromatographic Science*), Marcel Dekker: Nueva York, 2004 (en particular el capítulo 15 en las páginas 439-462 de Baker et al., "Size Exclusion Chromatography of Proteins") y Wu, C-S. (editor), *Column Handbook for Size Exclusion Chromatography*, San Diego: Academic Press, 1999 (en particular los capítulos 2 y 18).

La preparación de proteínas puede evaluarse mediante fraccionamiento de flujo de campo, que se basa en un campo perpendicular a una corriente líquida de moléculas. El fraccionamiento de flujo de campo puede usarse para analizar y separar proteínas agregadas tales como monómeros, dímeros, trímeros de proteínas, etc. Véase Zhu et al., *Anal. Chem.* 77: 4581 (2005); Litzten et al., *Anal. Biochem.* 212: 469 (1993); y Reschiglian et al., *Trends Biotechnol.* 23: 475 (2005).

La preparación de proteínas puede evaluarse mediante métodos de dispersión de luz, tal como los métodos que usan la dispersión de luz láser (con frecuencia junto con cromatografía de exclusión por tamaño u otros métodos). Los métodos de dispersión de luz también pueden usarse para estimar el peso molecular de las proteínas, incluyendo los agregados de proteínas; véase, por ejemplo, Mogridge, J., *Methods Mol Biol.* 261: 113 (2004) y Ye, H., *Analytical Biochem.* 356: 76 (2006). Las técnicas de dispersión dinámica de luz se analizan en Pecora, R., ed., *Dynamic Light Scattering: Applications of Photon Correlation Spectroscopy*, Nueva York: Springer Verlag, 2003 y Berne, B.J. y Pecora, R., *Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics*, Mineola, NY: Dover Publications, 2000. La dispersión de luz láser se analiza en Johnson, C.S. y Gabriel, D.A., *Laser Light Scattering*, Mineola, NY: Dover Publications, 1995, y otras técnicas de dispersión de luz que pueden aplicarse para determinar la agregación de proteínas se analizan en Kratochvil, P., *Classical Light Scattering of Polymer Solutions*, Amsterdam: Elsevier, 1987.

El oscurecimiento de luz también puede usarse para medir la agregación de proteínas de la preparación; véase Seefeldt et al., *Protein Sci.* 14: 2258 (2005); Kim et al., *J. Biol. Chem.* 276: 1626 (2001); y Kim et al., *J. Biol. Chem.* 277: 27240 (2002).

La preparación de proteínas puede evaluarse mediante espectroscopía de fluorescencia, tal como la espectroscopía de anisotropía de fluorescencia, que puede usarse para determinar la presencia de agregados de proteínas. Las sondas de fluorescencia (colorantes) pueden unirse covalentemente o no covalentemente al agregado para ayudar en el análisis de los agregados (véase, por ejemplo, Lindgren et al., *Biophys. J.* 88: 4200 (2005)), Publicación de

Solicitud de Patente de los EE.UU. 2003/0203403) o Royer, C. A., *Métodos Mol. Biol.* 40: 65 (1995). Los restos internos de triptófano también pueden usarse para detectar la agregación de proteínas por fluorescencia; véase, por ejemplo, Dusa et al., *Biochemistry* 45: 2752 (2006).

- 5 Pueden emplearse muchos métodos de electroforesis en gel (por ejemplo, PAGE desnaturizante o no desnaturizante) para analizar proteínas y agregación de proteínas. La PAGE nativa (PAGE no desnaturizante) puede usarse para estudiar agregados unidos no covalentemente. Véase, por ejemplo, Hermeling et al. *J. Phar. Sci.* 95: 1084-1096 (2006); Kilic et al., *Protein Sci.* 12: 1663 (2003); Westermeier, R., *Electrophoresis in Practice: A Guide to Methods and Applications of DNA and Protein Separations*, 4ª edición, Nueva York: John Wiley & Sons, 2005; y Hames, B. D. (Ed.), *Gel Electrophoresis of Proteins: A Practical Approach*, 3ª edición, Nueva York: Oxford University Press, EE.UU., 1998.

15 La preparación de proteínas puede evaluarse mediante análisis molecular de movilidad electroforética en fase gaseosa (AMMEG) (véase Bacher et al., *J. Mass Spectrom.* 36: 1038 (2001)). Una combinación de electroforesis en la fase gaseosa y la espectrometría de masas proporciona otro método para analizar complejos y agregados de proteínas.

20 Las técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear pueden usarse para estimar parámetros hidrodinámicos relacionados con la agregación de proteínas. Véase, por ejemplo, James, T. L. (ed.), *Nuclear Magnetic Resonance of Biological Macromolecules*, Parte C, Volumen 394: *Methods in Enzymology*, San Diego: Academic Press, 2005; James, T. L., Dotsch, V. y Schmitz, U. (eds.), *Nuclear Magnetic Resonance of Biological Macromolecules*, Parte A (*Methods in Enzymology*, Volumen 338) y *Nuclear Magnetic Resonance of Biological Macromolecules*, Parte B (*Methods in Enzymology*, Volumen 339), San Diego: Academic Press, 2001, y Mansfield, S. L. et al., *J. Phys. Chem. B*, 103: 2262 (1999). Los anchos de línea, los tiempos de correlación y los tiempos de relajación se encuentran entre los parámetros que pueden medirse para estimar el tiempo de volteo en solución, que después puede correlacionarse con el estado de agregación de proteínas. También puede usarse resonancia paramagnética electrónica (RPE o REE) para determinar estados de agregación; véase, por ejemplo, Squier et al., *J. Biol. Chem.* 263: 9162 (1988).

30 Como se desvela en el presente documento, las partículas de proteínas subvisibles a niveles indetectables mediante métodos analíticos convencionales, tales como la cromatografía de exclusión por tamaño y el oscurecimiento de luz, pueden inducir respuestas inmunitarias a una proteína o epítopo. Específicamente, los agregados detectados mediante IMF, que no podían detectarse anteriormente mediante HPLC-CET ya que estaban por debajo del límite de detección, pueden tener un potencial inmunógeno significativo.

35 La presente invención proporciona métodos para evaluar la agregación de proteínas, incluyendo el nivel y la concentración de partículas de proteínas subvisibles en las preparaciones de proteínas. Como se usa en el presente documento, un "agregado de proteínas" o "partícula de proteínas" se define como que está compuesto por una multiplicidad de moléculas de proteína en las que se mantienen interacciones no covalentes no nativas y/o enlaces covalentes no nativos (tales como enlaces disulfuro intermoleculares no nativos) que mantienen las moléculas de proteína juntas. Los agregados pueden ser solubles o insolubles. Los agregados de proteínas incluyen, pero no se limitan a, cuerpos de inclusión, precipitados solubles e insolubles, oligómeros solubles no nativos, geles, fibrillas, películas, filamentos, protofibrillas, depósitos amiloides, placas y oligómeros intracelulares dispersos no nativos.

45 La preparación de proteínas, que puede contener agregados o partículas de proteínas, puede tener un alto contenido de monómero (por ejemplo, al menos un 80 % de monómero; al menos aproximadamente un 90 % de monómero; al menos aproximadamente un 95 % de monómero; al menos aproximadamente un 97 % de monómero o al menos aproximadamente un 98 % de monómero o al menos aproximadamente un 99 % de monómero). Dichas preparaciones de alto contenido de monómero aún pueden conservar un potencial inmunógeno significativo debido a la presencia de incluso cantidades relativamente bajas de partículas subvisibles en el intervalo de aproximadamente 0,1 a 10 micrómetros. En algunas realizaciones, dichas partículas subvisibles son superiores a aproximadamente 0,2 micrómetros, superiores a aproximadamente 0,3 micrómetros o superiores a aproximadamente 0,4 o 0,5 micrómetros. Dichas partículas subvisibles pueden tener menos de aproximadamente 8 micrómetros, menos de aproximadamente 5 micrómetros o menos de aproximadamente 3 o 2 micrómetros.

55 Cuando dichas partículas subvisibles, u otro contenido de agregados, es detectable a través de las técnicas que se describen en el presente documento, la invención proporciona métodos para reducir dicho contenido de partículas o agregados.

60 Los agregados y las partículas en algunas realizaciones pueden retirarse mediante filtración, purificación y replegamiento. Todas las opciones terapéuticas proteínicas se esterilizan mediante filtración antes de la formulación final (Carpenter, Randolph et al. 2009). Sin embargo, la filtración por membrana no es un proceso benigno y expone las proteínas a grandes cantidades de área superficial (Maa y Hsu 1998). Muchas proteínas son altamente tensioactivas y la adsorción a superficies de contacto puede conducir a la agregación de proteínas. En consecuencia, la filtración no siempre proporciona una opción viable para la retirada de agregados. Adicionalmente, con un límite de filtración de aproximadamente 0,2 micrómetros o más, algunas partículas escaparán de la filtración.

Los procesos de purificación de proteínas basados en columnas se emplean habitualmente para la retirada de agregados y partículas. Desafortunadamente, los rendimientos de las etapas de cromatografía del proceso, tales como la cromatografía de interacción de exclusión por tamaño, la aniónica o la hidrófoba rara vez son del 100 %, ya que las proteínas agregadas normalmente eluyen cerca de la proteína nativa. En consecuencia, el fabricante generalmente se enfrenta a la elección entre tener un rendimiento adecuado o una baja carga de agregados.

En algunas realizaciones, el contenido de partículas y/o agregados se reduce en la preparación sometiendo la preparación a condiciones de presión alta. Generalmente, las condiciones de presión alta se seleccionan para no inducir agregación, donde las condiciones incluyen magnitud de presión alta, duración del tratamiento a presión alta, concentración de proteínas, temperatura, pH, fuerza iónica, concentración de caotropo, concentración de tensioactivo, concentración de tampón, concentración de compuestos excluyentes preferentes u otros parámetros de la solución como se describen en el presente documento. Véase el documento WO 2008/033556, que se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.

En algunas realizaciones, el contenido de partículas y/o agregados se reduce con presión alta después de que se completa la purificación de la proteína, es decir, después de que la proteína está en el nivel de pureza deseado para su uso como opción terapéutica (donde la pureza se refiere a componentes no deseados además de la proteína de interés, pero no a agregados o partículas de la proteína de interés).

Por ejemplo, pueden seleccionarse condiciones de presión alta para favorecer la proteína monomérica plegada adecuadamente y para reducir las partículas de proteínas (por ejemplo, partículas subvisibles) al menos 2 veces, 5 veces, 10 veces, 50 veces, 100 veces o más. En algunas realizaciones, las partículas subvisibles se reducen por debajo de un nivel detectable como se determina mediante IMF.

Como se usa en el presente documento, la expresión "presión alta" significa una presión de al menos aproximadamente 25 MPa (250 bar). El tratamiento a presión alta de acuerdo con las realizaciones de la invención puede ser a al menos aproximadamente 25 MPa (250 bar) de presión, al menos aproximadamente 40 MPa (400 bar) de presión, al menos aproximadamente 50 MPa (500 bar) de presión, al menos aproximadamente 100 MPa (1 kbar) de presión, al menos aproximadamente 200 MPa (2 kbar) de presión, al menos aproximadamente 300 MPa (3 kbar) de presión, al menos aproximadamente 500 MPa (5 kbar) de presión o al menos aproximadamente 1000 MPa (10 kbar) de presión. La presión "atmosférica", "ambiental" o "convencional" se define como aproximadamente 15 libras por pulgada cuadrada (psi) o aproximadamente 1 bar o aproximadamente 100.000 pascales.

El uso de tratamiento a presión alta para reducir el contenido de partículas y/o agregados subvisibles en las preparaciones de proteínas terapéuticas puede prolongar la vida útil de dichas preparaciones, de manera que el potencial inmunógeno se reduzca o se elimine durante un período de tiempo. Por tanto, de acuerdo con determinadas realizaciones, el tratamiento a presión alta se realiza en cualquier momento antes del uso del producto farmacéutico para terapia humana, por ejemplo, al menos aproximadamente 3 años antes de que la composición de proteínas se administre a un individuo, al menos aproximadamente 2 años, al menos aproximadamente 1 año, al menos aproximadamente 6 meses, al menos aproximadamente 3 meses, al menos aproximadamente 1 mes o al menos aproximadamente 2 semanas antes de que la composición de proteínas se administre a un individuo.

Las condiciones favorables para la reducción o retirada de las partículas y/o agregados en una preparación de proteínas con alto contenido de monómeros pueden no ser iguales o similares a las condiciones favorables para el máximo rendimiento de recuperación de proteínas a partir de una solución altamente agregada. Esta distinción surge de la observación común de que el tratamiento a presión en muchas condiciones de solución puede inducir la agregación y la formación de partículas de especies monoméricas (Ferra-Gonzales, et al. (2000), *PNAS* 97 (12): 6445-6450; Kim, et al. (2002), *Journal of Biological Chemistry* 277 (30): 27240-27246; Seefeldt, et al. (2005), *Protein Science* 14 (9): 2258-2266; Dzwolak, W. (2006), *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins And Proteomics* 1764 (3): 470-480; Grudzielanek, et al. (2006), *Journal Of Molecular Biology* 356 (2): 497-509; Kim, et al. (2006), *High-pressure studies on protein aggregates and amyloid fibrils. Amyloid, Prions, And Other Protein Aggregates*, Parte C. 413: 237-253). Por tanto, la selección de dichas condiciones para presión alta debe guiarse mediante IMF, así como otras técnicas, incluyendo cromatografía de ET, dispersión de luz y/o espectroscopía de DC, entre otras.

El tratamiento a presión alta proporciona un proceso eficaz para la retirada de partículas (incluyendo partículas subvisibles) y agregados de proteínas porque no implica filtración ni purificación, que tienden a inducir la agregación. Sin embargo, deben identificarse condiciones que no induzcan la agregación del monómero (en cualquier forma) pero que disocien los agregados y las partículas. Se ha identificado que el replegamiento a presión alta se produce en condiciones dentro de una "ventana de presión" que generalmente favorece la conformación de proteínas nativas. Por ejemplo, como se muestra en el presente documento, en algunas realizaciones, la ventana de presión para la reducción de partículas subvisibles puede ser de aproximadamente 100 MPa (1000 bar) a aproximadamente 205 MPa (2500 bar) o aproximadamente 100 MPa (1000 bar) a aproximadamente 200 MPa (2000 bar). En otras realizaciones, la ventana puede ser de aproximadamente 125 MPa (1250 bar) a aproximadamente 225 MPa (2250 bar) o aproximadamente 150 MPa (1500 bar) a aproximadamente 200 MPa (2000 bar).

En algunas realizaciones, el tratamiento a presión alta se realiza después de la filtración. Aunque la filtración puede retirar agregados de proteínas grandes, así como partículas superiores a aproximadamente 0,2 o 0,5 micrómetros de tamaño, el tratamiento posterior a presión alta puede reducir el nivel de partículas en el intervalo subvisible que puede inducirse mediante el proceso de filtración en sí o que pueden escapar de la filtración.

5 Pueden ajustarse varias condiciones para un tratamiento óptimo de la preparación de proteínas para reducir las partículas y agregados que pueden dar como resultado inmunogenia. Las proteínas pueden tratarse a presión alta colocándolas en un recipiente (que puede ser un dispositivo de carga de volumen variable de presión alta) y después colocando el recipiente en un generador de presión alta, tal como los disponibles en High Pressure Equipment Co., Erie, Pensilvania. Se describen técnicas de presión alta en las Patentes de EE.UU. N.º 6.489.450 y 10 7.064.192, la Publicación de Solicitud de Patente de los EE.UU. N.º 2004/0038333 y la Solicitud de Patente Internacional WO 02/062827; los métodos para generar presión alta que se describen en el presente documento se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad. También se han desarrollado determinados dispositivos que son particularmente adecuados para el replegamiento de proteínas a presión alta; véase la 15 Publicación de Solicitud de Patente Internacional N.º WO 2007/062174, que se incorpora como referencia en su totalidad. Se describen a continuación parámetros de condición que se han de ajustar para un tratamiento favorable a presión alta.

20 La concentración de proteína puede ajustarse para una reducción óptima de partículas subvisibles. Pueden usarse concentraciones de proteína de al menos aproximadamente 0,1 mg/ml, al menos aproximadamente 1,0 mg/ml, al menos aproximadamente 5,0 mg/ml, al menos aproximadamente 10 mg/ml o al menos aproximadamente 20 mg/ml. Generalmente, la proteína estará presente en una concentración de aproximadamente 0,01 o aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 50, 250 o 400 mg/ml.

25 La duración del tratamiento a presión alta puede seleccionarse para la reducción de partículas subvisibles. En general, el tratamiento a presión alta puede realizarse durante aproximadamente 15 minutos a aproximadamente 50 horas o posiblemente más tiempo. En algunas realizaciones, la duración del tratamiento a presión alta es de hasta aproximadamente 1 semana, aproximadamente 5 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 3 días, etc.). Por tanto, en algunas realizaciones, la duración suficiente para reducir el nivel de partículas subvisibles es de 30 aproximadamente 2 a aproximadamente 30 horas, de aproximadamente 2 a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 2 a aproximadamente 18 horas o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 horas.

La preparación de proteínas puede estar en condiciones de solución acuosa para favorecer adecuadamente la proteína monomérica plegada y para reducir las partículas subvisibles por presión alta. Los componentes de la 35 solución pueden ser uno o más agentes seleccionados entre uno o más agentes estabilizadores, uno o más agentes tamponantes, uno o más tensioactivos, uno o más pares de agentes de intercambio de disulfuro, una o más sales, uno o más caotropos, o combinaciones de dos o más de los anteriores. Cuando dichos uno o más componentes no son farmacéuticamente aceptables, los uno o más componentes añadidos deben poderse retirar de la preparación de proteínas antes de la administración como producto farmacéutico. Dichos componentes pueden retirarse 40 mediante diálisis.

Los agentes de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, tampones (los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, tampón de fosfato, tampón de borato, tampón de carbonato, tampón de citrato, HEPES, MEPS), sales (los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, las sales de cloruro, sulfato y carbonato de sodio, cinc, calcio, amonio y potasio, 45 caotropos (los ejemplos incluyen, pero no se limitan a, urea, clorhidrato de guanidina, sulfato de guanidina y sarcosina) y agentes estabilizadores (por ejemplo, compuestos de exclusión preferente, etc.)

Los agentes estabilizadores de proteínas no específicos actúan para favorecer la conformación más compacta de una proteína. Dichos agentes incluyen, pero no se limitan a, uno o más aminoácidos libres, uno o más compuestos 50 de exclusión preferente, óxido de trimetilamina, ciclodextranos, chaperonas moleculares y combinaciones de dos o más de los anteriores.

Pueden usarse aminoácidos para evitar la reagregación y facilitar la disociación de los enlaces de hidrógeno. Son aminoácidos típicos que pueden usarse, sin limitación, arginina, lisina, prolina, glicina, histidina y glutamina o 55 combinaciones de dos o más de las anteriores. En algunas realizaciones, el uno o más aminoácidos libres están presentes en una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente el límite de solubilidad del aminoácido y, en algunas variaciones, de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 2 M. La concentración óptima es una función de la proteína deseada y debe favorecer la conformación nativa.

60 Pueden usarse compuestos de exclusión preferente para estabilizar la conformación nativa de la proteína de interés. Los posibles compuestos de exclusión preferente incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, hexilenglicol, azúcares (por ejemplo, sacarosa, trehalosa, dextrosa, manosa) y glicerol. El intervalo de concentraciones que puede usarse es de 0,1 mM a la concentración máxima en el límite de solubilidad del compuesto específico. Las concentraciones de ejemplo incluyen las que son coherentes con la osmolalidad fisiológica. La concentración de exclusión preferente 65 óptima es una función de la proteína de interés.

En algunas realizaciones, se emplea un agente estabilizador, tal como uno o más de entre sacarosa, trehalosa, glicerol, betaína, aminoácido u óxido de trimetilamina. En determinadas realizaciones, el agente estabilizador es un ciclodextrano. En algunas realizaciones, el ciclodextrano está presente en una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente el límite de solubilidad del ciclodextrano. En determinadas realizaciones, el agente estabilizador es una chaperona molecular.

Puede usarse un único agente estabilizador o una combinación de dos o más agentes estabilizadores (por ejemplo, al menos dos, al menos tres, o 2 o 3 o 4 agentes estabilizadores). Cuando se usa más de un agente estabilizador, los agentes estabilizadores pueden ser de diferentes tipos, por ejemplo, al menos un compuesto de exclusión preferentemente y al menos un aminoácido libre, al menos un compuesto de exclusión preferentemente y betaína, etc.

Puede haber presentes agentes tamponantes para mantener un valor de pH o intervalo de pH deseado. Los expertos en la materia conocen numerosos agentes tamponantes adecuados y deben seleccionarse en función del pH que favorezca (o al menos no desfavorezca) la conformación nativa (monomérica) de la proteína de interés. Pueden usarse agentes tamponantes inorgánicos u orgánicos.

Por tanto, en algunas realizaciones, se usa al menos un agente tamponante inorgánico (por ejemplo, fosfato, carbonato, etc.). En determinadas realizaciones, se usa al menos un agente tamponante orgánico (por ejemplo, citrato, acetato, Tris, MOPS, MES, HEPES, etc.). Se conocen bien en la técnica agentes tamponantes orgánicos e inorgánicos adicionales.

También puede emplearse un tensioactivo, un compuesto surfactante, para reducir la tensión superficial del agua. Los tensioactivos también pueden mejorar la solubilidad de la proteína de interés. Los tensioactivos pueden usarse a concentraciones superiores o inferiores a su concentración micelar crítica (CMC), por ejemplo, de aproximadamente el 5 % a aproximadamente el 20 % por encima o por debajo de la CMC. Sin embargo, estos valores variarán dependiendo del tensioactivo elegido, por ejemplo, los tensioactivos tales como el beta-octilgluco-piranósido pueden ser eficaces a concentraciones más bajas que, por ejemplo, los tensioactivos tales como TWEEN-20 (polisorbato 20). La concentración óptima es una función de cada tensioactivo, que tiene su propia CMC.

Los tensioactivos útiles incluyen agentes no iónicos (que incluyen, pero no se limitan a, t-octilfenoxipoliétoxi-etanol y polioxiétilén sorbitano), aniónicos (por ejemplo, dodecilsulfato de sodio) y catiónicos (por ejemplo, cloruro de cetilpiridinio) y agentes anfóteros. Los tensioactivos adecuados incluyen, pero no se limitan a desoxicolato, octil sulfato de sodio, tetradecil sulfato de sodio, polioxiétilén éteres, colato de sodio, octiltiogluco-piranósido, n-octilglucopiranósido, bromuros de alquiltrimetilamonio, cloruros de alquiltrimetilamonio, sulfobetainas no detergentes y bis(2-etilhexil)sulfosuccinato de sodio. En algunas realizaciones, el tensioactivo puede ser polisorbato 80, polisorbato 20, sarcosilo, Triton X-100, β -octil-gluco-piranósido o Brij 35.

Cuando la proteína deseada contiene enlaces disulfuro en la conformación nativa, generalmente es ventajoso incluir en al menos un par de agentes de intercambio de disulfuro en la mezcla. El par de agentes de intercambio de disulfuro facilita la ruptura de los enlaces disulfuro no nativos tensos y la reforma de los enlaces disulfuro nativos. Los agentes de intercambio de disulfuro pueden retirarse mediante diálisis.

En general, el par de agentes de intercambio de disulfuro incluye un agente reductor y un agente oxidante. Son agentes oxidantes de ejemplo glutatión oxidado, cistina, cistamina, oxígeno molecular, ácido yodosobenzoico, sulfitolisis y peróxidos. Los ejemplos de agentes reductores incluyen glutatión, cisteína, cisteamina, diotiotreitol, ditioeritritol, clorhidrato de tris(2-car-boxietil)fosfina o β -mercaptoetanol.

Los de pares de agentes de intercambio de disulfuro de ejemplo incluyen glutatión oxidado/reducido, cistamina/cisteamina y cisteína/cisteína. Se describen pares de agentes de intercambio de disulfuro adicionales en Gilbert HF, (1990) "*Molecular and Cellular Aspects of Thiol Disulfide Exchange*". *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 63: 69-172; y Gilbert HF, (1995) "*Thiol/Disulfide Exchange Equilibria and Disulfide Bond Stability*", *Biothiols*, Parte A. pág. 8-28, que se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.

La selección y concentración del par de agentes de intercambio de disulfuro dependerá de las características de la proteína deseada. Normalmente, la concentración del par de agentes de intercambio de disulfuro en conjunto (incluyendo tanto el agente oxidante como el reductor) es de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 100 mM del tiol oxidado equivalente, sin embargo, la concentración del par de agentes de intercambio de disulfuro debe ajustarse de manera que la presencia del par no sea la etapa limitante de la velocidad en la reorganización de enlaces disulfuro.

Los agentes caotrópicos (también conocidos como "caotropos") son compuestos que incluyen, sin limitación, guanidina, clorhidrato de guanidina (clorhidrato de guanidinio, GdmHCl), sulfato de guanidina, urea, tiocianato de sodio y/u otros compuestos que interrumpen la unión intermolecular no covalente dentro de la proteína, permitiendo que la cadena polipeptídica asuma una conformación sustancialmente aleatoria.

- Los agentes caotrópicos pueden usarse en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 8 M. La concentración óptima del agente caotrópico dependerá de la proteína deseada, así como de los caotrópicos particulares seleccionados. El experto en la materia puede optimizar la elección de un agente caotrópico particular y la determinación de la concentración óptima en vista del contenido proporcionado en el presente documento. Los caotropos pueden retirarse de las preparaciones de proteínas mediante, por ejemplo, diálisis antes de usar la preparación de proteínas como producto farmacéutico.
- Cuando se usan en los presentes métodos, con frecuencia es ventajoso usar agentes caotrópicos en concentraciones no desnaturalizantes para facilitar la disociación de los enlaces de hidrógeno. Aunque una concentración no desnaturalizante variará dependiendo de la proteína deseada, el intervalo de concentraciones no desnaturalizantes es normalmente de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4 M. En algunas realizaciones, la concentración es de aproximadamente 0,1 M a aproximadamente 2 M.
- En determinadas realizaciones, el clorhidrato de guanidina o la urea son los agentes caotrópicos. Puede usarse un único agente caotrópico o una combinación de dos o más agentes caotrópicos (por ejemplo, al menos dos, al menos 3, o 2 o 3 o 4 agentes caotrópicos).
- Las soluciones de proteínas pueden agitarse antes y/o durante el replegamiento. La agitación puede realizarse mediante métodos que incluyen, pero no se limitan a, energía ultrasónica (ultrasonidos), agitación mecánica, agitación mecánica, bombeo a través de mezcladores o a través de soluciones en cascada.
- Los métodos que se describen en el presente documento pueden realizarse en un intervalo de valores de temperatura, dependiendo de la proteína particular de interés, con el fin de reducir las partículas subvisibles (por ejemplo, en el intervalo de 0,1 a 10 micrómetros). Por ejemplo, la proteína puede replegarse (por ejemplo, desagregarse) a diversas temperaturas, incluso aproximadamente a temperatura ambiente, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 37 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 75 °C, aproximadamente 100 °C o aproximadamente 125 °C. Generalmente, la temperatura variará de aproximadamente 0 a aproximadamente 50 °C, de aproximadamente 10 a aproximadamente 37 °C o de aproximadamente 20 a aproximadamente 30 °C.
- En algunas realizaciones, la temperatura puede variar de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 100 °C sin afectar negativamente a la proteína de interés, a condición de que antes de volver a la temperatura ambiente, la mezcla se lleve a una temperatura a la que no se congele.
- Aunque con frecuencia se usan temperaturas elevadas para provocar la agregación de proteínas, cuando se combinan con una presión hidrostática aumentada, las temperaturas aumentadas pueden potenciar las recuperaciones de replegamiento efectuadas mediante el tratamiento a presión alta, a condición de que las temperaturas no sean tan altas como para provocar desnaturalización irreversible. En general, el aumento de la temperatura para el replegamiento debe ser aproximadamente 20 °C más bajo que las temperaturas a las que se produce la pérdida irreversible de actividad. Pueden usarse temperaturas relativamente altas (por ejemplo, de aproximadamente 60 °C a aproximadamente 125 °C mientras que la solución esté a presión, a condición de que la temperatura se reduzca a una temperatura adecuadamente baja antes de la despresurización. Dicha temperatura adecuadamente baja se define como una por debajo de la cual se produce la desnaturalización o agregación inducida térmicamente en condiciones atmosféricas.
- Cuando la reducción de la presión se realiza de manera continua, la velocidad de reducción de la presión puede ser constante o puede aumentarse o disminuirse durante el período en el que se reduce la presión. En algunas variaciones, la velocidad de reducción de presión es de aproximadamente 500 a 200 MPa (5000 a 2000 bar)/1 segundo a aproximadamente 500 a 200 MPa (5000 a 2000 bar)/4 días (o aproximadamente 3 días, aproximadamente 2 días, aproximadamente 1 día). En algunas realizaciones, la reducción de presión puede ser aproximadamente instantánea, como cuando la presión se libera simplemente abriendo el dispositivo en el que está contenida la muestra y liberando inmediatamente la presión.
- Cuando la reducción de presión se realiza de manera gradual, el proceso comprende la caída de la presión desde la presión más alta utilizada hasta al menos un nivel secundario que es intermedio entre el nivel más alto y la presión atmosférica. El objetivo es proporcionar un período de incubación o retención en o aproximadamente en esta zona de presión intermedia que permita que una proteína adopte la conformación deseada.
- En algunas realizaciones, donde hay al menos dos reducciones de presión graduales, puede haber un período de retención a una presión constante entre etapas intermedias. El período de retención puede ser de aproximadamente 10 minutos a aproximadamente 50 horas (o más, dependiendo de la naturaleza de la proteína de interés). En algunas realizaciones, el período de retención puede ser de aproximadamente 2 a aproximadamente 24 horas, de aproximadamente 2 a aproximadamente 18 horas o de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 horas.
- En realizaciones particulares, la presión constante después de la reducción gradual es de aproximadamente cuatro

quintas partes de la presión inmediatamente anterior a la reducción de presión gradual a aproximadamente una décima parte de la presión anterior a la reducción de presión gradual. Por ejemplo, la presión constante está a una presión de aproximadamente cuatro quintas partes a aproximadamente una quinta parte, de aproximadamente dos terceras partes a aproximadamente una décima parte, de aproximadamente dos terceras partes a aproximadamente una quinta parte de la presión inmediatamente anterior a la reducción de presión gradual. Cuando hay más de una etapa de reducción de presión gradual, la presión a la que se hace referencia es la presión inmediatamente anterior a la última reducción de presión (por ejemplo, donde 200 MPa (2000 bar) se reduce a 100 MPa (1000 bar) se reduce a 50 MPa (500 bar), la presión de 50 MPa (500 bar) es la mitad de la presión inmediatamente anterior a la reducción previa (100 MPa (1000 bar)).

Cuando la presión se reduce de manera gradual, la velocidad de reducción de presión (por ejemplo, el período de reducción de presión antes y después del período de retención) puede estar en el mismo intervalo que la velocidad de reducción de presión descrita para la reducción continua (por ejemplo, de manera no gradual). En esencia, la reducción gradual de la presión es la reducción de la presión de manera continua a una presión constante intermedia, seguida de un período de retención y después una reducción adicional de la presión de manera continua. Los períodos de reducción de presión continua antes y después de cada período de retención pueden ser la misma velocidad continua para cada período de reducción de presión continua o cada período puede tener una velocidad de reducción diferente. En algunas realizaciones, hay dos períodos de reducción continua de presión y un período de retención.

En determinadas realizaciones, cada período de reducción de presión continua tiene la misma velocidad de reducción de presión. En otras realizaciones, cada período tiene una velocidad diferente de reducción de presión. En realizaciones particulares, el período de retención es de aproximadamente 8 a aproximadamente 24 horas. En algunas realizaciones, el período de retención es de aproximadamente 12 a aproximadamente 18 horas.

Pueden usarse dispositivos de presión alta y recipientes de reacción disponibles en el mercado, tales como los que se describen en los ejemplos, para conseguir las presiones hidrostáticas de acuerdo con los métodos que se describen en el presente documento (véase BaroFold Inc., Boulder Co.).

Pueden usarse soportes de muestras de pocillos múltiples y pueden sellarse convenientemente con cubiertas de plástico autoadhesivas. Después, los recipientes o todo el soporte de muestras de pocillos múltiples, pueden colocarse en un recipiente a presión, tal como los disponibles en el mercado en Flow International Corp. o High Pressure Equipment Co. El resto del volumen interior del recipiente de presión alta puede llenarse con agua u otro líquido transmisor de presión.

Mecánicamente, existen dos métodos primarios de procesamiento a presión alta: discontinuo y continuo, cada uno de los cuales puede usarse de acuerdo con la invención. Los procesos discontinuos simplemente implican llenar una cámara específica, presurizar la cámara durante un período de tiempo y represurizar el lote. Por el contrario, los procesos continuos alimentan constantemente los agregados a una cámara de presión y las proteínas solubles replegadas se mueven fuera de la cámara de presión. En ambas configuraciones, un buen control de temperatura y presión es esencial, ya que las fluctuaciones en estos parámetros pueden provocar rendimientos no uniformes. Tanto la temperatura como la presión deben medirse dentro de la cámara de presión y controlarse adecuadamente.

Existen muchos métodos para manipular muestras de lotes dependiendo de los problemas de estabilidad específicos de cada proteína objetivo. Las muestras pueden cargarse directamente en una cámara de presión, en cuyo caso la solución y/o suspensión acuosa se usaría como medio de presión.

Como alternativa, pueden cargarse muestras en cualquier diversidad de contenedores sellados y flexibles, incluyendo los que se describen en el presente documento. Esto permite una mayor flexibilidad en el medio de presión, así como en las superficies a las que se expone la mezcla. Los recipientes de muestra podrían incluso actuar protegiendo la proteína deseada de la degradación química (por ejemplo, hay disponibles plásticos eliminadores de oxígeno).

Con el procesamiento continuo, pueden usarse pequeños volúmenes a presión para replegar volúmenes grandes de la mezcla de muestra. Además, el uso de un filtro apropiado en la salida de un proceso continuo liberará selectivamente la proteína deseada soluble de la cámara reteniendo al mismo tiempo los agregados solubles e insolubles.

La desgasificación es la retirada de gases disueltos en soluciones y puede ser ventajosa. El gas es mucho más soluble en líquidos a presión alta en comparación con la presión atmosférica y, en consecuencia, cualquier espacio de cámara volátil de gas en una muestra se convertirá en solución tras la presurización. Las consecuencias son dobles: el oxígeno adicional en la solución puede degradar químicamente el producto proteínico y el gas que sale de la solución tras la represurización puede provocar agregación adicional. Por tanto, pueden prepararse muestras con soluciones desgasificadas y toda la cámara volátil debe llenarse con líquido antes de la presurización.

En determinados aspectos, la invención proporciona composiciones farmacéuticas y métodos de administración a

pacientes. Las composiciones, que pueden prepararse y/o evaluarse mediante los métodos de la invención, tienen potencial inmunógeno bajo. El potencial inmunógeno puede determinarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo títulos de anticuerpos, cantidad relativa o absoluta de anticuerpos presentes, reacciones inmunitarias clínicas tales como inflamación y reacciones asociadas a la anafilaxia (debilidad, picor, hinchazón, urticaria, calambres, diarrea, vómitos, dificultad para respirar, opresión en el pecho, presión arterial baja, pérdida de conciencia y choque), cantidad de tiempo requerida para que una preparación provoque anticuerpos detectables, cantidad de tiempo requerida para que una preparación provoque un título de anticuerpos específico y cantidad de tiempo requerido para una que preparación provoque un determinado nivel de concentración de anticuerpo. Los títulos de anticuerpos pueden medirse mediante cualquier ensayo de unión o neutralización conocido en la técnica.

En algunas realizaciones, la administración de la composición farmacéutica no da como resultado una pérdida de tolerancia inmunitaria a administraciones repetidas o proteínas endógenas. "Tolerancia" o "inmunotolerante" como se usa en el presente documento, se refieren a la ausencia de una respuesta inmunitaria a un antígeno específico (por ejemplo, la proteína terapéutica) en el contexto de un sistema inmunitario sustancialmente normal. La tolerancia es distinta de la inmunosupresión generalizada, en la que, todas o parte de las respuestas inmunitarias están disminuidas.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención se formulan para que tengan un potencial inmunógeno bajo. Por ejemplo, la cantidad de partículas de proteína en un intervalo subvisible (por ejemplo, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 micrómetros o de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 10 micrómetros de tamaño) está por debajo de una dosis inmunógena umbral determinada, por ejemplo, mediante IMF. Como se desvela en el presente documento, el análisis por IMF mostró agregados de partículas en formulaciones comerciales que no eran detectables por CET o inspección visual y se descubrió que estas soluciones eran inmunógenas en ratones. Dosis de partículas tan bajas como de 1,6 ng/dosis rompieron la tolerancia en ratones e indujeron respuestas inmunitarias a la proteína monomérica. Cuando la preparación se trató con presión hidrostática alta, las partículas se redujeron a un nivel de dosis de 0,02 ng/dosis y la inmunogenia se eliminó.

Por tanto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas y formulaciones que comprenden una proteína terapéutica, así como métodos de tratamiento con las mismas. La composición contiene partículas subvisibles (por ejemplo, en el intervalo de tamaño de 0,1 a aproximadamente 10 micrómetros) por debajo de aproximadamente 100 ng/dosis, por debajo de aproximadamente 50 ng/dosis, por debajo de aproximadamente 10 ng/dosis o por debajo de aproximadamente 2,0 ng/dosis. En determinadas realizaciones, las partículas subvisibles están por debajo de aproximadamente 1,5 ng/dosis, por debajo de aproximadamente 1,0 ng/dosis, por debajo de aproximadamente 0,5 ng/dosis, por debajo de aproximadamente 0,2 ng/dosis, por debajo de aproximadamente 0,1 ng/dosis o por debajo de aproximadamente 0,05 ng/dosis. La dosis puede ser de cualquier volumen aceptable, tal como de 1 ml en determinadas realizaciones. Generalmente, las partículas subvisibles están presentes por debajo de un umbral inmunógeno de manera que no rompan la tolerancia o de manera que tengan un potencial inmunógeno bajo tras la administración repetida.

La composición farmacéutica puede formularse para la administración de manera que, convencionalmente, tenga una tendencia a inducir reacciones inmunitarias al agente terapéutico, tal como administración intramuscular, subcutánea o intravenosa. La composición farmacéutica de acuerdo con la invención tiene un potencial inmunógeno bajo (incluso para posologías de tratamiento repetidas y/o crónicas).

La composición terapéutica puede estar indicada para la administración aguda o crónica, tal como, por ejemplo, la administración aproximadamente diaria, semanal o mensual durante un período de meses o incluso años (por ejemplo, de 2 a 20 años). Por tanto, la composición de proteínas puede administrarse una pluralidad de veces, incluyendo al menos tres administraciones, al menos 5 administraciones, al menos 10 administraciones, al menos 20 administraciones, al menos 50 administraciones, al menos 100 administraciones o más.

La proteína terapéutica puede estar indicada para el tratamiento de una enfermedad crónica, tal como diabetes mellitus (por ejemplo, de tipo 1 o de tipo 2), infección vírica crónica (por ejemplo, hepatitis A, B y/o C) o un trastorno autoinmunitario, tal como como esclerosis múltiple o artritis reumatoide, deficiencia de coagulación o deficiencia enzimática (por ejemplo, FCU). Otras enfermedades incluyen cáncer (por ejemplo, cáncer de mama, cáncer de pulmón, cáncer de colon), EPOC y asma. Se han descrito composiciones de proteínas de ejemplo para su uso en dichas indicaciones, que pueden evaluarse y/o reducirse en su inmunogenia de acuerdo con la invención. Proporcionando composiciones de proteínas terapéuticas que tienen un potencial inmunógeno bajo, la invención permite una terapia prolongada sin romper la tolerancia y/o sin disminuir el efecto terapéutico.

Ejemplos

EJEMPLO 1: Inmunogenia de agregados de hormona de crecimiento humana recombinante en modelos en ratón

Sumario

La agregación de productos de proteínas recombinantes es una preocupación debido a su potencial para inducir

respuestas inmunitarias. En este ejemplo, se examinó la inmunogenia de agregados de proteínas en formulaciones comerciales de hormona de crecimiento humana recombinante producida por congelación-descongelación o agitación, dos agresiones que se encuentran habitualmente durante la fabricación, envío y manipulación de productos de proteínas terapéuticas. Además, cada preparación se sometió a un tratamiento de presión alta para reducir el tamaño y la concentración de los agregados presentes en las muestras. Los agregados existentes en una formulación comercial, así como los agregados inducidos por congelación-descongelación y agitación, aumentan la inmunogenia en uno o más modelos en ratón. El uso de tratamiento a presión alta para reducir el tamaño y concentraciones de los agregados dentro de las formulaciones de hormona de crecimiento humana recombinante redujo su inmunogenia global de acuerdo con la hipótesis del "inmunón".

Introducción

Las proteínas terapéuticas son susceptibles de agregación en respuesta a una amplia diversidad de agresiones encontradas durante su fabricación, almacenamiento y entrega a los pacientes (1). A su vez, los agregados de proteínas terapéuticas pueden comprometer su seguridad y eficacia (2-5). La principal preocupación de seguridad es que los agregados en productos de proteínas terapéuticas pueden inducir respuestas inmunitarias (6, 7), lo que puede tener consecuencias que varían desde la reducción de la eficacia del producto hasta la muerte del paciente (8). En casos extremos, los agregados administrados por vía parenteral pueden inducir una reacción alérgica grave que da como resultado un choque anafiláctico (9, 10). Además, los anticuerpos formados contra las moléculas de proteínas agregadas tienen el potencial de reaccionar de forma cruzada con la proteína nativa (5). Esta reacción cruzada con la proteína nativa puede reducir la eficacia de la terapéutica debido a un aclaramiento más rápido de la proteína o a la neutralización de la proteína. Además de la neutralización de la proteína terapéutica nativa exógena, los casos han demostrado que los anticuerpos generados contra proteínas humanas terapéuticas recombinantes pueden reconocer proteínas humanas endógenas (11-13).

Las agresiones que frecuentemente provocan la agregación de proteínas, tales como la agitación (14) o la congelación (15) son comunes en la fabricación y envío de proteínas terapéuticas. La agitación (y la exposición resultante de proteínas a superficies de contacto tales como la superficie de contacto aire-líquido) puede provocar la agregación durante la fabricación, el envío y la manipulación del producto (16). Análogamente, la sustancia farmacológica a granel se congela habitualmente como una etapa de almacenamiento en el proceso de fabricación. Adicionalmente, el congelamiento accidental es un riesgo, en particular durante el almacenamiento refrigerado de formulaciones terapéuticas destinadas al uso doméstico (17). Los agregados producidos como resultado de diferentes agresiones pueden presentar diferentes distribuciones de tamaño y sus proteínas componentes pueden contener diferentes estructuras secundarias y terciarias (18), que presumiblemente exponen diferentes epítopos y, por tanto, provocan potencialmente diferentes respuestas inmunitarias (19). Estudios anteriores notificaron la inmunogenia de los agregados formados en formulaciones de interferón $\alpha 2$ (20, 21). En el estudio anterior, los agregados se generaron mediante oxidación con peróxido de hidrógeno, oxidación catalizada por metales, entrecruzamiento con glutaraldehído o exposición a pH extremo. Las condiciones que dan como resultado la agregación a través de la oxidación o la exposición a pH extremo pueden encontrarse en procesos industriales, pero la agregación de proteínas terapéuticas más frecuentemente es el resultado de agresiones incurridas durante la congelación-descongelación y agitación. Por tanto, el estudio actual se centra en agregados formados durante la agitación y la congelación-descongelación de la hormona de crecimiento humana recombinante (rhGH) y sus posibles impactos en la inmunogenia de la proteína. Este ejemplo también demuestra el uso de presiones hidrostáticas altas (200 MPa (~2 kbar)) como método para desagregar la proteína (22, 23) con una disminución resultante de la respuesta inmunitaria.

Debido a la falta de modelos sofisticados y a la necesidad de una mayor comprensión de la función inmunitaria humana, la predictibilidad preclínica de la inmunogenia a proteínas terapéuticas humanas recombinantes es problemática (24). Los estudios de inmunogenia preclínica con frecuencia se basan en modelos murinos, en parte porque los ratones son relativamente económicos y de bajo mantenimiento y están fácilmente disponibles. Los ratones no tratados anteriormente desarrollan inherentemente respuestas inmunitarias a proteínas extrañas (tales como las proteínas terapéuticas humanas). Sin embargo, los modelos murinos pueden demostrar respuestas inmunitarias potenciadas a muestras más inmunógenas y proporcionar un medio mediante el cual evaluar la inmunogenia relativa de diversos tipos de agregados de una proteína dada (25). Como alternativa, Hermeling et al. (26) desarrollaron recientemente un modelo en ratón transgénico en el que los ratones se alteraron genéticamente para producir una proteína humana con el fin de eliminar la respuesta inmunitaria innata a esa proteína, pero la pertinencia de estos modelos para la predicción de respuestas en seres humanos también sigue siendo incierta.

En este estudio, los inventores usaron tres modelos murinos para medir la respuesta inmunógena a agregados de proteínas producidos mediante agresiones por agitación o congelación-descongelación en dos formulaciones comerciales de rhGH. Los agregados se caracterizaron por el tamaño y la conformación de las moléculas de proteína componentes. Los dos modelos murinos utilizados, el de adultos no tratados anteriormente y el transgénico, son similares a los modelos utilizados en trabajos anteriores (25, 26). El tercer modelo murino es un modelo sensibilizado neonatalmente en el que los ratones se sensibilizan a la rhGH en la etapa neonatal (27-29). El modelo sensibilizado neonatalmente se eligió para imitar el efecto de anticuerpos preexistentes de baja concentración a una proteína terapéutica. Se ha notificado que los anticuerpos formados durante el tratamiento con una proteína

terapéutica pueden encontrarse en el paciente en algunos casos hasta 59 meses después de suspender el tratamiento con esa opción terapéutica (30-32). La presencia de anticuerpos contra un agente terapéutico en un paciente después del cese de la terapia podría presentar riesgos desconocidos si el paciente recayese y necesitaría tratamiento adicional con ese agente terapéutico.

5

Materiales y métodos

Materiales

10 Las dos formulaciones comerciales de rhGH Nordiflex® (Novo Nordisk®, Bagsvaerd, Dinamarca) y Saizen® (Serono, Rockland, MA), se adquirieron en la farmacia de la Universidad de Colorado y en lo sucesivo en el presente documento se denominarán Producto A y Producto B, respectivamente. También se adquirieron agua estéril para inyección (AEPI) (Hospira, Inc., Lake Forest, IL) y cloruro de sodio al 0,9 % para inyección (Hospira, Inc., Lake Forest, IL) en la farmacia de la Universidad de Colorado. Se adquirieron histidina y manitol en JT Baker (Phillipsburg, NJ). Se adquirió Pluronic F-68 en Spectrum Chemicals (New Brunswick, NJ). Se obtuvo fenol en Sigma Chemicals (San Luis, MO).

15

Preparación de la muestra

20 Para las muestras producidas a partir de la formulación líquida de rhGH, Producto A, se usaron viales de 15 mg/1,5 ml para la preparación de la muestra. La rhGH se diluyó a una concentración de 1 mg/ml. Se usó uno de los dos diluyentes: (1) una solución de composición idéntica al tampón de formulación de Producto A: histidina 1,13 mg/ml, Pluronic F-68 3 mg/ml, fenol 3 mg/ml, manitol 19,3 mg/ml en AEPI a pH 6,5; (2) la formulación de Producto A sin Pluronic F-68: histidina 1,13 mg/ml, fenol 3 mg/ml, manitol 19,3 mg/ml en AEPI a pH 6,5.

25

Para las muestras generadas a partir de la formulación de rhGH liofilizada, Producto B, se usaron viales de 8,8 mg para la preparación de la muestra. Las muestras liofilizadas se reconstituyeron con 3 ml de AEPI dando como resultado una formulación que contenía rhGH 2,9 mg/ml, sacarosa 20,1 mg/ml y ácido o-fosfórico 0,68 mg/ml a un pH entre 6,5 y 8,5.

30

Para inducir la formación de agregados por agitación, se pipetearon muestras de 0,6 ml del Producto A preparado con el diluyente 2 o la formulación de Producto B en tubos de polipropileno de 2 ml, que se colocaron horizontalmente en un agitador de placa de titulación Lab-line y se agitaron a aproximadamente 1000 rpm durante 72 horas a temperatura ambiente. Se agruparon un total de seis tubos de polipropileno de 2 ml que contenían 0,6 ml de Producto A preparado con diluyente 2 para formar un lote grande de muestra después de las 72 horas de agitación. De manera similar, se combinó el contenido de dos tubos de polipropileno de 2 ml que contenían 0,6 ml de formulación de Producto B después de 72 horas de agitación. Las muestras procesadas de esta manera se denominan "Producto A agitado" y "Producto B agitado".

35

40 Se congelaron-descongelaron muestras (denominadas "Producto A CD" y "Producto B CD") colocando 0,75 ml de formulación de Producto A (diluyente 1) o formulación de Producto B en cada uno de un total de cinco tubos de polipropileno de 2 ml y dos tubos de polipropileno de 2 ml, respectivamente. Los tubos se colocaron en nitrógeno líquido durante un minuto para garantizar la congelación completa de las muestras. Para descongelar las muestras, los tubos se suspendieron en un baño de agua a 22 °C durante diez minutos. El ciclo de congelación-descongelación se repitió 20 veces y los tubos adecuados se agruparon para formar un lote de Producto A CD y un lote de Producto B CD.

45

Se usaron muestras de formulación de Producto A y formulación de Producto B que no se agitaron ni se congelaron-descongelaron como controles para estudios de inmunogenia. Estos controles se denominan simplemente "formulación de Producto A" y "formulación de Producto B". Las muestras se almacenaron a 4 °C.

50

Desagregación con presión hidrostática alta

55 Los efectos de la presión hidrostática alta sobre las soluciones de rhGH y las soluciones que contenían agregados de rhGH suspendidos o solubles (muestras agitadas, de CD y de formulación de Producto A o Producto B) se examinaron colocando en primer lugar 1,5 ml de muestras agrupadas de Producto A y 0,75 ml de muestras agrupadas de Producto B en Cajones Pro-VENT™ E150 (BaroFold, Inc., Boulder, CO). Después, las muestras se cargaron en un recipiente a presión Pre-EMT™ E150 (BaroFold, Inc., Boulder, CO) a temperatura ambiente y se presurizaron con agua. La presión se aumentó a una velocidad de 10 MPa/minuto (0,1 kbar/minuto) hasta que se alcanzó una presión de 200 MPa (2 kbar). A 200 MPa (2 kbar), la temperatura del recipiente a presión alta se aumentó a 70 °C y las muestras se incubaron durante 16 horas. La presión alta junto con las altas temperaturas (≥65 °C) son necesarias para superar los enlaces de hidrógeno intermoleculares para que se produzca una desagregación y un replegamiento adecuados con la hormona de crecimiento humano (23). Antes de la despresurización (10 MPa/min (0,1 kbar/min)), el recipiente a presión se enfrió a temperatura ambiente. Las muestras de Producto A agitado, Producto A CD y formulación de Producto A tratado a presión alta se denominan "Producto A agitado PA", "Producto A CD PA" y "formulación de Producto A PA" respectivamente. Se usa una

65

notación similar para muestras de Producto B tratado a presión alta.

Análisis cromatográfico de rhGH

- 5 Se cuantificaron los niveles de monómeros y agregados solubles de rhGH usando cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (HPLC-ET). Se usó una columna Superdex™ 75 10/300 GL para el ensayo de HPLC-ET. Un HPLC Beckman Coulter System Gold con 126 módulos de disolvente y un automuestreador Waters se usaron en línea con un detector ultravioleta configurado a una longitud de onda de 280 nm. La fase móvil fue solución salina tamponada con fosfato (PBS) (KH₂PO₄ 2 mM, NaH₂PO₄ 10 mM, KCl 3 mM, NaCl 140 mM, pH 7,4) y el caudal fue de 0,6 ml/min. El volumen de inyección de muestra fue de 50 µl. Las muestras se mantuvieron a 4 °C en el automuestreador hasta la inyección. Los datos se recogieron durante un período de 90 minutos. Después, los cromatogramas se importaron al software GRAMS (Thermo Electron Corp., Waltham, MA) y se integraron para determinar las áreas para los picos respectivos. Los porcentajes de áreas de pico se calculan basándose en las áreas obtenidas a través de integraciones de cromatogramas de HPLC-ET. Los porcentajes de áreas de pico fueron con respecto a las áreas de pico de control de monómeros mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Área}_{\text{pico}}}{\text{Área}_{\text{control de monómero, total}}} \times 100 \quad \text{Ec. 1}$$

- 20 Los porcentajes de áreas de pico de agregados insolubles se determinaron mediante el siguiente equilibrio de masas:

$$\frac{\text{Área}_{\text{control de monómero, total}} - \text{Área}_{\text{preparación, total}}}{\text{Área}_{\text{control de monómero, total}}} \times 100 \quad \text{Ec. 2}$$

- 25 se calcularon intervalos de confianza del 95 % a partir de inyecciones por triplicado de cada muestra en la HPLC-ET.

Análisis de la degradación química resultado del tratamiento a presión alta

- 30 Se usó cromatografía de intercambio aniónico para determinar la desamidación de rhGH antes y después de la presurización. El método utilizado se adaptó de un método publicado anteriormente (33). Un sistema de HPLC Agilent 1100 se equipó con una columna Tosoh TSK SuperQ-5PW y tampones de ejecución de fosfato de potasio 10 mM, acetonitrilo al 10 % pH 7,4 (A) y fosfato de potasio 250 mM, acetonitrilo al 10 % pH 7,4 (B). La proteína se eluyó usando un gradiente lineal de B al 0-80 % durante 45 minutos. Cualquier proteína restante se eluyó con una etapa de lavado con B al 100 % seguida de un equilibrado de 7 minutos de B al 0 %. La absorbancia a 280 nm se registró durante 55 minutos.

- 35 Se realizó una espectroscopía de ionización por desorción láser asistida por matriz (MALDI) en un sistema Voyager (Applied Biosystems, Foster City, CA). La matriz utilizada fue el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico.

SDS-PAGE

- 40 Se realizó una SDS-PAGE en geles de poliacrilamida de tris-glicina premoldeados en condiciones reductoras y no reductoras. Las muestras se diluyeron 2 veces en tampón de muestra de SDS de tris-glicina Invitrogen Novex® (reductor) o tampón nativo de tris-glicina Invitrogen Novex® (no reductor) y se calentaron durante 5 minutos a 75 °C. Se cargó un total de 4 µg de proteína de cada muestra en un volumen de 10 µl en los pocillos del gel de tris-glicina Novex premoldeado al 4-20 % de 1,0 mm y se dejó ejecutar durante 1 hora a temperatura de laboratorio a 200 voltios. El gel se tiñó con azul coomassie y se tomaron fotos digitales.

Dimensionamiento de partículas

- 50 Se usó un COULTER COUNTER® de la serie Beckman Z1™ (Fullerton, CA) para contar partículas en soluciones que contenían agregados insolubles. El instrumento tenía la capacidad de detectar partículas de 1,5 micrómetros y más grandes. Se contaron partículas en intervalos de 1,5-3 micrómetros, 3-6 micrómetros y 6-9 micrómetros cinco veces para cada muestra. Los recuentos se promediaron y se determinaron intervalos de confianza del 95 %.

Espectroscopía de DC

- 60 Se obtuvieron espectros de dicroísmo circular para las muestras de Producto B (formulación de Producto B, Producto B CD y Producto B agitado) de 190 a 250 nm a 22 °C en una cubeta de cuarzo de 0,1 cm usando un espectropolarímetro Jasco J-810. Los espectros fueron un promedio de tres mediciones con el espectro de tampón restado de los espectros de proteínas. Para determinar el espectro de los agregados en una muestra, los espectros de DC se corrigieron restando el espectro de monómero multiplicado por la cantidad de monómero presente en la muestra. Después, los espectros se convirtieron en elipticidad molar usando un peso molecular residual medio de

115. El porcentaje de hélice alfa, lámina beta, vueltas y enrollamiento aleatorio se determinó para cada muestra usando el programa SELCON en el servidor en línea DICHROWEB (34). Se promedió el contenido estructural para muestras por triplicado y se determinaron intervalos de confianza del 95 %.

5 Espectroscopía de fluorescencia

Se tomaron espectros de emisión de fluorescencia para muestras solubles de 300 a 450 nm usando un fluorímetro Horiba Jobin Yvon Fluoromax-3. Se prepararon preparaciones por triplicado de la formulación de Producto B, Producto B CD y Producto B agitado como se ha descrito anteriormente. Las muestras estaban a una concentración de 0,04 mg/ml. Se usaron longitudes de onda de 260 nm, 280 nm y 295 nm para la excitación y las rendijas se ajustaron a 1 nm. Se tomó un promedio de 3 barridos para cada muestra y se restó un espectro de tampón apropiado del espectro de proteínas. Los barridos de emisión para preparaciones de agregados se corrigieron para la señal de monómero restando la emisión de monómero multiplicada por la fracción de monómero en cada muestra. El centro de masa espectral (CMS) se calculó para cada muestra usando el software SigmaPlot® (Systat Software Inc., San José, CA). El CMS promedio y los intervalos de confianza del 95 % se determinaron para cada preparación (formulación de Producto B, Producto B CD y Producto B agitado).

Espectroscopía de 2D-UV

20 Se tomaron espectros UV de muestras de rhGH soluble de 200 a 500 nm en intervalos de 1 nm con un tiempo de integración de 25 segundos en un espectrofotómetro Hewlett Packard 8453. Cada espectro de muestra se usó como blanco frente a un espectro de tampón. Las muestras agregadas se corrigieron para determinar el contenido de monómero restando el espectro de monómero multiplicado por la fracción de monómero presente en esa muestra. Se calcularon derivadas segundas de los espectros usando el software HP UV-Vis Chemstation (Hewlett Packard).

25

Espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (IRTF)

Se obtuvieron espectros de infrarrojos por transformada de Fourier (IRTF) para rhGH nativa y agregados insolubles de rhGH usando un espectrómetro IR Bomem™ (Quebec, Canadá) y un detector de KBr dTGS (sulfato de triglicina deuterado). Los agregados se centrifugaron a 5.000 rpm durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Los agregados se resuspendieron en su tampón apropiado (Producto A o Producto B) a una concentración de proteína de 20 mg/ml. La rhGH nativa tomada directamente del Producto A adquirido sin dilución a una concentración de 10 mg/ml se usó para obtener un espectro de IRTF. Una muestra no diluida del Producto A también se presurizó usando el mismo protocolo descrito anteriormente para obtener un espectro de IRTF de rhGH tratada a presión alta. De manera similar, se preparó una muestra de Producto B por reconstitución a una concentración más alta (5 mg/ml) y una muestra presurizada para adquirir espectros IRTF de la rhGH nativa en la formulación de Producto B y la formulación de Producto B tratado a presión alta. Se usó una célula de CaF₂ de longitud de trayectoria variable para las mediciones. El método utilizado para obtener y analizar espectros se ha descrito anteriormente (35). Todas las manipulaciones matemáticas de los espectros se realizaron en el software GRAMS (Thermo Electron Corp., Waltham, MA).

40

Animales

Se obtuvieron ratones C57/BL/6 gestantes cruzados con ratones CH3 en Charles River Laboratories (Raleigh, Carolina del Norte). Se usaron descendientes hembra adultos (≥ 6 semanas de edad) B6C3F1 para el ensayo de inmunogenia (véase a continuación).

45

Para sensibilizar los ratones B6C3F1 (descritos anteriormente) a rhGH para su uso en el modelo animal sensibilizado neonatalmente, se administraron inyecciones de 10 μ l que contenían 1 μ g de rhGH (ya sea formulación de Producto A o formulación de Producto B) por vía intraperitoneal en recién nacidos B6C3F1 durante 7 días consecutivos con la primera inyección administrada en las 24 horas posteriores al nacimiento. Estos ratones se enjaularon y se etiquetaron para separarlos de los animales modelo no tratados anteriormente B6C3F1. Se usaron ratones sensibilizados hembra adultos (≥ 6 semanas) para el ensayo de inmunogenia (véase a continuación).

50

Los ratones transgénicos que producían la hormona de crecimiento humana de la cepa B6.SJL-Tg(HBB-GH1)420King/J se adquirieron en los laboratorios Jackson (Bar Harbor, Maine). Los ratones se aclimataron durante al menos 7 días antes de su uso. Se usaron ratones hembra adultos (≥ 6 semanas de edad) para el ensayo de inmunogenia (véase a continuación).

55

60 Ensayos de inmunogenia en modelos animales

Una vez que los ratones no tratados anteriormente B6C3F1, B6C3F1 sensibilizados neonatalmente o transgénicos (B6.SJL-Tg(HBB-GH1)420King/J) fueron adultos, se tomaron muestras de sangre para que cada ratón pudiera servir como su propio valor basal (Día 0). Una vez a la semana durante cinco semanas (días 0, 7, 14, 21, 28) se recogió sangre del seno venoso retroorbital usando tubos capilares de microhematocrito Fisherbrand de 50 μ l. Los ratones se sedaron con gas inhalante de isoflurano durante todo el proceso de recogida de sangre. Después de recoger la

65

sangre, a cada ratón se le inyectó por vía subcutánea 10 µg de hormona de crecimiento humana (Producto B o Producto A) que se había sometido a una de las seis condiciones (es decir, agitada, CD, formulación, agitada PA, CD PA o formulación PA) y diluido en solución salina para inyección (Hospira, Lake Forest, Illinois, lote 49-521-DK) para un volumen total de 100 µl. Se usó un total de 8 ratones en cada grupo. Se proporcionó una muestra separada de tampón sin proteína diluida a 100 µl en solución salina para inyección (Hospira, Lake Forest, Illinois, lote 49-521-DK) en cada modelo animal como control negativo. Adicionalmente, se administró un control positivo de 10 µg de ovoalbúmina en 100 µl de solución salina para inyección (Hospira, Lake Forest, Illinois, lote 49-521-DK) al modelo transgénico. Los ratones recibieron un total de tres inyecciones los días 0, 7 y 14 después de que se realizó la recogida de sangre inicial. El día 28, los ratones se sacrificaron mediante desangrado y dislocación cervical.

Los sueros recogidos se analizaron para determinar la respuesta de anticuerpos específicos de IgG usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA). Los pocillos de las placas Immulon 4 High Binding Affinity (ISC Bioexpress, Kaysville, UT) se incubaron con 200 µl de una solución de rhGH monomérica diluida (16 µg/ml) preparada a partir de las formulaciones de Producto A o Producto B a temperatura de laboratorio durante la noche con agitación suave. Después, los pocillos se drenaron y se lavaron tres veces con PBS. Después del lavado final, los pocillos se secaron dando golpecitos sobre una toalla de papel. Después, los pocillos se bloquearon con 200 µl de albúmina de suero bovino al 1 % (BSA) en PBS durante 1 hora. Después de la aplicación de la solución de bloqueo, los pocillos se lavaron tres veces con una solución de PBS. Los pocillos en las filas B-H se cargaron con 100 µl de tampón de dilución (HEPES 40 mM, EDTA disódico 10 mM, cloruro de sodio 150 mM con BSA al 1 % y tritón al 0,1 % x100). Después, los sueros se diluyeron 1:20 en el tampón de dilución y se añadieron a los pocillos en la fila A. Cada placa tenía dos curvas patrón de concentración conocida de anticuerpo monoclonal de ratón [GH-2] contra la hormona de crecimiento humano (Abcam ab9822, Cambridge, MA). Usando una pipeta multicanal, se transfirieron 100 µl de los sueros diluidos de la fila A a los pocillos de la fila B. Después, la solución de la fila B se mezcló extrayendo y expulsando 100 µl (5 veces) en los pocillos antes de transferir 100 µl a los pocillos de la fila C. Las diluciones 2X continuaron hasta la fila G. Las placas se sellaron y se dejaron incubar a temperatura de laboratorio durante 30 minutos. Después, los pocillos se lavaron 3 veces con una solución de HEPES 40 mM, EDTA disódico 10 mM, cloruro de sodio 150 mM y Triton X 100 al 0,1 % y se secaron dando golpecitos sobre una toalla de papel. Los pocillos se incubaron con 100 µl de anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante (Chemicon, AP308A, Temecula, CA) diluido 1:8000 en tampón de dilución. Después de 1 hora, los pocillos se lavaron tres veces con PBS y se secaron dando golpecitos sobre una toalla de papel, seguido de la adición de 100 µl de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina a cada pocillo. Después de 20 minutos, se añadieron 50 µl de ácido sulfúrico 0,5 M a los pocillos para detener la reacción. La absorbancia se registró con un lector de placa cinético "Vmax" de Molecular Devices (Sunnyvale, CA) a una longitud de onda de 450 nm y una longitud de onda de referencia de 595 nm. La respuesta de ELISA se publicó en unidades de ng/ml y se calculó a partir de la respuesta de absorbancia promedio en una curva patrón multiplicada por su factor de dilución. La curva patrón (valor de r² de 0,99) se generó a partir de los patrones en cada placa usando un ajuste de cuatro parámetros en Softmax (Sunnyvale, CA) con un intervalo de concentración de anticuerpos de 1250 ng/ml a 10 ng/ml.

Los ensayos de ELISA también se realizaron usando placas Immulon 4 recubiertas con rhGH tratada a presión alta (16 µg/ml) para determinar si se observaron diferencias en las respuestas inmunitarias entre material presurizado y no presurizado. El suero se analizó usando el mismo protocolo descrito anteriormente.

Los datos se modelaron como un diseño factorial general con 1 respuesta y niveles apropiados para el número de grupos en cada estudio. Cada grupo de muestra tuvo ocho réplicas. El programa de software Stat-Ease 7.2.1 (Minneapolis, MN) se usó para realizar un análisis lineal de varianza (ANOVA). La probabilidad de una [p] entre medias de grupos se comparó con un intervalo de confianza del 90 %. Cuando se compararon las medias, las probabilidades de [p] < 0,1 fueron significativas en función del intervalo de confianza del 90 % elegido.

Resultados

Agresión de las muestras de rhGH

Las respuestas de las formulaciones de Producto A y Producto B a las diversas agresiones (agitación, congelación-descongelación) fueron diferentes. Las muestras de Producto A agitado estaban turbias al final de las 72 horas de agitación, mientras que las muestras de Producto B agitado todavía estaban transparentes. De forma similar, las muestras de Producto A CD comenzaron a enturbiarse alrededor del ciclo 12-15 de congelación-descongelación; sin embargo, el Producto B CD nunca mostró signos de turbidez incluso después del vigésimo ciclo de congelación-descongelación. Se cree que el contraste en los agregados producidos en las dos muestras es provocado por la presencia de fenol en la formulación A. Los compuestos fenólicos han demostrado anteriormente que inducen la formación de grandes agregados insolubles de rhGH.36

Caracterización de los agregados dentro de las muestras de rhGH

Se usó HPLC-ET para determinar el estado de agregación de cada tipo de muestra. En la formulación de Producto B, no se pudieron detectar agregados solubles o insolubles (**Figura 1**). Después de la aplicación de agresiones de congelación-descongelación o agitación, los niveles de agregados solubles aumentaron al 31 % y al 69 %

respectivamente. El tratamiento a presión alta del Producto B CD y el Producto B agitado dio como resultado un aumento sustancial de los niveles de monómero y composiciones de agregado de dímero soluble del 4 y el 3 %, respectivamente (**Figura 2**). La muestra de formulación de Producto B tratada con presión alta tenía un contenido agregado de dímero soluble del 1 %.

5 En la **Figura 1** se muestran los cromatogramas HPLC-ET para la formulación de Producto A, el Producto A CD y las muestras de Producto A agitado utilizados en los modelos de adultos no tratados anteriormente y animales no tratados anteriormente sensibilizados. La formulación de Producto A produjo agregados insolubles después de la congelación-descongelación o agitación que no pudieron inyectarse en la HPLC-ET, pero podría cuantificarse mediante un equilibrio de masa basado en la concentración de proteína de partida y la representada en los cromatogramas. La formulación de Producto A contenía un 2 % de agregado soluble, incluso antes de ser sometida a agresión por agitación o congelación-descongelación (**Figura 1**). A partir de la porción ampliada del cromatograma parece que estos agregados están compuestos principalmente de dímero con cantidades relativamente más pequeñas de oligómeros de mayor peso molecular. La muestra de Producto A agitado contenía un 12 % de agregado soluble y un 42 % de agregado insoluble. El Producto A CD tenía solo un 5 % de agregado soluble y un 72 % de agregado insoluble. Las tres preparaciones de Producto A (formulación, agitación y CD) presentaron agregados solubles en el volumen vacío de la columna Superdex 75 10/300 (-700 segundos) que indica agregados con pesos moleculares superiores a 100.000. Después del tratamiento a presión alta, hubo un aumento significativo en el nivel de monómero para las muestras tanto de Producto A agitado como de Producto A CD, con un contenido de agregados solubles posterior al tratamiento a presión del 7 y el 4 % respectivamente (**Figura 2**). No se detectaron agregados insolubles en las muestras tratadas a presión alta. La formulación de Producto A tratado a presión alta (formulación PA) tenía un contenido agregado de dímero soluble del 2 %.

Las muestras utilizadas en el modelo animal transgénico se prepararon por separado de las de los modelos no tratados anteriormente y sensibilizados y dieron como resultado niveles y tipos de agregados similares para los diferentes tratamientos (**Figura 3**).

Todas las preparaciones se analizaron mediante SDS-PAGE para evaluar la presencia de agregados covalentes (datos no mostrados). Ninguna preparación para ninguna formulación contenía niveles detectables de agregados unidos covalentemente.

Las estructuras secundarias de las moléculas de proteína en los agregados insolubles producidos en la formulación de Producto A se determinaron usando espectroscopía infrarroja. La proteína en agregados producidos a través de agitación y congelación-descongelación conserva la estructura secundaria alfa-helicoidal nativa, como se demuestra mediante la señal fuerte a 1654 cm^{-1} en la **Figura 4**. Aunque las agresiones producen grandes agregados insolubles, la estructura secundaria general de las moléculas de rhGH componentes se alteró mínimamente. La estructura secundaria del Producto A y el Producto B antes y después del tratamiento a presión alta también se determinó mediante espectroscopía infrarroja. No se observaron diferencias en las estructuras secundarias de la formulación de Producto A y su homólogo tratado a presión alta a pesar de que la desamidación se produce durante el tratamiento a presión alta (Datos no mostrados). De manera similar, la formulación de Producto B tratada a presión conservó la estructura alfa-helicoidal nativa (datos no mostrados).

El tamaño y el número de las partículas producidas en las preparaciones agregadas de Producto A se determinaron mediante el uso de un contador Coulter Beckman. El límite inferior de detección fue de 1,5 micrómetros. La muestra de Producto A CD tenía el 97 % de sus partículas en el intervalo de 1,5-3 micrómetros y el 3 % en el intervalo de 3-6 micrómetros. No hubo partículas detectables en el intervalo de 6-9 micrómetros para la muestra de Producto a CD. La muestra de Producto A agitado tenía un 85 % de partículas de 1,5-3 micrómetros, un 14 % de partículas de 3-6 micrómetros y un 1 % de partículas de 6-9 micrómetros. Ni la muestra de Producto A CD ni la muestra de Producto A agitado tenían partículas detectables superiores a 9 micrómetros.

Se obtuvieron espectros de DC para las preparaciones solubles de Producto B que se hicieron por triplicado como método para analizar la estructura secundaria de los agregados (**Figura 5**). La dispersión de luz de los agregados insolubles impidió el uso de espectroscopía de DC para el análisis de muestras de Producto A agregado. La preparación de Producto B agitado conserva más del contenido alfa helicoidal que la preparación de Producto B CD, con composiciones del 59 % y el 54 % respectivamente. El Producto B CD tiene más contenido de lámina β que las muestras de formulación de Producto B y Producto B agitado. Tanto las muestras de Producto B CD como las de Producto B agitado tienen al menos un aumento del 2 % en estructuras de enrollamiento aleatorio en comparación con la preparación de formulación de Producto B.

Se usaron barridos UV de las preparaciones de agregado soluble en la caracterización de la estructura terciaria de la proteína en las muestras de Producto B con agresión. Las muestras de Producto B se hicieron por triplicado y se calculó el intervalo de confianza del 95 % para las mediciones medias. Las muestras de Producto A no se pudieron analizar con UV debido a la dispersión de luz provocada por los agregados insolubles. Las posiciones máximas en los segundos barridos UV derivativos de 270-300 nm pueden usarse para describir la estructura terciaria de las proteínas mediante la identificación de los microambientes alrededor de los restos de tirosina (Tyr) y triptófano (Trp) (37, 38). Los espectros para la proteína en las muestras tanto de Producto B agitado como de Producto B CD

tuvieron desplazamientos de color rojo en los picos de tirosina con los desplazamientos más predominantes observados en el espectro para la preparación de CD. Las moléculas de hormona de crecimiento humana contienen ocho restos de tirosina. A partir de los desplazamientos de color rojo observados en las dos muestras agregadas queda claro que una o más tirosinas están más expuestas a entornos más apolares, lo que indica un cambio en la estructura terciaria. El único triptófano ubicado en una región α -helicoidal de la proteína tiene pocos cambios en su microambiente, como se evidencia a partir de la posición constante del pico a 293 nm.

También puede usarse espectroscopía de fluorescencia como método para controlar la estructura terciaria de la proteína. Pueden usarse diferentes longitudes de onda de excitación para controlar el cambio en los microambientes de los restos de tirosina y triptófano. Debido a la dispersión de luz de los agregados insolubles, no pudieron analizarse muestras de Producto A con fluorescencia. Se registraron barridos de emisión de la formulación de Producto B soluble, Producto B CD y Producto B agitado a longitudes de onda de excitación de 260, 280 y 295 nm. La longitud de onda a la que se observó la intensidad de fluorescencia más alta ($\lambda_{\text{máx}}$) se determinó para cada barrido de emisión. Cada preparación se realizó por triplicado y se calcularon intervalos de confianza del 95 % para la media. Se observaron desplazamientos de color rojo ligeros en $\lambda_{\text{máx}}$ para los barridos de emisión de muestras de Producto B agitado y Producto B CD a una longitud de onda de excitación de 260 nm que indica ligeras alteraciones en la estructura terciaria alrededor del resto de triptófano. Sin embargo, la $\lambda_{\text{máx}}$ a una longitud de onda de excitación de 295 nm no es estadísticamente diferente entre los tres tipos de muestra. Por tanto, de acuerdo con la segunda espectroscopía UV derivada, la $\lambda_{\text{máx}}$ a una excitación de 295 nm indica que los agregados formados en las formulaciones de Producto B CD y agitado tienen un cambio mínimo en el α -hélice que contiene el triptófano único de la molécula.

Análisis de la degradación química resultante del tratamiento a presión alta

Los niveles de desamidación se midieron antes y después de la presurización mediante cromatografía de intercambio aniónico. Se descubrió que el porcentaje de rhGH desamidada aumenta con la presurización. Para el Producto A, la cantidad de proteína desamidada aumentó del 6 al 60 % después del tratamiento a presión alta. El Producto B experimentó un aumento del 2 al 92 % después de ser sometido a presión alta. Los experimentos de MALDI detectaron cambios en el peso molecular coherentes con la desamidación en la muestra sometida a tratamiento a presión alta. No se observó evidencia de otra degradación química (por ejemplo, oxidación o fragmentación).

Inmunogenia

En ratones no tratados anteriormente adultos y sensibilizados neonatalmente, se observaron niveles máximos de anticuerpos en muestras de suero recogidas en la semana 4 (**Figura 6**). Sin embargo, los tres modelos animales generaron diferentes niveles de producción de anticuerpos a lo largo del curso del estudio. Los ratones sensibilizados neonatalmente presentaron niveles de IgG anti-hGH de mg/ml, mientras que los ratones adultos no tratados anteriormente dieron como resultado la producción de anticuerpos en $\mu\text{g/ml}$. Los ratones transgénicos no tuvieron anticuerpos IgG anti-hGH detectables presentes en ninguno de los grupos de tratamiento.

Se midieron respuestas inmunitarias usando placas ELISA recubiertas con rhGH nativa o rhGH tratada a presión alta. No se observaron diferencias estadísticamente significativas de títulos de anticuerpos entre los dos tipos de placas (datos no mostrados). Por tanto, los resultados a continuación se proporcionan en títulos contra la rhGH nativa que no se sometió a tratamiento a presión alta.

Todas las preparaciones del Producto A y el Producto B indujeron una respuesta inmunitaria en los ratones sensibilizados neonatalmente. El nivel aumentado de IgG anti-hGH, así como la presencia de anticuerpos en la semana 1, antes de la primera inoculación (**Figura 6**) en el modelo sensibilizado sugiere que se consiguió la sensibilización. El control negativo de tampones solos no indujo ninguna respuesta. Aunque todos los animales produjeron anticuerpos contra la hormona de crecimiento humano, se observaron algunas diferencias basadas en el tratamiento. Para las muestras de Producto A, ninguna de las muestras con agresión (Producto A agitado, Producto A CD) produjo una respuesta inmunitaria significativamente superior a la de la formulación de Producto A. Aunque la respuesta inmunitaria promedio del Producto A FT fue superior a la de la formulación de Producto A, no puede establecerse como estadísticamente diferente ($p = 0,8577$). La formulación de Producto A en realidad indujo una respuesta inmunitaria más alta que el Producto A agitado ($p < 0,0001$). Los homólogos tratados a presión alta de estas muestras redujeron la inmunogenia de la formulación de Producto A ($p < 0,0001$) y Producto A CD ($p < 0,0001$); sin embargo, el Producto A agitado tratado a presión alta no redujo estadísticamente la respuesta inmunitaria ($p = 0,2348$) (**Figura 7**). También puede afirmarse que las muestras de Producto A tratado a presión alta (formulación de Producto A, Producto A agitado, Producto A CD) produjeron respuestas inmunitarias que no son significativamente diferentes. Las respuestas inmunitarias a las preparaciones de Producto B con agresión (CD, agitado) no fueron significativamente diferentes a las de la formulación de Producto B. Adicionalmente, cuando las preparaciones de Producto B se trataron con presión alta, la respuesta inmunitaria no cambió estadísticamente (**Figura 7**). No se encontró que las respuestas inmunitarias producidas a partir de formulación de Producto B PA, Producto B agitado y Producto B CD fueran significativamente diferentes.

Los ratones adultos no tratados anteriormente produjeron resultados similares a los ratones sensibilizados neonatalmente. Nuevamente, el control negativo del tampón de formulación solo para el Producto A y el Producto B no logró inducir una respuesta inmunitaria. Para las preparaciones de Producto A, el Producto A CD indujo una respuesta inmunitaria significativamente superior a la de la formulación de Producto A ($p < 0,0001$). El Producto A agitado produjo una respuesta inmunitaria promedio más baja que la formulación de Producto A, sin embargo, las respuestas no son significativamente diferentes ($p = 0,1979$). Las respuestas inmunitarias para la formulación de Producto A y las muestras de Producto A CD fueron significativamente más altas que las respuestas inmunitarias generadas por sus homólogos tratados a presión alta (formulación de Producto A PA, Producto A CD PA) (**Figura 8**). Las respuestas inmunitarias para el Producto A agitado y el Producto A agitado PA no son significativamente diferentes. Nuevamente, de forma similar a los ratones sensibilizados neonatalmente, las respuestas inmunitarias estadísticamente similares se generaron a partir de las tres preparaciones de Producto A tratado a presión alta y no fueron significativamente diferentes. Para las preparaciones de Producto B, ni el Producto B agitado ni el Producto B CD produjeron respuestas inmunitarias estadísticamente diferentes de las de la formulación de Producto B ($p = 0,1545$ y $0,3870$, respectivamente). La única preparación de Producto B tratado a presión alta que tuvo una respuesta inmunitaria más baja que su homólogo fue el Producto B agitado PA ($p = 0,0925$). Las respuestas inmunitarias generadas a partir de todas las muestras de Producto B tratado a presión alta no fueron significativamente diferentes.

A un grupo de 8 ratones se le inyectó ovoalbúmina como control positivo y anticuerpos inducidos satisfactoriamente. El control positivo produjo IgG anti-ovoalbúmina en los niveles de $\mu\text{g/ml}$ coherentes con las respuestas en los ratones adultos no tratados anteriormente que indican que los animales transgénicos tenían una función inmunitaria normal. Sin embargo, no se detectó respuesta inmunitaria a ninguna de las muestras de rhGH en ninguno de los animales transgénicos.

25 Análisis

La administración parenteral de agregados de una proteína terapéutica puede inducir respuestas inmunitarias a la proteína monomérica. Sin embargo, se sabe poco acerca de las características de los agregados que son capaces de inducir inmunogenia y el mecanismo mediante el cual provocan la respuesta (5). Pueden estimularse células B para producir anticuerpos en un mecanismo independiente de linfocitos T que requiere un antígeno con una estructura repetitiva (39). Dintzis et al. determinaron que con el fin de que los antígenos poliméricos activen las células B independientes de los linfocitos T, se requiere que los antígenos tengan un número mínimo de receptores antigénicos (10-20) con un espaciado característico, que se denomina "inmunón" (40). Dintzis et al. observaron que los inmunones de más de 100 kDa de peso molecular con un espaciado de epítipo de aproximadamente 100 angstroms fueron satisfactorios en la inducción de la activación de las células B (40). La antigenicidad de los epítipos repetidos altamente ordenados se ha confirmado en estudios posteriores que usan partículas similares a virus (PSV) con un espaciado del epítipo de 50-100 angstroms para activar las células B independientes de los linfocitos T (41, 42). Basándose en estas observaciones, los agregados de proteínas terapéuticas con tamaños similares, el contenido de epítipos repetidos y la conservación de la estructura proteínica casi nativa también podrían servir como antígenos para inducir una respuesta inmunitaria (5, 43). Por tanto, los inventores anticipan que la administración parenteral de agregados que sean lo suficientemente grandes (>100 kDa) y que conserven una estructura nativa significativa puede dar como resultado inmunogenia.

Las respuestas inmunitarias también pueden coestimularse administrando adyuvantes junto con antígenos proteínicos (44). Los adyuvantes atraen células fagocíticas tales como células dendríticas y potencian su activación (45). Las células dendríticas activadas a su vez pueden activar linfocitos T en linfocitos T citotóxicos o linfocitos T auxiliares (Th1 y Th2) (46). Los adyuvantes tales como el alumbre aumentan la respuesta Th2 y dan como resultado una mayor activación de las células B y la consiguiente producción de anticuerpos (47). Análogamente, los agregados de partículas grandes que contaminan un producto terapéutico pueden influir en las respuestas inmunitarias potenciando las respuestas Th2 (25). Los inventores especulan que los agregados de proteínas insolubles muy grandes podrían actuar de manera similar, "auto-adyuvante". No solo los grandes agregados insolubles pueden atraer a las células dendríticas, sino que existe la posibilidad de que las células dendríticas absorban el agregado a través de fagocitosis y escindan la molécula en fragmentos de péptidos para presentarlos en los CMH. Debido a que el agregado se forma a partir de múltiples moléculas de proteína, los fragmentos de péptidos presentados en los CMH podrían ser coherentes con los encontrados en la proteína monomérica nativa, lo que a su vez potenciaría el reconocimiento de las moléculas de proteína monoméricas como antígenos.

En el análisis de los presentes inventores, se descubrió que una formulación comercial del Producto A contenía un 2 % de agregados solubles mediante HPLC-ET. Publicaciones anteriores también han descubierto que los productos de rhGH Novo Nordisk® contienen entre el 1-5 % de agregados (48) y subproductos de degradación relacionados tanto con la oxidación como con la desamidación (49). La formulación de Producto A contenía oligómeros de orden superior que eluyeron cerca del volumen vacío de la columna de dimensionamiento, lo que indica que los agregados tenían pesos moleculares ≥ 100 kDa. Estudios anteriores también han demostrado que los agregados de hormona de crecimiento humana que eluyeron en fracciones de volumen vacío de una columna de filtración en gel Sephadex® fueron responsables de inducir anticuerpos en pacientes humanos (6). Se ha informado que la molécula de la hormona de crecimiento humana tiene 10 epítipos en su superficie externa reconocibles por anticuerpos

monoclonales (50). Teniendo en cuenta el número de epítomos en la molécula de hGH y los resultados de dimensionamiento de HPLC-ET, los agregados encontrados en la muestra de formulación de Producto A cumplen los criterios de inmunón para la activación de células B. De acuerdo con estas observaciones, el Producto A indujo una respuesta inmunitaria sustancial en los ratones adultos no tratados anteriormente y en los sensibilizados neonatalmente.

El Producto A CD indujo las respuestas inmunitarias más altas observadas en este estudio cuando se administró a ratones no tratados anteriormente y sensibilizados. Esta muestra tenía grandes agregados insolubles que contenían una estructura secundaria similar a la nativa, así como la presencia de agregados solubles más pequeños que eluyeron en los volúmenes de dímero y oligómero (PM > 100 kDa) de HPLC-ET. Los inventores especulan que los grandes agregados insolubles podrían actuar como adyuvantes y antígenos, dando como resultado por tanto la alta respuesta inmunitaria observada. En los ratones adultos no tratados anteriormente, el Producto A CD presentó una respuesta inmunitaria potenciada en comparación con la formulación de Producto A ($p < 0,001$). En los ratones sensibilizados neonatalmente, se observaron respuestas inmunitarias elevadas contra las formulaciones tanto de Producto A CD como de Producto A, pero las diferencias en las respuestas entre los dos no fueron estadísticamente significativas ($p = 0,86$). Los inventores especulan que, debido a que la respuesta secundaria mostrada por los ratones sensibilizados neonatalmente no requiere adyuvante, la presencia de agregados grandes en la formulación de Producto A CD no potenció la respuesta inmunitaria en estos ratones.

Después de que la formulación de Producto A se tratase con presión alta, solo quedaron agregados solubles de tamaño de dímero, reduciendo el peso molecular de los agregados por debajo del tamaño de ≈ 100 kDa requerido para la actividad inmunitaria. Esta muestra también dio como resultado una respuesta inmunitaria significativamente más baja que la del homólogo no tratado ($p < 0,0001$) en ratones sensibilizados neonatalmente y no tratados anteriormente. La reducción de los agregados con tratamiento de presión alta y, simultáneamente, la respuesta inmunitaria documenta que los agregados fueron responsables de la respuesta inmunitaria a la formulación de Producto A.

De manera similar, cuando el Producto A CD se trató con presión alta, el peso molecular y las concentraciones de agregados se redujeron. El contenido total de agregados se redujo del 77 % al 4 % y la agregación restante fue del tamaño de dímero. No hubo agregación insoluble presente después del tratamiento a presión alta. La reducción del peso molecular del agregado por debajo de 100 kDa y la eliminación de los agregados insolubles eliminarían las propiedades similares a adyuvantes y antigénicas que existen en la muestra de Producto A CD. Coherente con este hallazgo es la respuesta inmunitaria significativamente más baja inducida por el Producto A CD PA en comparación con la respuesta inmunitaria de la muestra de Producto A CD ($p < 0,0001$) tanto en los ratones adultos no tratados anteriormente como en los sensibilizados neonatalmente.

El tratamiento a presión dio como resultado un aumento de los niveles de desamidación para ambas formulaciones. Los niveles de desamidación en el Producto A aumentaron del 6 % al 60 %, mientras que los niveles de desamidación en el Producto B aumentaron del 2 % al 92 % después del tratamiento a presión. Los cambios en los niveles de desamidación no se correlacionaron con la respuesta inmunitaria y se detectaron respuestas inmunitarias equivalentes usando placas ELISA recubiertas con material recibido tal cual o proteína tratada a presión. La espectrometría de masas no detectó degradación química más allá de la desamidación. Además, la espectroscopía infrarroja mostró que la estructura secundaria de la proteína no se modificó mediante el tratamiento a presión alta. Por tanto, parece poco probable que los cambios conformacionales o químicos inducidos por la presión en la fracción de proteína soluble a granel sean los responsables de los cambios observados en la inmunogenia antes y después del tratamiento con presión.

La agitación y la congelación-descongelación del Producto B no dieron como resultado un aumento estadísticamente significativo en la respuesta inmunitaria en ratones sensibilizados neonatalmente o no tratados anteriormente, aunque estos tratamientos indujeron la formación de agregados solubles. Esto puede deberse a la falta de un efecto adyuvante porque no había presentes agregados insolubles. El tratamiento a presión alta del Producto B agitado redujo significativamente la cantidad y el tamaño de los agregados, así como la respuesta inmunitaria en ratones no tratados anteriormente. Nuevamente, este hallazgo es coherente con la hipótesis del "inmunón" indicada anteriormente mediante la eliminación los agregados antigénicos solubles más grandes.

Algunas de las muestras, tal como el Producto B CD y el Producto B agitado, contenían agregados (31 y 53 %, respectivamente), pero no dieron como resultado respuestas inmunitarias estadísticamente aumentadas en comparación con las formulaciones sin agresión. Los agregados solubles de la muestra de Producto B CD, que se eluyeron como dímeros, trímeros y oligómeros (> 100 kDa) mostraron una pérdida parcial de la estructura nativa en las moléculas de proteínas componentes. Por tanto, una explicación para la respuesta inmunitaria más baja al Producto B CD podría ser la pérdida de epítomos nativos, así como la falta de agregados insolubles con capacidad adyuvante. Análogamente, la respuesta inmunitaria más baja general del Producto A agitado tanto en ratones adultos no tratados anteriormente como en ratones sensibilizados neonatalmente podría indicar que los agregados de oligómeros solubles presentes en esta preparación no exponen los mismos epítomos nativos que los encontrados en las muestras de formulación de Producto A y Producto A CD. Sin embargo, debido a la baja concentración de estos agregados en las muestras, no se pudo caracterizar la estructura secundaria de la proteína dentro de los

agregados.

En los ratones no tratados anteriormente, los niveles de anticuerpos estaban generalmente en el intervalo de concentración de $\mu\text{g/ml}$. Sin embargo, en los ratones sensibilizados neonatalmente, los anticuerpos se produjeron a concentraciones de mg/ml , lo que es coherente con los niveles de anticuerpos producidos en una respuesta secundaria. Esto se espera puesto que los ratones utilizados en el modelo sensibilizado neonatalmente habían recibido inyecciones de la proteína monomérica anteriormente. Los ratones sensibilizados neonatalmente también tuvieron una fase de retraso más corta en la producción de anticuerpos, que es característica de una respuesta secundaria. Es importante indicar que publicaciones anteriores describen inyecciones en una etapa neonatal como un medio para inducir tolerancia a una proteína extraña en lugar de sensibilización (52-56). Sin embargo, el protocolo de los presentes inventores sensibilizó satisfactoriamente los ratones en una etapa neonatal permitiendo una respuesta inmunitaria potenciada cuando se les administró inoculaciones de refuerzo en una etapa adulta. Estudios recientes sugieren que la tolerancia que se había definido anteriormente como la reducción o la falta de proliferación de linfocitos T de ganglios linfáticos (57, 58) no equivale a la tolerancia inmunitaria. Esto se debe a que las inyecciones neonatales inducen linfocitos T de memoria contra el antígeno que se acumula en el bazo en lugar de en los ganglios linfáticos (58, 59).

Curiosamente, los ratones transgénicos no lograron producir una respuesta inmunitaria IgG a ninguna de las muestras de hormona de crecimiento humana recombinante. Por el contrario, los estudios anteriores en los que se usaron ratones transgénicos con interferón $\alpha 2b$ mostraron que la tolerancia podría romperse en respuesta a la administración de proteína agregada (21). Las diferencias importantes entre el estudio actual y los estudios anteriores pueden estar relacionadas con la función natural y la abundancia de las proteínas respectivas (5), así como con las cepas de ratón (60) utilizadas para generar los ratones transgénicos. El estudio actual usó la cepa B6.SJL-Tg(HBB-GH1)420King/J, que es resultado del cruce de C57BL/6J con cepas SJL, mientras que el estudio de interferón $\alpha 2b$ se basó en la cepa FVB/N (61). Tanto el nivel de proteína transgénica producida como la robustez del repertorio de células B son dependientes de la cepa. La cepa utilizada en nuestro estudio produjo hormona de crecimiento humana aproximadamente 195 ng/ml con control de un promotor betac de hemoglobina de oveja (62). No se publicaron los niveles de interferón humano $\alpha 2b$ producido en la estirpe transgénica utilizada en estudios anteriores. Además de las diferencias en las estirpes transgénicas creadas, la proteína que se produce puede tener un impacto en las respuestas inmunitarias resultantes. Tanto las células B como los linfocitos T tienen receptores generados por reordenamientos cromosómicos aleatorios que son específicos de los antígenos que pueden o no encontrarse a lo largo de la vida de un individuo (44). En algunos casos, los reordenamientos cromosómicos dan como resultado receptores en las células B y los linfocitos T que identifican moléculas propias. En el desarrollo temprano, estos linfocitos se suprimen del repertorio en un proceso denominado selección clonal (46). Es más fácil romper la tolerancia a las proteínas endógenas encontradas a niveles bajos debido a la posible supresión clonal incompleta de los linfocitos reactivos a estas proteínas durante la selección clonal (63). El interferón α generalmente se expresa a niveles bajos, casi indetectables ($< 3 \text{ UI/ml}$) en seres humanos sanos (64, 65); mientras que la hormona de crecimiento es una proteína más abundante, especialmente más temprano en la vida con una producción cíclica que varía de $10\text{-}40 \mu\text{g/l}$ y disminuye a $4 \mu\text{g/l}$ en la edad adulta (66, 67). Además de las diferencias relacionadas con la cepa entre el estudio actual y el estudio transgénico de interferón $\alpha 2b$ anterior, los diferentes métodos utilizados para formar agregados pueden proporcionar una explicación para la falta de respuesta inmunitaria a la rhGH agregada observada en los ratones transgénicos de los presentes inventores. El estudio anterior se basó en tratamientos relativamente duros tales como la oxidación forzada catalizada por metales, el entrecruzamiento con glutaraldehído, tratamientos térmicos extremos y pH extremo para crear una población agregada. Estos tratamientos pueden haber creado epitopos adicionales y/o más potentes en los agregados que los de los tratamientos relativamente más suaves de congelación-descongelación y agitación aplicados en este estudio.

Es importante indicar que en este estudio los inventores usaron técnicas de agregación acelerada para producir agregados en muestras de proteínas terapéuticas comerciales. Lo más probable es que una proteína terapéutica no experimente 20 ciclos de congelación-descongelación o agitación durante 72 horas; sin embargo, estas técnicas fueron necesarias para inducir suficiente agregación para provocar diferencias de respuesta inmunitaria en un corto período de tiempo. El objetivo era simplemente determinar si se podían observar diferencias en la inmunogenia de los agregados producidos a través de diferentes agresiones. Los inventores también eligieron detectar solo las respuestas inmunitarias contra la proteína monomérica nativa. Puede haber habido anticuerpos no detectados que fueran específicos de los agregados de proteína monomérica. Sin embargo, los inventores estaban más preocupados por los agregados que inducirían anticuerpos que tuviesen un reconocimiento cruzado suficiente de la proteína monomérica nativa debido a su relevancia clínica. Los anticuerpos que solo detectan agregados de proteína terapéutica pueden o no afectar a la eficacia del producto terapéutico. Los anticuerpos que solo reconocen la proteína monomérica nativa son mucho más preocupantes para la seguridad y eficacia de un producto terapéutico. Los agregados con una estructura similar a la nativa significativa probablemente producirían anticuerpos que podrían reaccionar de forma cruzada con la proteína monomérica nativa. Los datos de inmunogenia y los datos espectroscópicos de los presentes inventores son coherentes con la premisa de que los agregados de tipo nativo podrían inducir anticuerpos de reacción cruzada contra la proteína monomérica nativa.

65

Conclusiones

Este estudio ha demostrado que la inmunogenicidad de los agregados de proteínas puede depender de su tamaño y de la forma y las condiciones de solución mediante las que se producen. Los agregados que se encontraron en formulaciones comerciales existentes eran inmunógenos en los adultos no tratados anteriormente y en los ratones sensibilizados neonatalmente, al igual que los agregados generados por agresiones inducidas por congelación-descongelación o agitación aplicadas a las formulaciones, dos tipos de agresiones que se encuentran habitualmente durante la producción, manipulación y almacenamiento de formulaciones de proteínas. Adicionalmente, la formulación de reserva no contenía agregados (por CET), pero era inmunógena debido a partículas subvisibles. El uso de presión alta para reducir los niveles de agregados redujo la respuesta inmunitaria coherente con la hipótesis del inmunón.

Referencias

- Las siguientes referencias se incorporan en el presente documento como referencia en su totalidad.
1. Chi EY, Krishnan S, Randolph TW, Carpenter JF 2003. *Physical stability of proteins in aqueous solution: Mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. Pharmaceutical Research* 20 (9): 1325-1336.
 2. Braun A, Kwee L, Labow MA, Alsenz J 1997. *Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN-alpha) in normal and transgenic mice. Pharmaceutical Research* 14 (10): 1472-1478.
 3. Schellekens H 2003. *The immunogenicity of biopharmaceuticals. Neurology* 61 (9): S11-S12.
 4. Wang W, Kelner DN 2003. *Correlation of rFVIII inactivation with aggregation in solution. Pharmaceutical Research* 20 (4): 693-700.
 5. Rosenberg AS 2006. *Effects of protein aggregates: An immunologic perspective. Aaps Journal* 8 (3): E501-E507.
 6. Moore WV, Leppert P 1980. *Role of Aggregated Human Growth-Hormone (Hgh) in Development of Antibodies to Hgh. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 51 (4): 691-697.
 7. Ratner RE, Phillips TM, Steiner M 1990. *Persistent Cutaneous Insulin Allergy Resulting from High-Molecular-Weight Insulin Aggregates. Diabetes* 39 (6): 728-733.
 8. Porter S 2001. *Human immune response to recombinant human proteins. Journal of Pharmaceutical Sciences* 90 (1): 1-11.
 9. Barandun S, Jeunet F, Kistler P, Isliker H 1962. *Intravenous Administration of Human Gamma-Globulin. Vox Sanguinis* 7 (2): 157-&.
 10. Ellis EF, Henney CS 1969. *Adverse Reactions Following Administration of Human Gamma Globulin. Journal of Allergy* 43 (1): 45-&.
 11. Schellekens H 2002. *Bioequivalence and the immunogenicity of biopharmaceuticals. Nature Reviews Drug Discovery* 1 (6): 457-462.
 12. Gershon SK, Luksenburg H, Cote TR, Braun MM 2002. *Pure red-cell aplasia and recombinant erythropoietin. N Engl J Med* 346 (20): 1584-1585.
 13. Casadevall N, Nataf J, Viron B, Kolta A, Kiladjian J, Martin-Dupont P, Michaud P, Papo T, Ugo V, Teyssandier I, Varet B, Mayeux P 2002. *Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. N Engl J Med* 346 (7): 469-475.
 14. Sluzky V, Tamada JA, Klivanov AM, Langer R 1991. *Kinetics of Insulin Aggregation in Aqueous-Solutions Upon Agitation in the Presence of Hydrophobic Surfaces. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (21): 9377-9381.
 15. Carpenter JF RT, Chang BS. 2004. *Physical damage to proteins during freezing, drying and rehydration. Lyophilization of biopharmaceuticals*, ed., Nueva York: Springer. Págs. 423-442.
 16. Rathore N, Rajan RS 2008. *Current perspectives on stability of protein drug products during formulation, fill and finish operations. Biotechnol Prog* 24 (3): 504-514.

17. Eugene J. McNally CEL. 1999. *The Importance of a Thorough Preformulation Study*. En McNally EJ, editor *Protein Formulation and Delivery*, ed., Nueva York: Marcel Dekker, Inc. Págs. 111-138.
- 5 18. Seefeldt MB, Crouch C, Kendrick B, Randolph TW 2007. *Specific volume and adiabatic compressibility measurements of native and aggregated recombinant human interleukin-1 receptor antagonist: Density differences enable pressure-modulated refolding*. *Biotechnol Bioeng* 98 (2): 476-485.
- 10 19. Purohit VS, Middaugh CR, Balasubramanian SV 2006. *Influence of aggregation on immunogenicity of recombinant human factor VIII in hemophilia A mice*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 95 (2): 358-371.
- 20 20. Hermeling S, Aranha L, Damen JMA, Slijper M, Schellekens H, Crommelin DJA, Jiskoot W 2005. *Structural characterization and immunogenicity in wild-type and immune tolerant mice of degraded recombinant human interferon alpha2b*. *Pharmaceutical Research* 22 (12): 1997-2006.
- 15 21. Hermeling S, Schellekens H, Maas C, Gebbink M, Crommelin DIA, Jiskoot W 2006. *Antibody response to aggregated human interferon alpha2b in wild-type and transgenic immune tolerant mice depends on type and level of aggregation*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 95 (5): 1084-1096.
- 20 22. St John RJ, Carpenter JF, Randolph TW 1999. *High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (23): 13029-13033.
- 25 23. St John RJ, Carpenter JF, Balny C, Randolph TW 2001. *High pressure refolding of recombinant human growth hormone from insoluble aggregates - Structural transformations, kinetic barriers, and energetics*. *Journal of Biological Chemistry* 276 (50): 46856-46863.
- 30 24. Bugelski PJ, Treacy G 2004. *Predictive power of preclinical studies of recombinant therapeutic proteins in animals for the immunogenicity humans*. *Current Opinion in Molecular Therapeutics* 6 (1): 10-16.
- 35 25. Babiuk S, Skowronski DM, De Serres G, HayGlass K, Brunham RC, Babiuk L 2004. *Aggregate content influences the Th1/Th2 immune response to influenza vaccine: Evidence from a mouse model*. *Journal of Medical Virology* 72 (1): 138-142.
- 40 26. Hermeling S, Jiskoot W, Crommelin D, Bornaes C, Schellekens H 2005. *Development of a transgenic mouse model immune tolerant for human interferon beta*. *Pharmaceutical Research* 22 (6): 847-851.
- 45 27. Adkins B, Bu YR, Cepero E, Perez R 2000. *Exclusive Th2 primary effector function in spleens but mixed Th1/Th2 function in lymph nodes of murine neonates*. *Journal of Immunology* 164 (5): 2347-2353.
- 50 28. Adkins B 1999. *T-cell function in newborn mice and humans*. *Immunol Today* 20 (7): 330-335.
- 55 29. Singh RR, Hahn BH, Sercarz EE 1996. *Neonatal peptide exposure can prime T cells and, upon subsequent immunization, induce their immune deviation: Implications for antibody vs T cell-mediated autoimmunity*. *Journal of Experimental Medicine* 183 (4): 1613-1621.
- 60 30. Petersen B, Bendtzen K, Koch-Henriksen N, Ravnborg M, Ross C, Sorensen PS 2006. *Persistence of neutralizing antibodies after discontinuation of IFN beta therapy in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis*. *Multiple Sclerosis* 12 (3): 247-252.
- 65 31. Schellekens H, Casadevall N 2004. *Immunogenicity of recombinant human proteins: causes and consequences*. *Journal of Neurology* 251: 4-9.
32. Polman CH, Killestein J, Schellekens H 2006. *Neutralizing antibodies to interferon-beta may persist after cessation of therapy: what impact could they have?* *Multiple Sclerosis* 12 (3): 245-246.
33. Cleland JL, Johnson OL, Putney S, Jones AJS 1997. *Recombinant human growth hormone poly (lactico-glycolic acid) microsphere formulation development*. *Adv Drug Deliv Rev* 28 (1): 71-84.
34. Whitmore L, Wallace BA 2004. *DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data*. *Nucleic Acids Res* 32: W668-W673.
35. Dong A, Huang P, Caughey WS 1990. *Protein Secondary Structures in Water from 2nd-Derivative Amide-I Infrared-Spectra*. *Biochemistry* 29 (13): 3303-3308.
36. Maa YF, Hsu CC 1996. *Aggregation of recombinant human growth hormone induced by phenolic compounds*. *International Journal of Pharmaceutics* 140 (2): 155-168.

37. Kueltzo LA, Ersoy B, Ralston JP, Middaugh CR 2003. *Derivative absorbance spectroscopy and protein phase diagrams as tools for comprehensive protein characterization: A bGCSF case study. Journal of Pharmaceutical Sciences* 92 (9): 1805-1820.
- 5 38. Mach H, Middaugh CR 1994. *Simultaneous Monitoring of the Environment of Tryptophan, Tyrosine, and Phenylalanine Residues in Proteins by near-Ultraviolet 2nd-Derivative Spectroscopy. Anal Biochem* 222 (2): 323-331.
- 10 39. Galanaud P, Crevon MC, Erard D, Wallon C, Dormont J 1976. *2 Processes for B-Cell Triggering by T-Independent Antigens as Evidenced by Effect of Azathioprine. Cell Immunol* 22 (1): 83-92.
- 15 40. Dintzis HM, Dintzis RZ, Vogelstein B 1976. *Molecular Determinants of Immunogenicity - Immunon Model of Immune-Response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (10): 3671-3675.
- 20 41. Yang RC, Murillo FM, Delannoy MJ, Blosser RL, Yutzy WH, Uematsu S, Takeda K, Akira S, Viscidi RP, Roden RBS 2005. *B lymphocyte activation by human papillomavirus-like particles directly induces Ig class switch recombination via TLR4-MyD88. Journal of Immunology* 174 (12): 7912-7919.
- 25 42. Bachmann MF, Rohrer UH, Kundig TM, Burki K, Hengartner H, Zinkernagel RM 1993. *The Influence of Antigen Organization on B-Cell Responsiveness. Science* 262 (5138): 1448-1451.
- 30 43. De Groot AS, Scott DW 2007. *Immunogenicity of protein therapeutics. Trends Immunol* 28 (11): 482-490.
- 35 44. Charles A. Janeway PT, Mark Walport, Mark Schlomchik. 2005. *Immunobiology: The Immune System in Health*. 6 ed., Nueva York: Garland Science Publishing. Págs. 37-101.
- 40 45. Doan T, Melvold, R., Viselli, S., Waltenbaugh, C. 2008. *Immunology*. ed., Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins.
- 45 46. Charles A. Janeway PT, Mark Walport, Mark Schlomchik. 2005. *Basic Concepts in Immunology*. En Lawrence E, editor *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 6 ed., Nueva York: Garland Science Publishing. Págs. 1-36.
- 50 47. Friede M, Aguado MT 2005. *Need for new vaccine formulations and potential of particulate antigen and DNA delivery systems. Adv Drug Deliv Rev* 57 (3): 325-331.
- 55 48. Bristow AF, Jespersen AM 2001. *The second international standard for somatotropin (recombinant DNA-derived human growth hormone): Preparation and calibration in an international collaborative study. Biologicals* 29 (2): 97-106.
- 60 49. Hepner F, Csaszar E, Roitinger E, Pollak A, Lubec G 2006. *Massspectrometrical analysis of recombinant human growth hormone Norditropin (R) reveals amino acid exchange at M14_V14 rhGH. Proteomics* 6 (3): 775-784.
- 65 50. Strasburger CJ 1990. *Antigenic Epitope Mapping of the Human Growth-Hormone Molecule - a Strategy to Standardize Growth-Hormone Immunoassays. Acta Paediatrica Scandinavica*: 82-86.
51. Nakashima I, Kato N 1975. *Adjuvant Action of Capsular Polysaccharide of Klebsiella-Pneumoniae on AntibodyResponse .4. Roles of Antigen and Adjuvant for Induction of Primary and Secondary Antibody-Responses and for Development of Immunological Memory to Bovine Serum-Albumin. Japanese Journal of Microbiology* 19 (4): 277-285.
52. Gammon GM, Oki A, Shastri N, Sercarz EE 1986. *Induction of Tolerance to One Determinant on a Synthetic Peptide Does Not Affect the Response to a 2nd Linked Determinant - Implications for the Mechanism of Neonatal Tolerance Induction. Journal of Experimental Medicine* 164 (2): 667-672.
53. Clayton JP, Gammon GM, Ando DG, Kono DH, Hood L, Sercarz EE 1989. *Peptide-Specific Prevention of Experimental Allergic Encephalomyelitis - Neonatal Tolerance Induced to the Dominant T-Cell Determinant of Myelin Basic-Protein. Journal of Experimental Medicine* 169 (5): 1681-1691.
54. Billingham RE, Brent L, Medawar PB 1953. *Actively Acquired Tolerance of Foreign Cells. Nature* 172 (4379): 603-606.
55. Gammon G, Dunn K, Shastri N, Oki A, Wilbur S, Sercarz EE 1986. *Neonatal T-Cell Tolerance to Minimal*

Immunogenic Peptides Is Caused by Clonal Inactivation. Nature 319 (6052): 413-415.

56. Duclos TW, Kim BS 1977. *Suppressor T Cells - Presence in Mice Rendered Tolerant by Neonatal Treatment with Anti-Receptor Antibody or Antigen. Journal of Immunology* 119 (5): 1769-1772.

57. Maverakis E, Beech JT, Wilson SS, Quinn A, Pedersen B, Sercarz EE 2000. *T cell receptor complementarity determining region 3 length analysis reveals the absence of a characteristic public T cell repertoire in neonatal tolerance: The response in the "tolerant" mouse within the residual repertoire is quantitatively similar but qualitatively different. Journal of Experimental Medicine* 191 (4): 695-702.

58. Forsthuber T, Yip HC, Lehmann PV 1996. *Induction of T (H)1 and T (H)2 immunity in neonatal mice. Science* 271 (5256): 1728-1730.

59. Adkins P, Bu YR, Guevara P 2001. *The generation of th memory in neonates versus adults: Prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. Journal of Immunology* 166 (2): 918-925.

60. Klitgaard JL, Coljee VW, Andersen PS, Rasmussen LK, Nielsen LS, Haurum JS, Bregenholt S 2006. *Reduced susceptibility of recombinant polyclonal antibodies to inhibitory anti-variable domain antibody responses. Journal of Immunology* 177 (6): 3782-3790.

61. Beers MMCV. 2008. En Fradkin A, editor, ed.

62. Saban J, Schneider GB, Bolt D, King D 1996. *Erythroid-specific expression of human growth hormone affects bone morphology in transgenic mice. Bone* 18 (1): 47-52.

63. Rosenberg AS, Worobec A 2004. *A risk-based approach to immunogenicity concerns of therapeutic protein products Part 1 Considering consequences of the immune response to a protein. Biopharm International* 17 (11): 22- .

64. Thavasu PW, Longhurst S, Joel SP, Slevin ML, Balkwill FR 1992. *Measuring Cytokine Levels in Blood - Importance of Anticoagulants, Processing, and Storage-Conditions. Journal of Immunological Methods* 153 (1-2): 115-124.

65. Grunfeld C, Kotler DP, Shigenaga JK, Doerrler W, Tierney A, Wang J, Pierson RN, Feingold KR 1991. *Circulating Interferon-Alpha Levels and Hypertriglyceridemia in the Acquired-Immunodeficiency-Syndrome. American Journal of Medicine* 90 (2): 154-162.

66. Casanueva FF 1992. *Physiology of Growth-Hormone Secretion and Action. Endocrinology and Metabolism Clinics of North America* 21 (3): 483-517.

67. VanCauter E, Plat L 1996. *Physiology of growth hormone secretion during sleep. Journal of Pediatrics* 128 (5): S32S37.

Ejemplo 2: Los agregados de hormona de crecimiento murina recombinante rompen la tolerancia: un modelo para la inmunogenia adversa de proteínas terapéuticas

Las proteínas terapéuticas recombinantes ahora comprenden tratamientos clínicos de primera línea para muchas enfermedades y trastornos. Docenas de productos de proteínas terapéuticas están aprobados y comercializados y otros cientos están en ensayos clínicos (1). A pesar de la eficacia clínica de estos productos, para muchos de ellos un inconveniente es el riesgo de respuesta inmunitaria adversa (2). Los pacientes que producen anticuerpos neutralizantes como resultado de la respuesta inmunitaria pueden experimentar una eficacia reducida del tratamiento y correr el riesgo de complicaciones graves (3). Además, en algunos casos, la respuesta inmunitaria también puede neutralizar el homólogo endógeno de la proteína terapéutica, provocando daños permanentes o la muerte (4, 5). Además, los productos de gran beneficio potencial para los pacientes pueden no aprobarse debido a problemas de inmunogenia que surgen durante los ensayos clínicos.

Aunque los mecanismos mediante los cuales las proteínas terapéuticas pueden inducir respuestas inmunitarias adversas no se conocen bien, los agregados de proteínas pueden desempeñar una función (3). Desafortunadamente, las proteínas terapéuticas se agregan a lo largo de su ciclo de vida del producto y se cree que las proteínas son termodinámicamente inestables con respecto a la agregación (6). Además, la agregación puede acelerarse por agresiones tales como la congelación-descongelación o la exposición a las superficies de contacto aire-agua y otras superficies que se encuentran habitualmente durante la fabricación, envío, almacenamiento y entrega a los pacientes (7, 8). Las características de los agregados de proteínas pueden variar dependiendo de muchos factores, incluyendo la naturaleza de la agresión inicial, las condiciones de la solución, las propiedades fisicoquímicas de las proteínas, etc. (9). Por ejemplo, la exposición a superficies de contacto aire-agua a veces

puede provocar la formación de oligómeros solubles grandes, mientras que en otros casos se forman precipitados insolubles y/o partículas subvisibles. Además, la conformación de las moléculas de proteína dentro de los agregados puede variar de una estructura similar a la nativa a una muy alterada (10). La inmunogenia de los agregados de proteínas puede depender del tamaño de los agregados, la estructura de las moléculas de proteínas que constituyen los agregados y la vía de administración (11-13). Se ha planteado la hipótesis de que los agregados pueden tener un tamaño suficiente y también pueden presentar epítomos repetitivos necesarios para inducir la activación de las células B independientes de los linfocitos T, y la naturaleza repetitiva y altamente ordenada de algunos agregados de proteínas puede hacer que el sistema inmunitario responda a ellos como si fueran patrones moleculares asociados a patógenos (PMAP), induciendo de este modo respuestas inmunitarias innatas y adaptativas (3). Además, los agregados de proteínas particuladas y las moléculas de proteínas adsorbidas en la superficie de las micropartículas extrañas podrían comportarse como auto-adyuvantes (11) potenciando la captación por los macrófagos e induciendo citocinas coestimuladoras inflamatorias, conduciendo a fuertes respuestas inmunitarias dependientes de linfocitos T. Los inventores plantean la hipótesis de que los agregados formados como resultado de diferentes tipos de agresión pueden provocar diferentes niveles y tipos de respuestas inmunitarias.

Las proteínas también pueden formar agregados mediante adsorción a materiales extraños micro y nanoscópicos que se encuentran habitualmente en productos de proteínas terapéuticas (14). Los pacientes pueden exponerse a partículas extrañas que se introducen en productos terapéuticos durante el llenado de recipientes del producto, tal como viales o jeringuillas, y/o que arrojan los propios recipientes del producto (15). Por ejemplo, se erosionan partículas de acero inoxidable de algunos tipos de bombas de llenado de alta velocidad y el recipiente/cierres del producto pueden arrojar partículas de vidrio, aceite de silicona, caucho y/o partículas de wolframio en las formulaciones (16). En las formulaciones de vacunas, las moléculas de proteína normalmente se adsorben en micropartículas extrañas de materiales tales como adyuvantes de sal de aluminio con el fin de estimular respuestas inmunitarias deseables contra proteínas extrañas (17). La segunda hipótesis de los inventores es que la ruptura de la tolerancia inmunitaria puede ser el resultado de la administración de moléculas de proteínas terapéuticas adsorbidas en micropartículas extrañas encontradas habitualmente.

Estudios anteriores han utilizado modelos murinos para investigar la inmunogenia de los agregados de productos terapéuticos humanos recombinantes (11, 13, 18-20). En estos estudios, la administración parenteral de agregados con frecuencia se asoció a respuestas inmunitarias elevadas en comparación con las observada con la proteína monomérica. Debido a que las proteínas humanas no son propias para los ratones, algunos estudios han utilizado ratones transgénicos para examinar la ruptura de la tolerancia, mientras que otros han utilizado ratones no tratados anteriormente en los que hay respuestas inmunitarias innatas a proteínas extrañas y controlaron el nivel de la respuesta. En este estudio, los inventores usaron la hormona de crecimiento murina recombinante (21) (mGH) para evaluar la capacidad de los agregados de una proteína endógena para romper la tolerancia inmunitaria en ratones. Los inventores investigaron la inmunogenia de los agregados de proteínas que se formaron como resultado de dos agresiones farmacéuticamente pertinentes, la agitación y la congelación-descongelación, así como la respuesta inmunitaria a la mGH adsorbida en micropartículas de vidrio o alumbre. Para examinar los efectos del contenido reducido de agregados, los inventores aplicaron una presión hidrostática alta para desagregar los agregados (22) encontrados en muestras de control sin tratar de mGH ("de reserva"), agitadas y congeladas-descongeladas. Los agregados se cuantificaron y se caracterizaron mediante cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (HPLC-ET), recuento de partículas de formación de imágenes de micro-flujo y métodos de espectroscopía óptica.

Para obtener información sobre el mecanismo o mecanismos a través de los cuales los agregados provocan respuestas inmunitarias (por ejemplo, vías dependientes de linfocitos T o independientes de linfocitos T), los inventores midieron los niveles de isotipos de IgG producidos en los ratones.

Materiales y métodos

Materiales

La mGH se produjo y purificó como se ha descrito anteriormente (21). El alumbre (hidróxido de aluminio Alhydrogel™ fabricado por Brenntag Biosector) se adquirió de E.M. Sergeant Pulp & Chemical Co., Inc. (Clifton, NJ). Las micropartículas de vidrio se produjeron a partir de molienda de bolas de barriles de jeringuillas (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ) como se ha descrito anteriormente (14). La solución salina para inyección (Hospira, Inc., Lake Forest, IL) se adquirió en la farmacia de la Universidad de Colorado. Se adquirieron anticuerpo de cabra anti-IgG1 de ratón, anticuerpo de cabra anti-IgG2a de ratón, anticuerpo de cabra anti-IgG2b de ratón, anticuerpo de cabra anti-IgG2c de ratón, anticuerpo de cabra anti-IgG3 de ratón, anticuerpo de cabra anti-IgG de ratón conjugado con HRP y anti-ovoalbúmina de ratón en Abcam (Cambridge, MA). Se adquirió 3,3',5,5' tetrametilbencidina en KPL (Gaithersburg, MD). Todos los demás reactivos fueron de Fisher Scientific (Pittsburgh, PA).

Preparación de la muestra

La muestra de reserva se almacenó a 4 °C y se usó para preparar todas las muestras de mGH. Se formaron agregados de mGH mediante agresiones de congelación-descongelación y agitación. La muestra de congelación-

descongelación se sometió a 20 ciclos de congelación-descongelación en nitrógeno líquido durante 1 minuto seguido de 10 minutos de descongelación en un baño de agua a 25 °C. La muestra agitada se preparó asegurando la muestra horizontalmente a un agitador de placa de titulación Lab-line y agitando a aproximadamente 1000 rpm durante 4 horas a temperatura ambiente. La mGH se adsorbió en las partículas de alumbre y vidrio añadiendo masas adecuadas de partículas a la solución de proteína y someténdolas a rotación de extremo a extremo a 8 rpm durante 30 minutos. La mGH se adsorbió en alumbre a una relación de masa 1:1. Se adsorbió mGH al vidrio a una relación de masa de 1:76. Todas las muestras se mantuvieron a 4 °C.

Tratamiento de muestras a presión alta

Las muestras de reserva, agitadas y congeladas-descongeladas se sometieron cada una a presión hidrostática alta para disociar los agregados no covalentes y replegar la proteína al estado monomérico nativo. Las muestras se colocaron en jeringuillas BD termoselladas y se presurizaron a 200 MPa durante 20 minutos en un recipiente a presión Pre-EMT150™ (BaroFold Inc., Boulder, CO, EE.UU.) y se mantuvieron a esta presión durante 4 horas a temperatura ambiente. Las muestras se despresurizaron después durante 20 minutos a presión atmosférica. Las muestras se almacenaron a 4 °C. Las muestras tratadas a presión alta se denominan "reserva PA", "agitada PA" y "congelación-descongelación PA".

HPLC-ET

Se realizaron experimentos usando una columna Superdex™ 75 10/300 GL en un sistema HPLC Agilent serie 1100 (Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, EE.UU.). Se realizó una cromatografía isocrática a temperatura ambiente con un caudal de 0,8 ml/min con acetato 100 mM, NaCl 100 mM, pH 4,75 como fase móvil. La señal UV a 280 nm se controló usando el detector de matriz de diodos UV Agilent durante 50 minutos. Las muestras se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 minutos antes de la inyección. Las inyecciones de 100 µl de cada muestra se analizaron por triplicado. Los cromatogramas se analizaron en el software GRAMS (Thermo Electron Corp., Waltham, MA) por integración para determinar las áreas para los picos respectivos. Los porcentajes de áreas de pico se calculan en función de las áreas obtenidas a través de integraciones de cromatogramas de HPLC-ET. Los porcentajes de áreas de pico fueron con respecto a las áreas de pico de control de monómero mediante la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{Área}_{\text{pico}}}{\text{Área}_{\text{control de monómero, total}}} \times 100 \quad (1)$$

Los porcentajes de áreas de pico de agregados insolubles se determinaron mediante el siguiente equilibrio de masas:

$$\frac{\text{Área}_{\text{control de monómero, total}} - \text{Área}_{\text{preparación, total}}}{\text{Área}_{\text{control de monómero, total}}} \times 100 \quad (2)$$

se calcularon intervalos de confianza del 95 % a partir de inyecciones por triplicado de cada muestra en la HPLC-ET. El análisis por HPLC-ET se realizó a lo largo del curso del estudio para garantizar que no hubiera cambios en el contenido de agregados.

Análisis de partículas

El análisis de partículas se realizó usando Micro-Flow Imaging™ en un DPA 4100 (Brightwell Technologies, Inc., Ottawa, Ontario, Canadá). Antes de realizar el análisis de la muestra, se lavó abundantemente con agua filtrada a 0,2 micrómetros libre de partículas el sistema para obtener un valor basal limpio y optimizar la iluminación. Se analizaron tres muestras de 0,5 ml de cada preparación a una caudal de 0,1 ml/min a través de una célula de flujo de gran aumento usando la configuración de "punto de ajuste 3", que permite la detección de partículas de 1-50 µm. Antes del análisis, las muestras se invirtieron lentamente 10 veces para garantizar la suspensión de partículas. También se analizaron controles negativos del tampón para eliminar cualquier influencia del tampón sobre la detección de partículas. Los datos obtenidos fueron recuentos numéricos por volumen por recipientes de 0,25 micrómetros de diámetro. La masa aproximada de proteína en partículas se calculó suponiendo partículas esféricas con una densidad de 1,2 g/ml, entre la de la proteína y el agua. Para facilitar la representación de los datos, los recuentos en número se sumaron para tamaños de intervalos de 1-5 micrómetros, 5-10 micrómetros, 10-15 micrómetros, 15-20 micrómetros, 20-25 micrómetros, 25-30 micrómetros y 30-50 micrómetros.

Espectroscopía de infrarrojos

Se obtuvieron espectros de infrarrojos para agregados insolubles de mGH se adquirieron usando un espectrómetro IR Bomem™ (Quebec, Canadá) y un detector de KBr de sulfato de triglicina deuterado. Se usó una célula de CaF2

de longitud de trayectoria variable para todas las mediciones. Las soluciones se centrifugaron a 1.700 g durante 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Los agregados se resuspendieron en tampón para garantizar el análisis de los agregados únicamente. Las correcciones de tampón se realizaron restando los espectros de tampón o tampón con partículas libres de proteínas. El método utilizado para obtener y analizar espectros se ha descrito anteriormente (23). Todas las manipulaciones matemáticas de espectros se realizaron en el software GRAMS (Thermo Electron Corp., Waltham, MA).

Fluorescencia de cara frontal

Se usaron fluorescencia de cara frontal y espectroscopía de inactivación de fluorescencia conjuntamente para analizar las estructuras terciarias de mGH nativa, desplegada y adsorbida. Se analizaron muestras triplicadas de 3 ml de cada preparación en una cubeta de 3 mm a un ángulo de 53 ° con respecto al haz de excitación. Se usó una longitud de onda de excitación de 295 nm en un espectrofluorómetro SLM-Aminico (SLMAminico, Urbana, IL). Se añadieron doce partes alícuotas de una solución de acrilamida 7,6 M hasta que se obtuvo una concentración final de acrilamida de 0,4 M. Se usó un agitador para evitar la sedimentación de partículas durante el análisis. Se registraron intensidades de fluorescencia de 300-380 nm a una velocidad de barrido de 0,95 nm/s. Todas las muestras se controlaron en cuanto a la temperatura a 25 °C durante el análisis. Las emisiones de fluorescencia medidas se corrigieron para determinar la dilución y los efectos del filtro interno cuando fue adecuado. Se hicieron correcciones de tampón restando los espectros de tampón o suspensión de partículas libre de proteínas. Se usaron representaciones de Stern-Volmer para analizar los datos usando la relación:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV}[Q] \quad (3)$$

En la ecuación (3), K_{sv} es la constante de Stern-Volmer (M⁻¹). F_0 y F son intensidades de fluorescencia en ausencia y presencia de diferentes concentraciones de inactivador Q , respectivamente. $[Q]$ es la concentración de acrilamida (M).

Ensayo de inmunogenia en animales

Todas las muestras se analizaron en ratones adultos CB6F1 (≥ 6 semanas de edad) para determinar su inmunogenia. Al comienzo del estudio, Día 0, se obtuvo sangre orbital retrovenosa de los ratones para que cada ratón sirviera como su propio valor basal. A los grupos de 8 ratones se les administraron inyecciones subcutáneas de 2 µg de mGH diluida en solución salina para inyección cinco días a la semana durante tres semanas (días 0-4, días 7-11, días 14-18). Además de las muestras de mGH, se inyectó un control negativo de tampón solo y un control positivo de ovoalbúmina en grupos de ratones. Los ratones se desangraron nuevamente por vía retrovenosa los días 7, 21 y 35 y recibieron 5 inyecciones subcutáneas adicionales de 2 µg de mGH como refuerzo los días 35-39. Los ratones se desangraron los días 42 y 49 para controlar cualquier respuesta secundaria.

Los sueros recogidos se sometieron a ensayo para determinar la respuesta de anticuerpos específicos IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3 usando un inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA). Los pocillos de las placas de afinidad de unión alta Immulon 4 (ISC Bioexpress, Kaysville, UT) se incubaron con 100 µl de reserva diluida (10 µg/ml) 100 µl de patrón de ovoalbúmina (10 µg/ml) a temperatura de laboratorio durante la noche con agitación suave. Después, los pocillos se drenaron y se lavaron tres veces con PBS que contenía tween 20 al 0,05 %. Después del lavado final, los pocillos se secaron con golpecitos sobre una toalla de papel. Después se bloquearon los pocillos con 300 µl de albúmina de suero bovino al 2 % (BSA) en PBS durante 1 hora. Después de la aplicación de bloqueo, los pocillos se lavaron tres veces con una solución de PBS que contenía tween 20 al 0,05 %. Los pocillos en las filas B-H se cargaron con 50 µl de tampón de dilución (BSA al 1 % en PBS). Los sueros se diluyeron 1:20 en el tampón de dilución y se añadieron a los pocillos en la fila A. Cada placa tenía dos curvas patrón de concentración conocida de anticuerpo monoclonal de ratón para ovoalbúmina (Abcam ab17291, Cambridge, MA). Usando una pipeta multicanal, se transfirieron 50 µl de los sueros diluidos de la fila A a los pocillos en la fila B. La solución en la fila B se mezcló después extrayendo y expulsando 50 µl (5 veces) en los pocillos antes de transferir 50 µl a pocillos en la fila C. Las diluciones 2X se continuaron a través de la fila G. Las placas se sellaron y se dejaron incubar a temperatura de laboratorio durante 60 minutos. Después, los pocillos se lavaron cinco veces con una solución de Tween 20 al 0,05 % en PBS y se secaron sobre una dando golpecitos sobre una toalla de papel. Los pocillos se incubaron con 50 µl de un anticuerpo policlonal de cabra específico para IgG1 de ratón (Abcam, ab9165) IgG2a de ratón (Abcam ab9163), IgG2b de ratón (Abcam, ab9164), IgG2c de ratón (Abcam, ab9168) o IgG3 de ratón (Abcam, ab9166) diluido 1:8000 en tampón de dilución. Después de 1 hora, los pocillos se lavaron cinco veces con Tween 20 al 0,05 % en PBS y se secaron dando golpecitos sobre una toalla de papel. Los pocillos se incubaron posteriormente con 50 µl de anticuerpo policlonal de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante contra IgG de cabra (Abcam, ab6741) diluido 1:5000 en tampón de dilución durante 60 minutos. Después, las placas se lavaron cinco veces con Tween 20 al 0,05 % en PBS y se secaron, seguido de la adición de 50 µl de 3,3',5,5' tetrametilbencidina a cada pocillo. Después de 20 minutos, se añadieron 50 µl de ácido sulfúrico 0,5 M a los pocillos para detener la reacción. La absorbancia se registró con un lector de placa cinética "Vmáx" de Molecular Devices (Sunnyvale, CA) a una longitud de onda de 450 nm y una longitud de onda de referencia de 595 nm. La respuesta a ELISA se publicó

en unidades de ng/ml y se calculó a partir de la respuesta de absorbancia promedio en una curva patrón multiplicada por su factor de dilución. La curva patrón (valor de r^2 de 0,99) se generó a partir de los patrones en cada placa usando un ajuste de cuatro parámetros en Softmax (Sunnyvale, CA) con un intervalo de concentración de anticuerpos de 1250 ng/ml a 10 ng/ml.

5

Análisis estadístico de las respuestas de anticuerpos

Los datos se analizaron para detectar diferencias estadísticas usando un ensayo de t de una cola con varianzas desconocidas y no necesariamente iguales. Se realizó un ensayo de F para determinar que las varianzas eran diferentes entre los grupos de muestras. Cada grupo tenía un tamaño de muestra de ocho. Se usó Microsoft Excel para calcular los valores de p. La probabilidad de una [p] entre medias de grupos se comparó con un intervalo de confianza del 90 %. Cuando se compararon las medias, las probabilidades de [p] < 0,1 fueron significativas en función del intervalo de confianza del 90 % elegido.

10

15 Resultados

Respuestas de isotipos a agregados de mGH. Se sometieron a ensayo isotipos de IgG (IgG 1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3) mediante ELISA. No se detectaron anticuerpos contra la mGH de control (de reserva) sin tratar hasta el día 21. Los agregados de mGH provocaron con más frecuencia las respuestas del isotipo IgG1. Las muestras que contenía- mGH adsorbida en vidrio o alumbre fueron las únicas muestras que rompieron la tolerancia en los 8 ratones en sus respectivos grupos. Las inyecciones de muestras adsorbidas en vidrio y alumbre provocaron respuestas de IgG1 más altas que todas las demás muestras. Las respuestas de IgG1 inducidas por las preparaciones de vidrio y alumbre no fueron diferentes entre sí ($p = 0,441$). Las otras muestras de mGH no pudieron romper la tolerancia en todos los animales de su grupo. Las respuestas de anticuerpos IgG1 provocadas por las muestras de reserva, agitadas, agitadas PA, congeladas-descongeladas y congeladas-descongeladas PA no son significativamente diferentes entre sí. Véase **Figura 14**.

20

25

La muestra de mGH agitada provocó una mayor respuesta de IgG2a en comparación con todas las otras muestras de mGH, excepto por su homólogo tratado a presión alta. **Figura 15**. Para todos los tratamientos de mGH, se observaron respuestas de isotipo IgG2b en más ratones que para las respuestas de IgG2a o IgG2c. Sin embargo, la mGH adsorbida en vidrio fue la única muestra que produjo respuestas de IgG2b estadísticamente más altas y solo en comparación con las muestras de reserva, reserva PA, congeladas-descongeladas y congeladas-descongeladas PA. La respuesta de IgG2c provocada por la preparación de reserva fue superior a la resultante de muestras de reserva, congelación-descongelación y congelación-descongelación PA; sin embargo, esta diferencia estadística desapareció en la 6ª hemorragia. La respuesta de IgG2c producida por mGH adsorbida en alumbre fue superior a las respuestas de muestras de reserva PA, agitada, congelada-descongelada y congelada-descongelada PA y esta diferencia aumentó en las respuestas medidas en el suero de la 6ª hemorragia ($p = 0,085$). No hubo diferencias estadísticas en las respuestas de IgG3 entre ninguna de las preparaciones de mGH para las muestras de suero de la hemorragia 5. **Figura 16**.

30

35

40

Respuesta inmunitaria a muestras tratadas a presión alta. Aunque la mGH de reserva era inmunógena con 4 de los 8 ratones que desarrollaron anticuerpos IgG1 contra mGH, la muestra de reserva tratada a presión alta no rompió la tolerancia en ninguno de los 8 ratones inyectados. Por el contrario, el tratamiento a presión alta de las muestras congeladas-descongeladas y agitadas no redujo las respuestas inmunitarias inducidas contra estas muestras ($p = 0,133$, $p = 0,378$).

45

Respuestas secundarias a los agregados de mGH. La administración de mGH adsorbida a alumbre o micropartículas de vidrio indujo los niveles más altos de IgG1 y también provocó respuestas inmunitarias secundarias típicas como demuestran los niveles más altos de orden de magnitud de IgG1 en la 6ª hemorragia en comparación con los puntos temporales más tempranos. Las respuestas a mGH adsorbida en alumbre medidas en la 6ª hemorragia fueron significativamente más altas que las respuestas en la 5ª hemorragia y la 4ª hemorragia ($p = 0,042$, $p = 0,055$). De manera similar, las respuestas de anticuerpos de la 6ª hemorragia de ratones inyectados con mGH adsorbida en micropartículas de vidrio fueron superiores a las respuestas en la 5ª hemorragia y la 4ª hemorragia ($p = 0,011$ y $0,009$, respectivamente). Por el contrario, aunque las respuestas de anticuerpos en los ratones inyectados con mGH congelada-descongelada tratada a presión alta tienen una tendencia cualitativamente similar a las respuestas de anticuerpos de alumbre y vidrio, la respuesta detectada en la 6ª hemorragia no fue significativamente superior a las respuestas en la 5ª hemorragia y la 4ª hemorragia ($p = 0,190$, $p = 0,139$). Por tanto, solo las muestras adsorbidas en vidrio o alumbre provocaron respuestas inmunitarias secundarias detectables.

50

55

Aumento de peso del ratón. El aumento de peso promedio de toda la población de ratones durante las 7 semanas del estudio fue de $4,5 \pm 0,5$ gramos. No se observaron diferencias en el aumento de peso promedio para los diferentes grupos de tratamiento, incluyendo los ratones que se inyectaron con tampón solo (control negativo). Estudios anteriores publicaron que el aumento de peso promedio de 6 semanas a 13 semanas para ratones hembra CB6F1 es de 3 ± 2 gramos (24). Por tanto, en este estudio ninguna preparación de mGH promovió un aumento o pérdida de peso excesivo.

60

65

Análisis cromatográfico de exclusión por tamaño. No se detectaron agregados solubles mediante HPLC-ET en ninguna de las preparaciones de mGH. La pérdida de masa en el pico monomérico en el cromatograma se usó para determinar el porcentaje de proteína en agregados insolubles (Tablas 1 y 2). Los niveles más altos de agregados insolubles fueron en las muestras congeladas-descongeladas y agitadas. Después de la presurización, se midió el 100 % del área del pico de monómero mediante HPLC-ET. En muestras que contenían micropartículas de vidrio o alumbre, el 100 % de la mGH se adsorbió en las micropartículas. Las muestras con mGH adsorbida en vidrio o alumbre no se trataron con presión alta.

Análisis de imágenes de micro-flujo. Las muestras se analizaron para partículas subvisibles usando un instrumento de Micro-Flow Imaging™ (imágenes de micro-flujo, IMF). Se detectaron grandes cantidades de partículas en todas las muestras, incluyendo aquellas en las que los agregados eran indetectables mediante análisis por HPLC-ET (Figura 10). El tratamiento a presión alta de las muestras de reserva, agitadas y congeladas-descongeladas disminuyeron tanto el número de partículas como la masa de proteína estimada en las partículas en aproximadamente dos órdenes de magnitud (Tabla 2). Las micropartículas de alumbre y vidrio tenían predominantemente de 1-1,25 micrómetros de diámetro (Figura 11).

Análisis de la estructura secundaria de mGH en agregados y adsorbida en vidrio o alumbre. Se obtuvieron espectros de infrarrojos para mGH en agregados insolubles formados durante la congelación-descongelación o agitación y para la proteína adsorbida en micropartículas de vidrio o alumbre. Debido a la solubilidad relativamente baja (aprox. 1 mg/ml) de mGH, las muestras de reserva y tratadas a presión alta no pudieron concentrarse lo suficiente como para obtener un espectro de alta calidad para la proteína monomérica soluble. Estudios previos publicaron que los espectros de infrarrojos de proteína adsorbida en alumbre muestran una estructura nativa (25). Por tanto, los inventores asumieron que la mGH adsorbida en alumbre tiene una estructura secundaria nativa. En un análisis anterior de dicroísmo circular de la mGH monomérica, los inventores publicaron que la proteína contenía un 60 % de α -hélice (21). En el segundo espectro de infrarrojos derivado, el α -hélice está representada por una banda negativa fuerte a 1654 cm^{-1} , que es coherente con el espectro de la proteína adsorbida en alumbre (**Figura 12**). Además, este espectro es prácticamente idéntico al de la hormona de crecimiento humana nativa (11, 26). La mGH adsorbida en micropartículas de vidrio tenía solo una ligera reducción del α -hélice, mientras que la proteína en los agregados insolubles inducidos por congelación-descongelación o agitación tenía un contenido de α -hélice reducido (aproximadamente un 10 %).

Análisis espectroscópico de fluorescencia de inactivación de acrilamida de la estructura terciaria en mGH adsorbida. Los inventores compararon la constante de Stern-Volmer para la proteína adsorbida con la de la mGH nativa y desplegada. **Figura 13.** La constante de Stern-Volmer de mGH nativa en solución fue de $0,31 \pm 0,17\text{ M}^{-1}$. La acrilamida tiene acceso fácil al triptófano en la mGH desplegada, como se demuestra mediante una constante de Stern-Volmer de $9,4 \pm 1,2\text{ M}^{-1}$. mGH tiene un triptófano (27). Aunque no se conoce la estructura de alta resolución de la mGH, el único resto de triptófano en la GH humana (hGH) está enterrado en un haz de α -hélices (28). Debido a las similitudes de secuencia entre mGH y hGH y los resultados de enfriamiento de los inventores, queda claro que el resto de triptófano en la mGH nativa también tiene una exposición mínima al disolvente. Para la mGH adsorbida en alumbre o micropartículas de vidrio, las constantes de Stern-Volmer fueron de $0,84 \pm 0,08$ y $1,1 \pm 0,2\text{ M}^{-1}$ respectivamente, lo que sugiere que la estructura terciaria de mGH adsorbida en micropartículas de vidrio y alumbre está mínimamente alterada con respecto a la de la mGH nativa.

Análisis

La administración subcutánea de agregados de mGH rompió la tolerancia inmunitaria a mGH en ratones. Los inventores caracterizaron los agregados mediante HPLC-ET, análisis espectroscópico e IMF. El análisis por IMF detectó agregados de proteínas subvisibles (de 1 a 50 micrómetros) en muestras que no fueron detectables mediante HPLC-ET. Además de los recuentos de partículas, los inventores estimaron la masa de proteína contenida en partículas de muestras de reserva, de reserva PA, agitadas, agitadas PA, congeladas-descongeladas y congeladas-descongeladas PA. Las concentraciones de agregados inferiores al 2 % pueden ser difíciles de detectar y cuantificar mediante análisis cromatográfico (29). Sin embargo, el análisis por IMF pudo detectar agregados a concentraciones tan bajas como del 0,001 %. Para preparaciones agitadas y congeladas-descongeladas de mGH, los análisis por IMF y HPLC-ET indicaron porcentajes similares de agregados de proteínas insolubles.

Aunque la solución de reserva contenía niveles de agregados de partículas inferiores a los límites de detección por HPLC-ET, basándose en los resultados de IMF, se estima que la masa de proteínas en partículas subvisibles era equivalente a 1,6 ng de agregado/inyección. Este nivel de agregado de partículas fue capaz de inducir respuestas inmunitarias en una fracción de los ratones. El tratamiento a presión alta redujo los recuentos de partículas en dos órdenes de magnitud a dosis equivalentes de 0,02 ng de agregado/inyección, lo que no rompió la tolerancia en ningún ratón. Estos resultados sugieren que puede haber un nivel umbral de contenido de agregado dentro de una formulación terapéutica por encima del cual pueden generarse respuestas inmunitarias. Además, sugieren que las partículas subvisibles de proteína pueden ser más potentes induciendo una respuesta inmunitaria.

En el estudio de los presentes inventores, la adsorción de mGH al vidrio o alumbre produjo una fuerte respuesta adyuvante. Las muestras de vidrio y alumbre no solo indujeron la mayor producción de anticuerpos y respuestas

inmunitarias en la mayor parte de los ratones, sino que provocaron respuestas inmunitarias secundarias. Las formulaciones de vacunas emplean habitualmente adyuvantes para sensibilizar las respuestas inmunitarias al antígeno. Aunque existe un debate acerca del mecanismo o mecanismos mediante los cuales las sales de aluminio aumentan las respuestas inmunitarias a los antígenos adsorbidos, se ha sugerido que las sales de aluminio y otros adyuvantes de partículas pueden aumentar la absorción por los macrófagos, así como inducir citocinas inmunoestimuladoras que pueden conducir a una maduración más rápida de células dendríticas (31). El hidróxido de aluminio potencia respuestas inmunitarias de manera sesgada por Th2 dependiente de linfocitos T, dando como resultado títulos de isotipo IgG1 más altos que los de IgG2a (32). Esto es coherente con los resultados de los presentes inventores en los que se produjeron concentraciones en $\mu\text{g/ml}$ de IgG1, pero niveles indetectables de IgG2a, en ratones inmunizados con mGH adsorbida en alumbre. Curiosamente, la administración de mGH adsorbida en micropartículas de vidrio produjo el mismo resultado. Esto sugiere que las partículas de vidrio microscópicas también pueden inducir respuestas inmunitarias dependientes de linfocitos T potenciando la captación de proteínas mediante macrófagos. Debido a que los contaminantes de vidrio microscópicos son ubicuos en las soluciones de proteínas almacenadas en recipientes de vidrio (33), este resultado eleva la posibilidad de que los recipientes primarios puedan contribuir a la inmunogenia de las proteínas terapéuticas.

Además, la generación de IgG1 fue la respuesta encontrada más frecuente a todas las muestras de mGH sometidas a ensayo. Las respuestas de IgG1 son características de respuestas inmunitarias dependientes de linfocitos T (34). Por tanto, parece que la inyección subcutánea de todos los tipos de agregados de mGH sometidos a ensayo en este estudio induce la activación dependiente de los linfocitos T de las células B que conduce a la producción de anticuerpos.

Las únicas muestras de mGH que produjeron isotipos tanto IgG2a como IgG2b fueron aquellas que contenían agregados inducidos por agitación. Los anticuerpos IgG2 con frecuencia se generan en respuesta a infecciones víricas y conducen a respuestas Th1 inducidas por citocinas (35-37). Las respuestas Th1 estimulan los macrófagos en lugar de la activación de las células B (38), lo que podría explicar por qué los agregados inducidos por agitación también provocaron las concentraciones más bajas de IgG1. Los inventores especulan que los agregados producidos mediante la agitación pueden presentar una estructura superficial relativamente ordenada y repetitiva, conduciendo al sistema inmunitario a reconocerla como un virus.

También es importante indicar que la cepa de ratones utilizada en este estudio fue CB6F1, que es la primera generación de un cruce entre las cepas C57BL/6 y BALB/c. La cepa C57BL/6 tiene el alelo Igh1-b que conduce a la supresión del isotipo IgG2a (39). Se sabe que los ratones BALB/c no producen el isotipo IgG2c debido al alelo Igh1-a (39). Cruzando las dos cepas, los inventores consiguen la producción de los tres isotipos de IgG2. Aunque se detectaron los tres isotipos de IgG2, las respuestas del isotipo IgG2b fueron más prevalentes que las respuestas de los isotipos IgG2a e IgG2c.

El isotipo IgG3 es un indicador de activación de células B independiente de linfocitos T (40-42). Aunque hubo respondedores de isotipo IgG1 e IgG2 en cada grupo, el isotipo IgG3 no se produjo significativamente en ninguno de los grupos de ratones, lo que es coherente con un mecanismo dependiente de linfocitos T para romper la tolerancia.

Los resultados de los presentes inventores muestran que incluso a niveles que están por debajo del límite de detección de HPLC-ET, los agregados de mGH son capaces de inducir respuestas potentes dependientes de linfocitos T. Estos datos sugieren que incluso pequeñas fracciones de agregados de proteínas que contaminan productos terapéuticos pueden tener implicaciones graves. Las partículas que los presentes inventores inyectaron en ratones tenían predominantemente intervalos de tamaño de 1-10 micrómetros de diámetro. Este intervalo de tamaño es notablemente difícil de detectar y actualmente no está regulado en los ensayos requeridos por la USP. Los fagocitos captan agregados de partículas subvisibles de este intervalo de tamaño cuando se inyectan por vía subcutánea, lo que puede conducir a una fuerte respuesta inmunitaria dependiente de linfocitos T que tiene lugar en los ganglios linfáticos. Los conductos linfáticos drenan los antígenos y las células presentadoras de antígeno a los ganglios linfáticos y los folículos B. Estas "autopistas de células B" son una vía por la que los linfocitos T y las células B en los ganglios linfáticos pueden encontrar antígenos (43). Los antígenos deben tener menos de 70 kDa de tamaño para entrar satisfactoriamente en estos conductos (43). Los antígenos de partículas más grandes, tales como los que los inventores inyectaron en ratones, son fagocitados por macrófagos o células dendríticas y no entran independientemente a los conductos linfáticos. Por tanto, la mayoría de los agregados de proteínas insolubles son demasiado grandes para migrar al ganglio linfático y activar las células B independientes de los linfocitos T.

Además del tamaño del antígeno, la vía de administración también puede influir en la inmunogenia de una proteína terapéutica (44, 45). Los antígenos entregados por diferentes vías de administración pueden migrar a diferentes órganos, tales como los ganglios linfáticos y el bazo, donde pueden provocar diferentes respuestas inmunitarias. Los estudios de Dintzis et al. (46), indican que los antígenos capaces de activar células B independientes de linfocitos T tenían que tener un tamaño de al menos 100 kDa cuando se inyectaban por vía intraperitoneal. Los agregados de mGH producidos en el estudio de los presentes inventores tenían pesos moleculares superiores a 100 kDa, pero se inyectaron por vía subcutánea. Las inyecciones subcutáneas estimulan la actividad en los ganglios linfáticos (47). Por el contrario, el principal órgano linfoide responsable de la producción de anticuerpos para las inyecciones intraperitoneales es el bazo (47). El peritoneo tiene una población baja de células dendríticas en comparación con

los macrófagos y los macrófagos peritoneales tienen una menor capacidad de presentación de antígenos (48, 49). Por tanto, las inyecciones intraperitoneales pueden exponer las células B a grandes agregados independientes de células presentadoras de antígeno. La capacidad del antígeno para activar células B independientes de linfocitos T también puede depender de la población de células B en el tejido linfático en el que tiene lugar la respuesta inmunitaria. Los ganglios linfáticos tienen poblaciones altas de linfocitos T y poblaciones bajas de células B (50, 51). Por el contrario, el bazo tiene poblaciones altas de células B y concentraciones más bajas de linfocitos T (50, 51). Debido a la mayor población de células B en el bazo, es más probable que el antígeno encuentre células B y, por tanto, las active sin la ayuda de linfocitos T.

En conclusión, las administraciones subcutáneas frecuentes de niveles incluso muy bajos de agregados de proteínas subvisibles tienen la capacidad de romper la tolerancia en ratones. Además, la administración de proteína adsorbida a micropartículas puede inducir respuestas inmunitarias potentes dependientes de linfocitos T, de forma muy similar a una vacuna adyuvante. Claramente, existe la necesidad de una nueva detección analítica y regulación de partículas subvisibles en la formulación de producto final para minimizar cualquier posible efecto adverso.

Referencias

Las siguientes referencias se incorporan en el presente documento como referencia.

1. Waites, M. J., Morgan, N.L. 2001. *Industrial Microbiology: An Introduction*. Blackwell Science, Inc., Malden.
2. Rosenberg, A. S. y A. Worobec. 2004. *A risk-based approach to immunogenicity concerns of therapeutic protein products Part 1 Considering consequences of the immune response to a protein*. *Biopharm International* 17: 22.
3. Rosenberg, A. S. 2006. *Effects of protein aggregates: An immunologic perspective*. *Aaps Journal* 8: E501.
4. Hermeling, S., D. J. A. Crommelin, H. Schellekens y W. Jiskoot. 2004. *Structure-immunogenicity relationships of therapeutic proteins*. *Pharmaceutical Research* 21: 897.
5. Sauerborn, M., V. Brinks, W. Jiskoot y H. Schellekens. *Immunological mechanism underlying the immune response to recombinant human protein therapeutics*. *Trends in Pharmacological Sciences* 31: 53.
6. Uversky, V. N. 2009. *Intrinsically Disordered Proteins and Their Environment: Effects of Strong Denaturants, Temperature, pH, Counter Ions, Membranes, Binding Partners, Osmolytes, and Macromolecular Crowding*. *Protein Journal* 28: 305.
7. Hawe, A., J. C. Kasper, W. Friess y W. Jiskoot. 2009. *Structural properties of monoclonal antibody aggregates induced by freeze-thawing and thermal stress*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 38: 79.
8. Rathore, N. y R. S. Rajan. 2008. *Current perspectives on stability of protein drug products during formulation, fill and finish operations*. *Biotechnology Progress* 24: 504.
9. Manning, M. C., D. K. Chou, B. M. Murphy, R. W. Payne y D. S. Katayama. *Stability of Protein Pharmaceuticals: An Update*. *Pharmaceutical Research* 27: 544.
10. Wang, W., S. Nema y D. Teagarden. *Protein aggregation-Pathways and influencing factors*. *International Journal of Pharmaceutics* 390: 89.
11. Fradkin, A. H., J. F. Carpenter y T. W. Randolph. 2009. *Immunogenicity of Aggregates of Recombinant Human Growth Hormone in Mouse Models*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98: 3247.
12. Koch, C., S. S. Jensen, A. Oster y G. Houen. 1996. *A comparison of the immunogenicity of the native and denatured forms of a protein*. *Apmis* 104: 115.
13. Braun, A., L. Kwee, M. A. Labow y J. Alsenz. 1997. *Protein aggregates seem to play a key role among the parameters influencing the antigenicity of interferon alpha (IFN-alpha) in normal and transgenic mice*. *Pharmaceutical Research* 14: 1472.
14. Bee, J. S., D. Chiu, S. Sawicki, J. L. Stevenson, K. Chatterjee, E. Freund, J. F. Carpenter y T. W. Randolph. 2009. *Monoclonal Antibody Interactions With Micro- and Nanoparticles: Adsorption, Aggregation, and Accelerated Stress Studies*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98: 3218.
15. Tyagi, A. K., T. W. Randolph, A. Dong, K. M. Maloney, C. Hitscherich y J. F. Carpenter. 2009. *IgG Particle Formation during Filling Pump Operation: A Case Study of Heterogeneous Nucleation on Stainless Steel Nanoparticles*. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 98: 94.

16. Chi, E. Y., J. Weickmann, J. F. Carpenter, M. C. Manning y T. W. Randolph. 2005. *Heterogeneous nucleationcontrolled particulate formation of recombinant human platelet-activating factor acetylhydrolase in pharmaceutical formulation. Journal of Pharmaceutical Sciences* 94: 256.
- 5 17. Lindblad, E. B. 2004. *Aluminium adjuvants - in retrospect and prospect. Vaccine* 22: 3658.
18. Fradkin, A. H., Carpenter, J. F., Randolph, T. W. En *Press. Immunogenicity of aggregates of recombinant human growth hormone in mouse models. Journal of Pharmaceutical Sciences.*
- 10 19. Hermeling, S., H. Schellekens, C. Maas, M. Gebbink, D. I. A. Crommelin y W. Jiskoot. 2006. *Antibody response to aggregated human interferon alpha2b in wild-type and transgenic immune tolerant mice depends on type and level of aggregation. Journal of Pharmaceutical Sciences* 95: 1084.
- 15 20. Hermeling, S., L. Aranha, J. M. A. Damen, M. Slijper, H. Schellekens, D. J. A. Crommelin y W. Jiskoot. 2005. *Structural characterization and immunogenicity in wild-type and immune tolerant mice of degraded recombinant human interferon alpha2b. Pharmaceutical Research* 22: 1997.
- 20 21. Fradkin, A. H., C. S. Boand, S. P. Eisenberg, M. S. Rosendahl y T. W. Randolph. 2010. *Recombinant murine growth hormone from E. coli inclusion bodies: Expression, high-pressure solubilization and refolding, and characterization of activity and structure. Biotechnology Progress* 26: 743.
- 25 22. St John, R. J., J. F. Carpenter y T. W. Randolph. 1999. *High pressure fosters protein refolding from aggregates at high concentrations. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13029.
23. Dong, A., P. Huang y W. S. Caughey. 1990. *Protein Secondary Structures in Water from 2nd-Derivative Amide-I Infrared-Spectra. Biochemistry* 29: 3303.
- 30 24. Laboratories, C. R. 2009. *CB6F1 Pricing and Literature, Vol. 2009.*
25. Dong, A. C., L. S. Jones, B. A. Kerwin, S. Krishnan y J. F. Carpenter. 2006. *Secondary structures of proteins adsorbed onto aluminum hydroxide: Infrared spectroscopic analysis of proteins from low solution concentrations. Analytical Biochemistry* 351: 282.
- 35 26. Yang, T. H., A. C. Dong, J. Meyer, O. L. Johnson, J. L. Cleland y J. F. Carpenter. 1999. *Use of infrared spectroscopy to assess secondary structure of human growth hormone within biodegradable microspheres. Journal of Pharmaceutical Sciences* 88: 161.
- 40 27. Fradkin, A. H., Boand, C.S., Eisenberg, S.P., Rosendahl, M.S., Randolph, T.W. 2010. *Recombinant murine growth hormone from E.coli inclusion bodies: Expression, high-pressure solubilization and refolding, characterization of activity and structure. Biotechnology Progress Early View.*
- 45 28. Sukumar, M., S. M. Storms y M. R. De Felippis. 2005. *Non-native intermediate conformational states of human growth hormone in the presence of organic solvents. Pharmaceutical Research* 22: 789.
29. Carpenter, J. F., T. W. Randolph, W. Jiskoot, D. J. A. Crommelin, C. R. Middaugh y G. Winter. 2010. *Potential Inaccurate Quantitation and Sizing of Protein Aggregates by Size Exclusion Chromatography: Essential Need to Use Orthogonal Methods to Assure the Quality of Therapeutic Protein Products. Journal of Pharmaceutical Sciences* 99: 2200.
- 50 30. Carpenter, J. F., T. W. Randolph, W. Jiskoot, D. J. A. Crommelin, C. R. Middaugh, G. Winter, Y. X. Fan, S. Kirshner, D. Verthelyi, S. Kozlowski, K. A. Clouse, P. G. Swann, A. Rosenberg y B. Cherney. 2009. *Overlooking Subvisible Particles in Therapeutic Protein Products: Gaps That May Compromise Product Quality. Journal of Pharmaceutical Sciences* 98: 1201.
- 55 31. De Gregorio, E., U. D'Oro y A. Wack. 2009. *Immunology of TLR-independent vaccine adjuvants. Current Opinion in Immunology* 21: 339.
- 60 32. Jiang, B. M., M. K. Estes, C. Barone, V. Barniak, C. M. O'Neal, A. Ottaiano, H. P. Madore y M. E. Conner. 1999. *Heterotypic protection from rotavirus infection in mice vaccinated with virus-like particles. Vaccine* 17: 1005.
33. Sacha, G. A., W. Saffell-Clemmer, K. Abram y M. J. Akers. *Practical fundamentals of glass, rubber, and plastic sterile packaging systems. Pharmaceutical Development and Technology* 15: 6.
- 65 34. Rosenberg, Y. J. 1981. *The Ability of Nonspecific T-Cell Stimulators to Induce Helper-Cell-Dependent*

Increases in Either Polyclonal or Isotype-Restricted Ig Production In Vivo. Cellular Immunology 61: 416.

35. Snapper, C. M. y W. E. Paul. 1987. *Interferon-Gamma and B-Cell Stimulatory Factor-I Reciprocally Regulate Ig Isotype Production. Science* 236: 944.

36. Coutelier, J. P., J. T. M. Vanderlogt, F. W. A. Heessen, G. Warnier y J. Vansnick. 1987. *Igg2a Restriction of Murine Antibodies Elicited by Viral-Infections. Journal of Experimental Medicine* 165: 64.

37. Finkelman, F. D., I. M. Katona, T. R. Mosmann y R. L. Coffman. 1988. *Ifn-Gamma Regulates the Isotypes of Ig Secreted During In Vivo Humoral Immune-Responses. Journal of Immunology* 140: 1022.

38. Charles A. Janeway, P. T., Mark Walport, Mark Schlomchik. 2005. *Basic Concepts in Immunology. In Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. E. Lawrence, ed. Garland Science Publishing, Nueva York, pág. 1.

39. Martin, R. M., J. L. Brady y A. M. Lew. 1998. *The need for IgG2c specific antiserum when isotyping antibodies from C57BL/6 and NOD mice. Journal of Immunological Methods* 212: 187.

40. Teale, J. M. y K. M. Abraham. 1987. *The Regulation of Antibody Class Expression. Immunology Today* 8: 122.

41. Perlmutter, R. M., D. Hansburg, D. E. Briles, R. A. Nicolotti y J. M. Davie. 1978. *Subclass Restriction of Murine Anti-Carbohydrate Antibodies. Journal of Immunology* 121: 566.

42. Snapper, C. M., T. M. McIntyre, R. Mandler, L. M. T. Pecanha, F. D. Finkelman, A. Lees y J. J. Mond. 1992. *Induction of Igg3 Secretion by Interferon Gamma - a Model for T-Cell Independent Class Switching in Response to T-Cell Independent Type-2 Antigens. Journal of Experimental Medicine* 175: 1367.

43. Gonzalez, S. F., L. A. Pitcher, T. Mempel, F. Schuerpf y M. C. Carroll. 2009. *B cell acquisition of antigen in vivo. Current Opinion in Immunology* 21: 251.

44. Schellekens, H. 2003. *Immunogenicity of therapeutic proteins. Nephrology Dialysis Transplantation* 18: 1257.

45. Schellekens, H. y N. Casadevall. 2004. *Immunogenicity of recombinant human proteins: causes and consequences. Journal of Neurology* 251: 4.

46. Dintzis, H. M., R. Z. Dintzis y B. Vogelstein. 1976. *Molecular Determinants of Immunogenicity - Immunon Model of Immune-Response. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73: 3671.

47. Tamura, S. I. y Y. Egashira. 1976. *Cellular and Humoral Immune-Responses in Mice .3. Acceleration of Delayed-Hypersensitivity Response by Presensitization with Suboptimal Dose of Antigen. Immunology* 30: 705.

48. McCully, M. L. y J. Madrenas. 2006. *Dendritic cells as arbiters of peritoneal immune responses. Peritoneal Dialysis International* 26: 8.

49. Betjes, M. G. H., C. W. Tuk, D. G. Struijk, R. T. Krediet, L. Arisz y R. H. J. Beelen. 1993. *Antigen-Presenting Capacity of Macrophages and Dendritic Cells in the Peritoneal-Cavity of Patients Treated with Peritoneal-Dialysis. Clinical and Experimental Immunology* 94: 377.

50. Raff, M. C., Owen, J.J. 1971. *Thymus-derived lymphocytes: their distribution and role in the development of peripheral lymphoid tissues of the mouse. Europ. J. Immunol.:* 27.

51. Raff, M. C., Cantor, H. 1971. *Subpopulations of thymus cells and thymus-derived lymphocytes. Progr. Immunol.:* 83.

EJEMPLO 3: Análisis de partículas subvisibles de Betaseron

El fin de este ejemplo fue examinar la presencia de partículas subvisibles en Betaseron, una formulación de interferón Beta-1b fabricada por Bayer.

Materiales y Métodos

Se adquirió Betaseron® (Bayer, Lote n.º AA8004A) en la Farmacia de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Colorado. Se reconstituyeron tres viales siguiendo las instrucciones del fabricante en el diluyente proporcionado (cloruro de sodio al 0,54 %) y se analizaron por duplicado mediante IMF. Se recuperó una jeringuilla de solución

diluyente para analizar su contenido de partículas.

El análisis de partículas se realizó usando Micro-Flow Imaging™ en un DPA 4100 (Brightwell Technologies, Inc.). Se lavó abundantemente con agua filtrada a 0,2 micrómetros el sistema antes del análisis de la muestra para obtener un valor basal limpio. La optimización de la iluminación se realizó usando solución diluyente de Betaseron. Se analizaron muestras de aproximadamente 0,32 ml de cada preparación a un caudal de 0,1 ml/min a través de una célula de flujo de gran aumento usando una configuración para la detección de partículas de 1,125-100 µm. Los datos obtenidos fueron el número de partículas por volumen por intervalo de tamaño.

10 Resultados

Se formula Betaseron con albúmina humana (HSA) evitando de este modo la cromatografía HPLC-CET convencional. Los estudios de Runkel et al. demuestran que el Betaseron contiene aproximadamente un 60 % de agregados de orden superior y agregados que forman complejo con HSA.

Se analizó Betaseron mediante IMF. Se reconstituyeron tres viales y se recuperó una jeringuilla de solución de diluyentes para analizar su contenido de partículas. Después de la reconstitución de Betaseron, se recuperaron aproximadamente 1,2 ml, volumen suficiente para analizar cada muestra por duplicado. Cuando se analizaron formulaciones de Betaseron, los recuentos de partículas oscilaron entre 38.000 y 147.000 partículas/ml (**Figura 17**) demostrando la variabilidad alta en el contenido de partículas entre las tres preparaciones; en promedio, el Betaseron tenía 89.800 partículas/ml. La distribución del tamaño de partícula se muestra en la **Figura 18**. El tampón de Betaseron tenía niveles muy bajos de recuentos de partículas, lo que indica que la proteína en la formulación es el principal contribuyente de las partículas detectadas mediante IMF. Estos resultados sugieren que las partículas son provocadas por la agregación de la proteína presente en la formulación.

25 EJEMPLO 4: Estudio en ratones transgénicos - Inmunogenia de formulaciones de IFN-beta.

El fin de este Ejemplo fue confirmar que los agregados y las partículas subvisibles presentes en las formulaciones actuales de Betaseron conducen al desarrollo de anticuerpos de unión al IFN-beta monomérico. Se usaron Avonex e IFN-beta-1b tratado a presión para comparación.

30 Materiales y métodos

Se adquirieron formulaciones comerciales de Betaseron (Lote n.º WA9497A) y Avonex (Lote n.º P32033) y se usaron formuladas tal cual. El IFN-beta-1b tratado a presión se usó a una concentración de proteína de 0,11 mg/ml, acetato 25 mM formulado (pH 4,0), trehalosa al 9 %, Tween 20 al 0,01 %. Las mediciones de HPLC-CET demostraron que este material contenía menos del 0,05 % de agregado de peso molecular alto.

La dosificación de los ratones se realizó como se describe en Hermeling et al. [1]. Brevemente, todos los animales (5 por grupo) se dosificaron con 5 mcg i.p. a diario x 5 x 3 semanas. Después de cinco días de dosificación, dos días fueron sin dosis. Se asignó un grupo a IFN-beta-1b tratado a presión, Betaseron y Avonex, respectivamente. Las extracciones de sangre se tomaron en el tiempo 0, 10, 20 y 26 días y se analizaron para determinar el desarrollo de anticuerpos de unión a IFN-beta-1b monomérico mediante un protocolo de ELISA.

45 Resultados

Se obtuvieron lecturas de absorbancia para cada grupo y se normalizaron a la respuesta de un ratón no transgénico dosificado con rhIFN-beta lo dio como resultado un título alto de anticuerpos de unión. Los resultados se muestran en la **Figura 19**. Los animales dosificados con Betaseron desarrollaron una cantidad estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) de anticuerpos de unión a IFN-beta-1b monomérico.

50 Conclusión

La dosificación de Betaseron dio como resultado un desarrollo significativo de anticuerpos de unión a Betaseron monomérico con respecto al valor basal. Ni el Avonex ni el IFN-beta-1b tratado a presión desarrollaron una respuesta significativa. La dosificación a largo plazo de Avonex en seres humanos ha demostrado niveles bajos de inmunogenia, sin embargo, con una fracción más pequeña de pacientes que desarrollaron anticuerpos anti-IFN-beta con respecto al ~40 % de los pacientes que desarrollan anticuerpos después de la dosificación con Betaseron.

60 Las siguientes referencias se incorporan en el presente documento como referencia.

Referencias:

65 (1) Hermeling, Suzanne. 2005. *Structural aspects of the immunogenicity of therapeutic proteins: transgenic animals as predictors for breaking immune tolerance* / Suzanne Hermeling - [S.l.] : [s.n.], Tekst. - Proefschrift Universiteit Utrecht.

(2) Hermeling, Suzanne, W. Jiskoot, D. Crommelin, C. Bornæs y H. Schellekens. 2005. *Development of a Transgenic Mouse Model Immune Tolerant for Human Interferon Beta*. *Pharmaceutical Research* Vol. 22(6).

5 (3) Hermeling S, Schellekens H, Maas C, Gebbink MFBG, Crommelin DJA, Jiskoot W. (2006) *Antibody response to aggregated human interferon alpha2b in wildtype and transgenic immune tolerant mice depends on type and level of aggregation*. *J Pharm Sci* 95: 1084-96.

10 Ejemplo 5: El uso de presión alta para la retirada de partículas subvisibles de formulaciones de Etanercept.

10 Materiales y métodos

15 Se diluyó Etanercept (50 mg en un autoinyector SureClick) a 10 mg/ml en tampón de formulación (fosfato de sodio 25 mM, clorhidrato de L-arginina 25 mM, NaCl 100 mM, sacarosa al 1 %, pH 6,3) y se analizó mediante HPLC-CET, SDS-PAGE y Micro-Flow Imaging (formación de imágenes de micro-flujo, IMF) antes y después del tratamiento con presión hidrostática alta.

El tratamiento con presión hidrostática alta se realizó como se indica a continuación.

20 Experimento 1: Se cargaron Etanercept diluido y tampón de formulación en jeringuillas selladas preparadas para acomodar el tratamiento a presión alta y ser sometieron a diferentes presiones altas (100, 150, 200, 250 y 300 MPa (1000, 1500, 2000, 2500 y 3000 bar)) en un recipiente a presión PreEMT150™ o se dejaron a presión atmosférica durante 16 h a 25 °C. Todos los experimentos se realizaron en singlete. Las muestras tratadas a presión alta se despresurizaron por etapas a una velocidad de 25 MPa (250 bar)/5 min, se abrieron mediante un corte puntas luer selladas y las muestras se colocaron en tubos etiquetados para su análisis posterior. El tratamiento a presión se generó usando recipientes personalizados de presión alta como se ha descrito anteriormente.

30 Experimento 2: Se prepararon Etanercept diluido y tampón de formulación como en el experimento 1 por cuadruplicado y se sometieron a 200 MPa (2000 bar) o se dejaron a presión atmosférica durante 16 horas a 25 °C.

35 Para la cromatografía de exclusión por tamaño (HPLC-CET), se analizaron etanercept inicial y tratado a presión alta (10 mg/ml) en un Tosoh G3000 SWXL usando el sistema de HPLC Agilent 1100 en NaCl 100 mM, fosfato 100 mM pH 6,8, a un caudal de 0,6 ml/min durante 35 min y se detectaron a 280 nm.

40 Para el análisis por Micro-Flow Imaging (formación de imágenes de micro-flujo, IMF), se realizó un análisis de partículas usando Micro-Flow Imaging™ en un DPA 4100 (Brightwell Technologies, Inc.). Se lavó abundantemente con agua filtrada a 0,2 micrómetros el sistema antes del análisis de la muestra para obtener un valor basal limpio. La optimización de iluminación se realizó usando el tampón de formulación. Se analizaron muestras de 0,45 ml de cada preparación a una caudal de 0,1 ml/min a través de una célula de flujo de aumento alto usando una configuración para la detección de partículas 1,125-50. Los datos obtenidos fueron recuentos de números por volumen por intervalo de tamaño.

45 Resultados

El fin de este ejemplo fue examinar la presencia de partículas subvisibles en formulaciones de etanercept y determinar si el tratamiento a presión alta podría usarse para disminuir el contenido de partículas subvisibles. Se ha demostrado que el etanercept, una proteína de fusión dimérica compuesta por 2 dominios extracelulares del receptor TNFRII humano unido a la porción Fc de una inmunoglobulina humana de tipo 1, provoca que el 2-6 % de los pacientes con AR desarrollen anticuerpos anti-etanercept. Bressler et al., *Optimizing use of tumor necrosis factor inhibitors in the management of immune-mediated inflammatory diseases*, *J. Rheumatol. Suppl.* 85: 40-52 (2010).

55 Se adquirieron jeringuillas precargadas comerciales de formulaciones de etanercept, se diluyeron a 10 mg/ml usando un tampón de formulación estéril de partículas controladas y se analizaron para determinar el contenido de agregados mediante cromatografía CET y formación de imágenes de micro-flujo (**Figura 20**). Los resultados demuestran que el etanercept tenía un contenido de agregados del 2,2 % en su formulación final como se analizó mediante HPLC-CET. Cuando se analizó el etanercept mediante IMF, se detectó un promedio de 224.000 partículas/ml y la mayor parte de las partículas tenían un tamaño de 1-5 µm. La CET es una técnica que solo puede detectar partículas inferiores a 100 nm, por lo que no se detecta nada más grande. La IMF puede detectar partículas subvisibles en el intervalo de tamaño de 1-100 µm y estos resultados indican que el etanercept tiene un contenido de agregados superior al descrito anteriormente mediante otras técnicas.

65 En un experimento preliminar de tratamiento a presión alta, el etanercept diluido se trató a una presión de 100, 150, 200, 250 y 300 MPa (1000, 1500, 2500 y 3000 bar), 25 °C, durante 16 horas y se volvió a evaluar el contenido de agregados. La **Figura 21** no muestra ninguna diferencia entre las muestras tratadas a presión atmosférica y

5 analizadas mediante HPLC-CET, lo que indica que el tratamiento a presión no alteró el contenido de agregados solubles (dímero y más grandes). Cuando se analizan muestras mediante IMF, la cantidad de partículas subvisibles en las formulaciones de etanercept disminuyó en aproximadamente un 25 % a presiones que varían entre 100 y 200 MPa (1000 y 2000 bar) (**Figura 22**). A altas presiones (325 MPa (3250 bar)) la cantidad de partículas subvisibles aumentó a ~290.000 partículas/ml. Estos resultados demuestran que la disminución en el contenido de agregados dependía del tratamiento a presión, siendo más eficaz a aproximadamente 200 MPa (2000 bar). Adicionalmente, el aumento del contenido de partículas subvisibles observado después de la aplicación a altas presiones de 300 MPa (3000 bar) demuestra la dependencia de la ventana de presión y que puede producirse agregación inducida por presión para algunas proteínas. En un segundo experimento, las formulaciones diluidas de etanercept (10 mg/ml) se
10 trataron a presión a 200 MPa (2000 bar) por cuadruplicado y se analizaron mediante IMF (**Figura 23**). Los resultados demuestran que el tratamiento a presión redujo la cantidad de partículas subvisibles en >30 %.

REIVINDICACIONES

1. Un método para reducir la inmunogenia de una proteína terapéutica, que comprende:
 - 5 proporcionar una preparación de proteínas terapéuticas que tenga al menos un 90 % de proteína monomérica como se determina mediante cromatografía de exclusión por tamaño y más de 2 ng/ml de partículas subvisibles en el intervalo de tamaño de 0,1 a 10 μm ;
determinar condiciones de presión alta que reducen la cantidad de partículas subvisibles en el intervalo de tamaño de 0,1 a 10 μm favoreciendo al mismo tiempo la proteína monomérica;
 - 10 tratar la preparación de proteínas terapéuticas con presión alta en dichas condiciones de presión alta, en donde un nivel reducido de dichas partículas subvisibles es indicativo de inmunogenia reducida.
2. El método de la reivindicación 1, en el que las partículas subvisibles se reducen al menos 2 veces.
- 15 3. El método de las reivindicaciones 1 o 2 en el que las partículas subvisibles se cuantifican mediante formación de imágenes de micro-flujo, difracción láser o contador coulter.
4. El método de la reivindicación 3, que comprende adicionalmente, formular la proteína terapéutica para la administración subcutánea, intramuscular o intravenosa.
- 20 5. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína terapéutica comprende un anticuerpo monoclonal, un dominio de unión a antígeno o un anticuerpo monocatenario, o una proteína que contiene un dominio Fc.
- 25 6. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína terapéutica es una interleucina o un interferón, una hormona proteínica o peptídica o un factor de crecimiento, un factor de coagulación o una enzima para terapia de reemplazo.
- 30 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que la preparación de proteínas terapéuticas antes del tratamiento a presión alta tiene más del 95 % o más del 97 % de material monomérico como se determina mediante cromatografía de exclusión por tamaño.
8. El método de la reivindicación 7, en el que la preparación de proteínas terapéuticas es sustancialmente cromatográficamente pura como se determina mediante CET.
- 35 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que las condiciones de presión alta incluyen el tratamiento a de 100 a 250 MPa (1000 a 2500 bar).
- 40 10. El método de la reivindicación 1, en el que las condiciones de presión alta incluyen la magnitud de presión alta, la duración del tratamiento a presión alta, la concentración de proteínas, la temperatura, el pH, la fuerza iónica, la concentración de caotropo, la concentración de tensioactivo, la concentración de tampón y la concentración de compuesto excluyente preferencial.
- 45 11. El método de la reivindicación 1, en el que los agregados se cuantifican después del tratamiento a presión alta mediante al menos uno de entre formación de imágenes de micro-flujo, difracción láser y contador coulter, y mediante al menos uno de entre ultracentrifugación analítica, cromatografía de exclusión por tamaño, fraccionamiento de flujo, oscurecimiento de luz, espectroscopía de fluorescencia, electroforesis en gel y análisis molecular de movilidad electroforética de fase gaseosa (AMMEG).
- 50 12. El método de la reivindicación 1, en el que la proteína terapéutica es etanercept.

Preparación	Monómero (%)	Agregado insoluble (%)	Error (%)*
De reserva	100	0	± 1,8
De reserva PA	100	0	± 1,3
Agitada	46	54	± 1,5
Agitada PA	100	0	± 1,9
Congelación-descongelación	76	24	± 1,2
Congelación-descongelación PA	100	0	± 2,0
Vidrio	0	100	± 0,5
Alhydrogel	0	100	± 0,3

* El error que se muestra es el intervalo de confianza del 95 % para inyecciones de HPLC-ET por triplicado

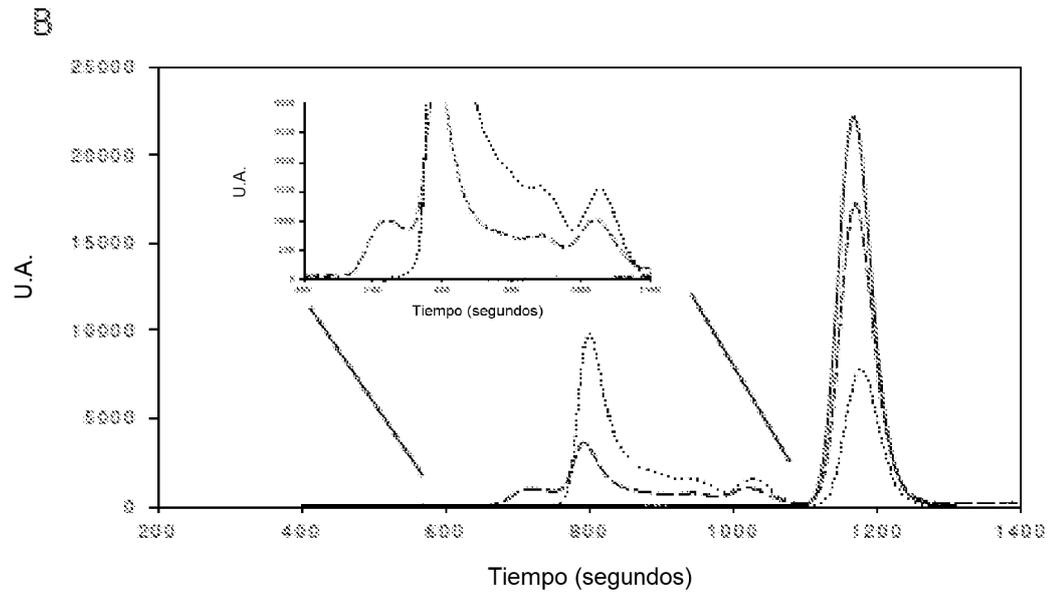
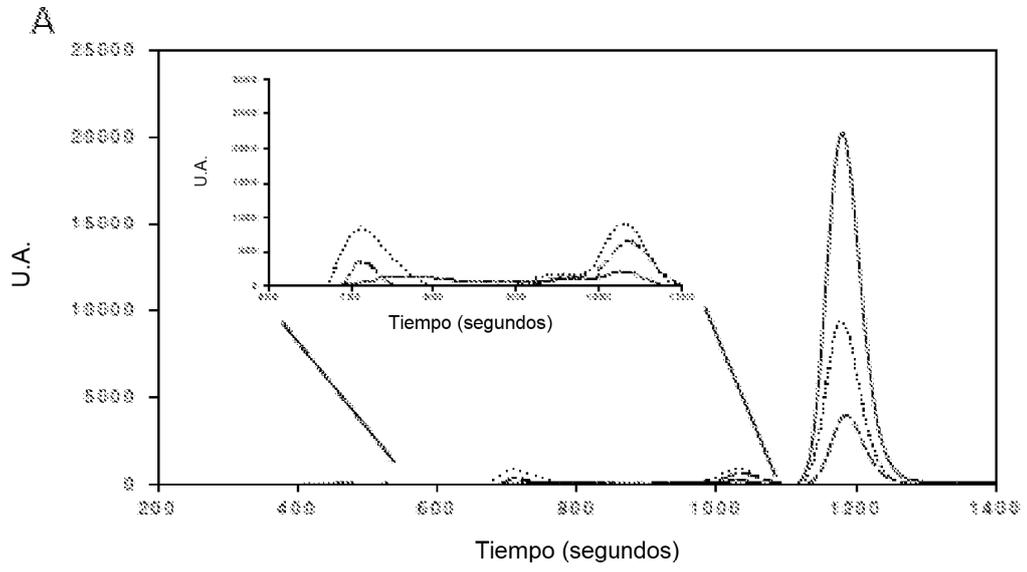
Tabla 2. Comparación de masa calculada de proteína en partículas para agregados homogéneos con análisis por IMF y análisis por HPLC-ET

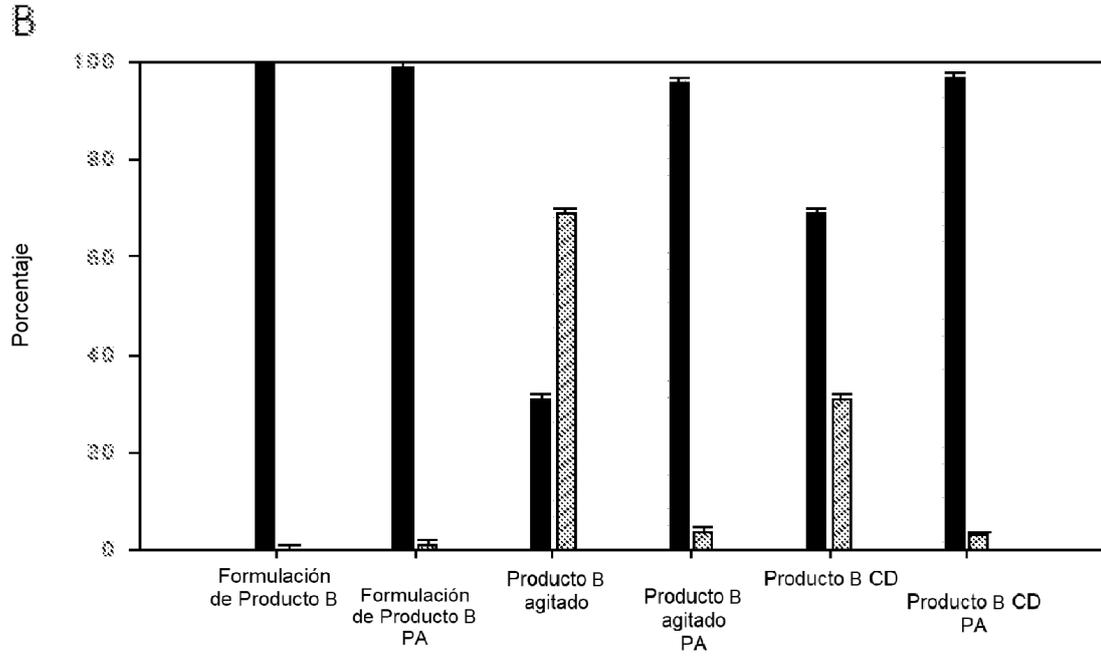
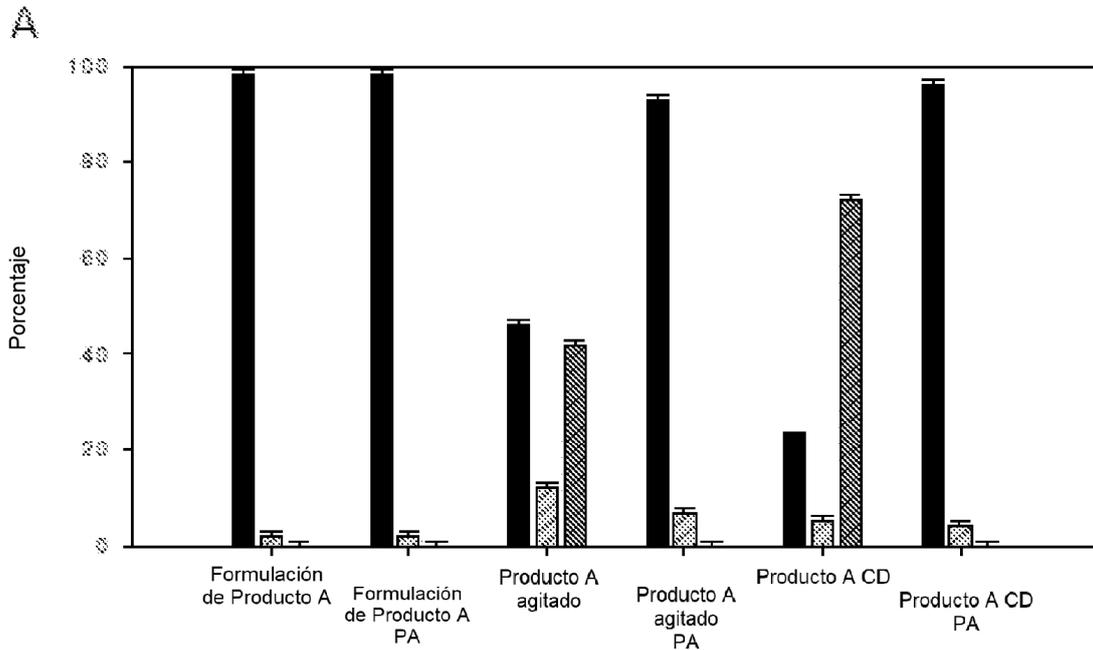
Muestra	Concentración de masa (µg/ml)	Masa* (%)	Agregado insoluble (%)**
De reserva	6,16 ± 4,76	1,2 ± 1	0 ± 1,8
De reserva PA	0,06 ± 0,01	0,001 ± 0,0009	0 ± 1,3
Agitada	248 ± 60	49 ± 11	54 ± 1,5
Agitada PA	0,4 ± 0,1	0,08 ± 0,02	0 ± 1,9
CD	66 ± 10	13 ± 2	24 ± 1,2
CD PA	3,0 ± 0,5	0,6 ± 0,1	0 ± 2,0

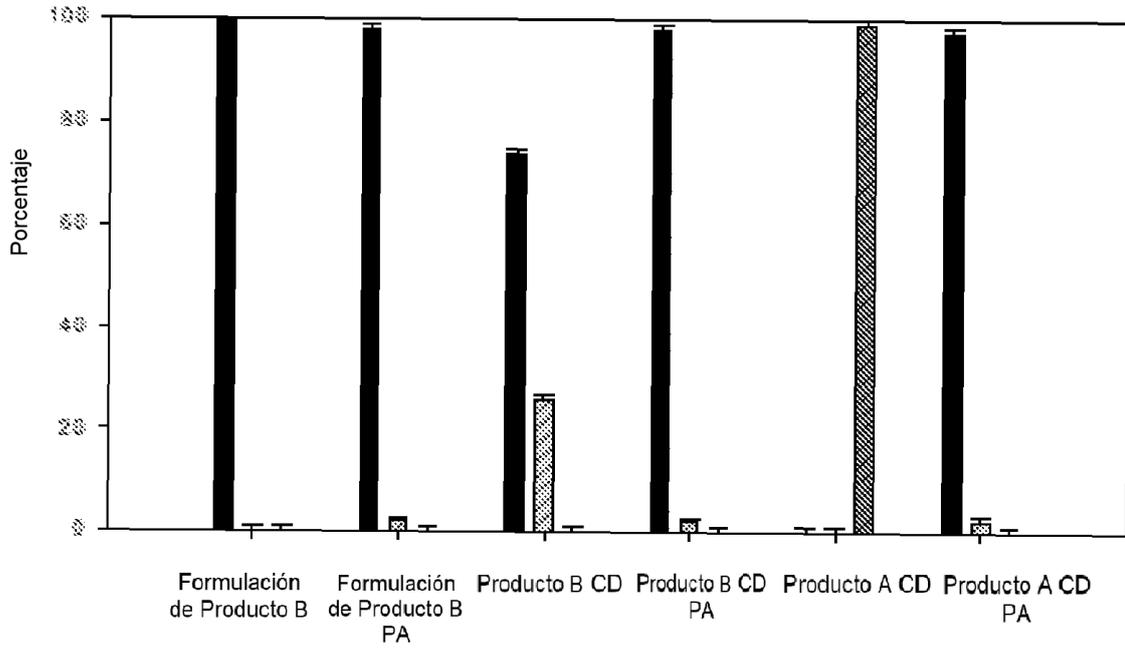
* El error que se muestra es un intervalo de confianza del 95 % para datos de IMF por triplicado

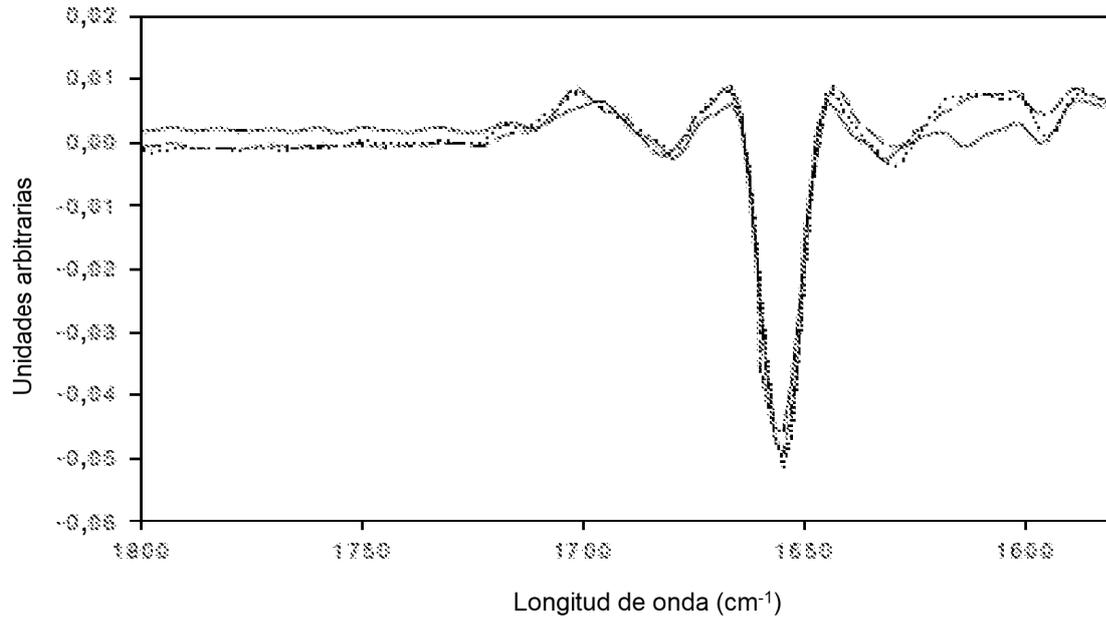
** El error que se muestra es un intervalo de confianza del 95 % para inyecciones por triplicado en HPLC-ET

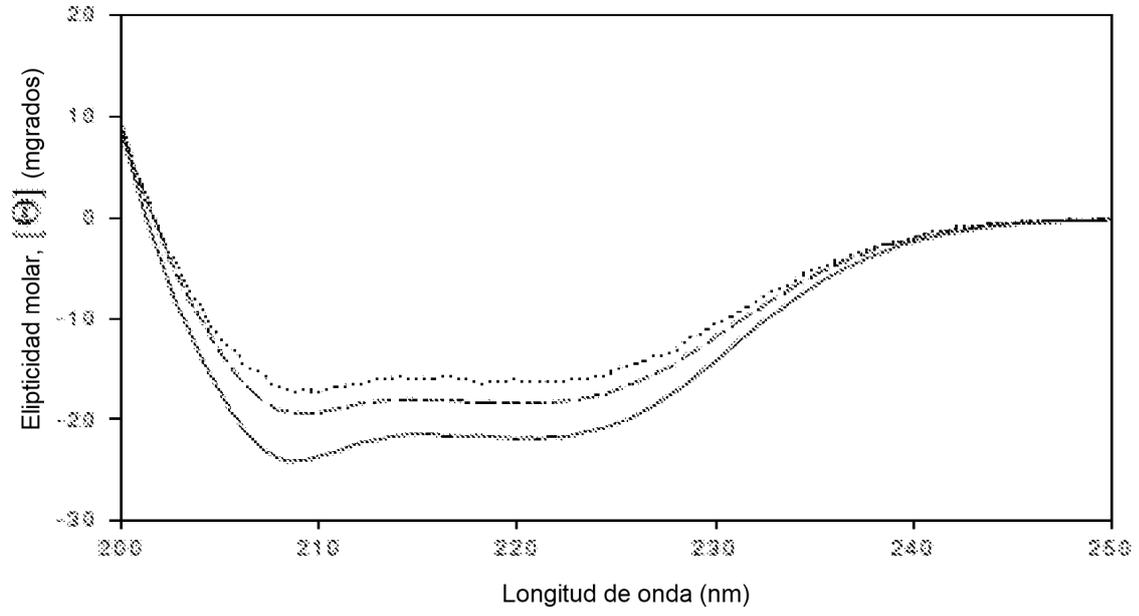
FIGURA 1

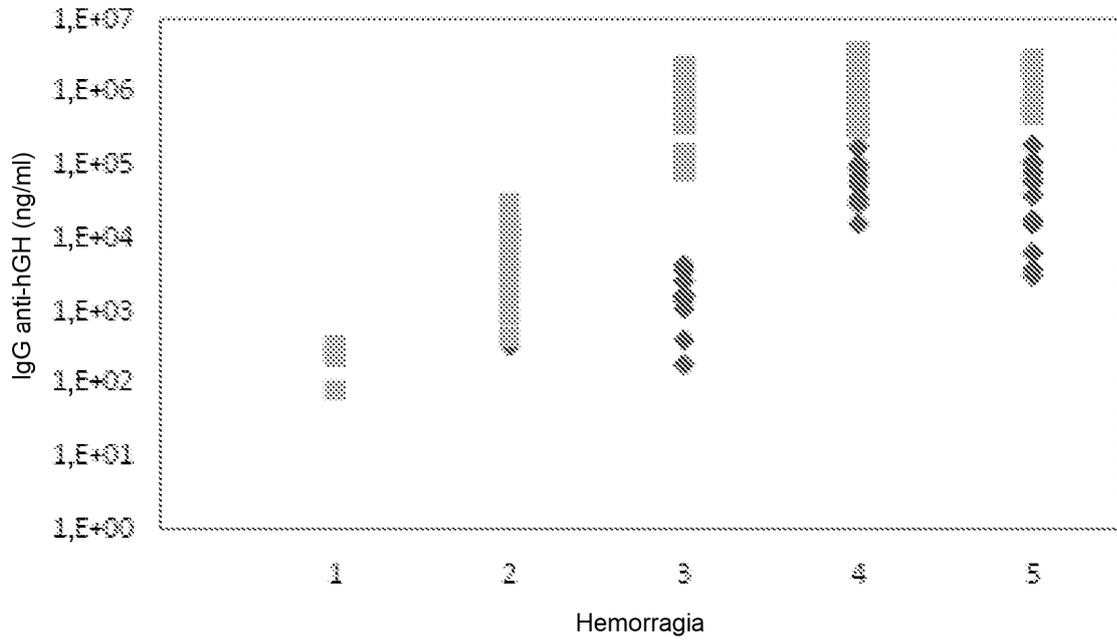


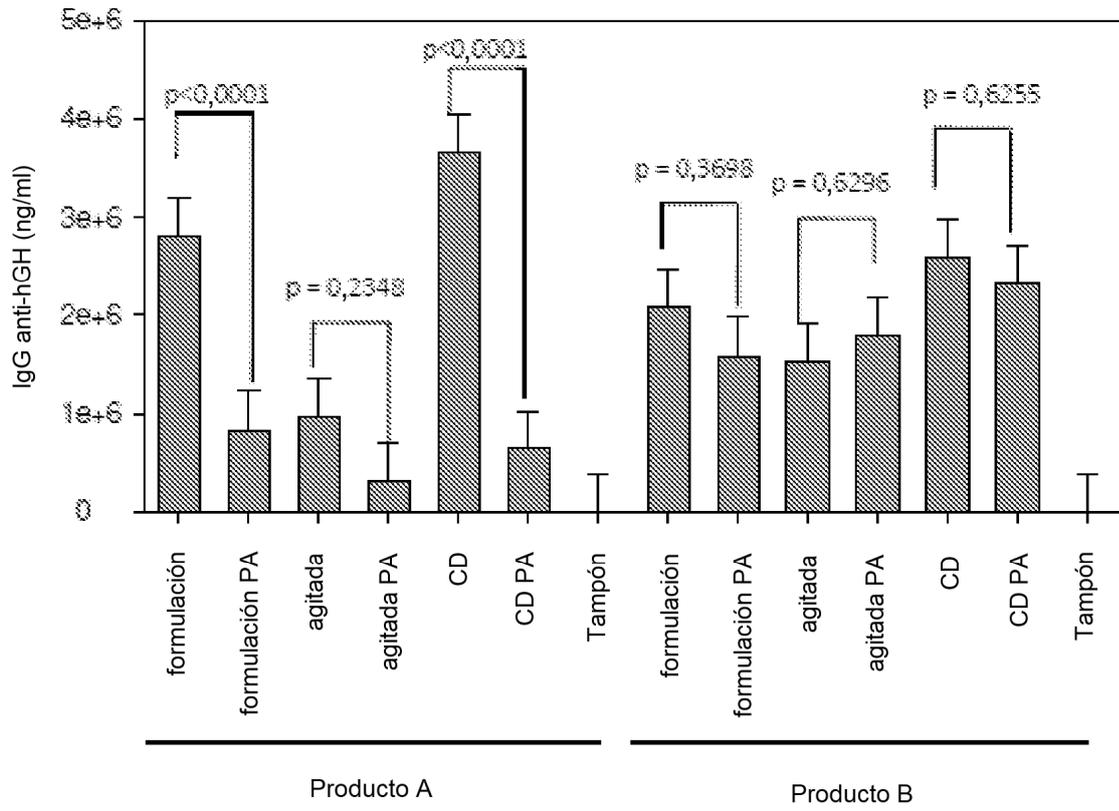


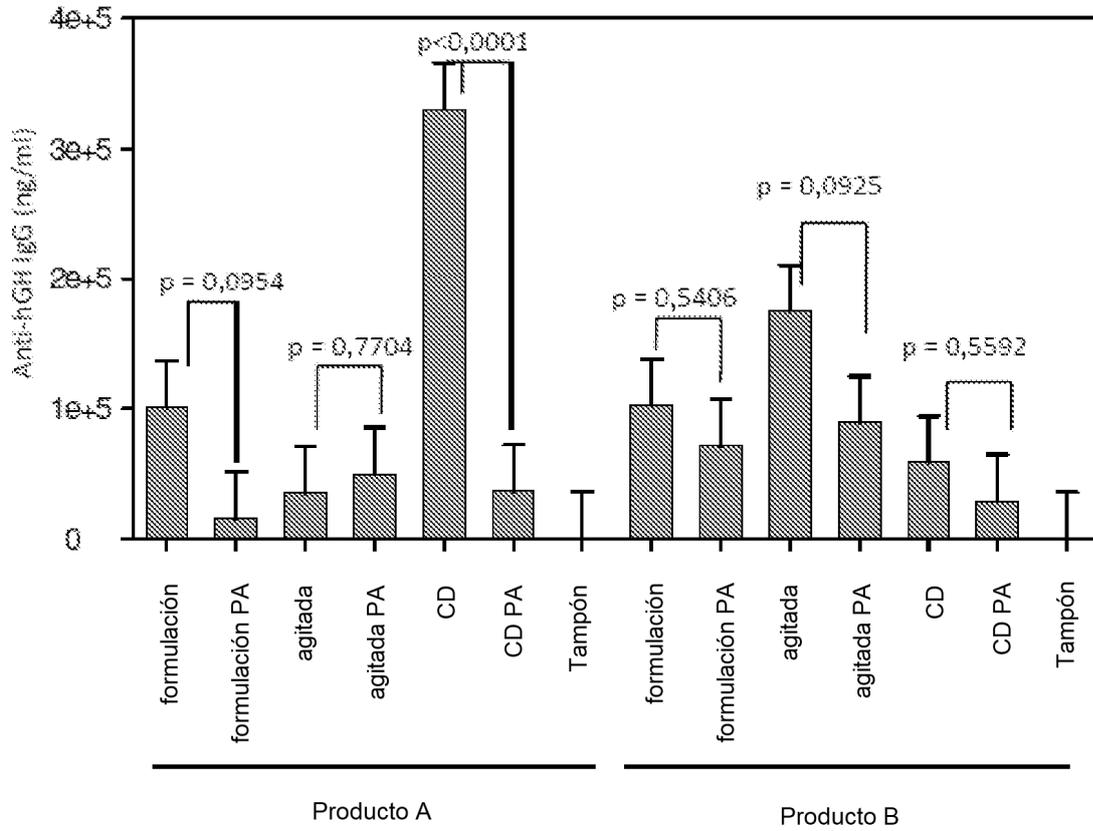


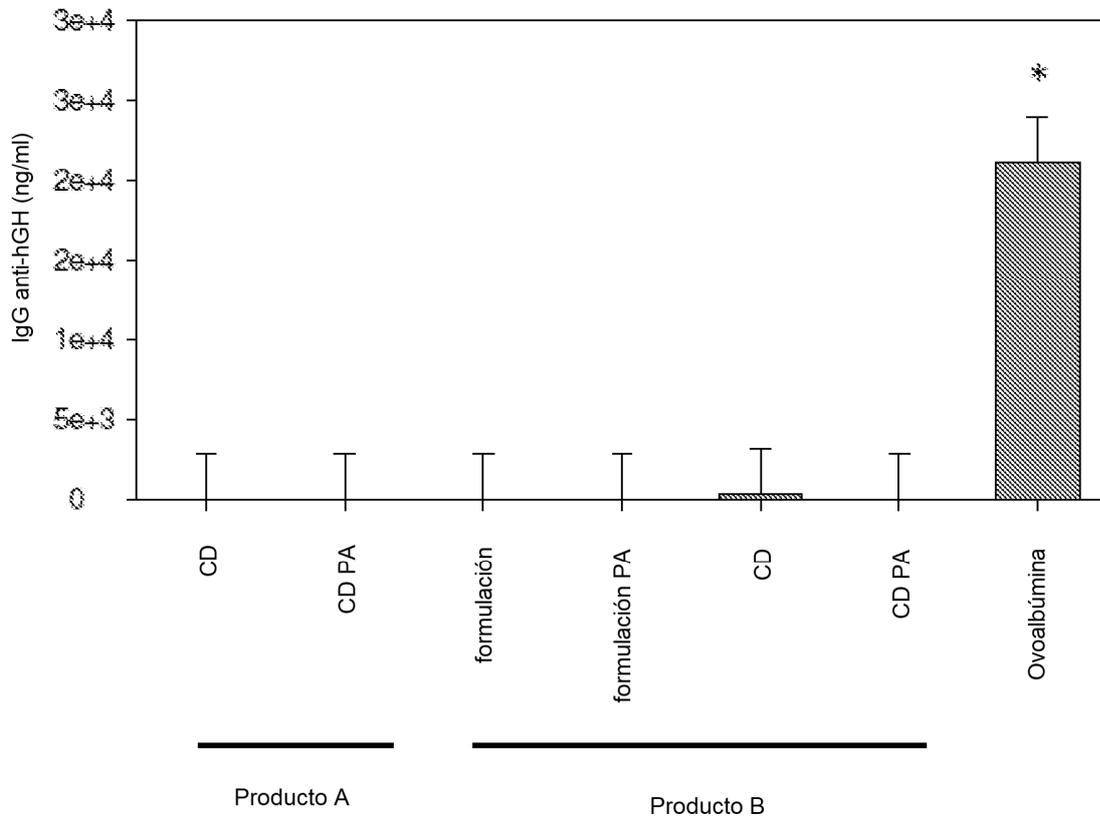












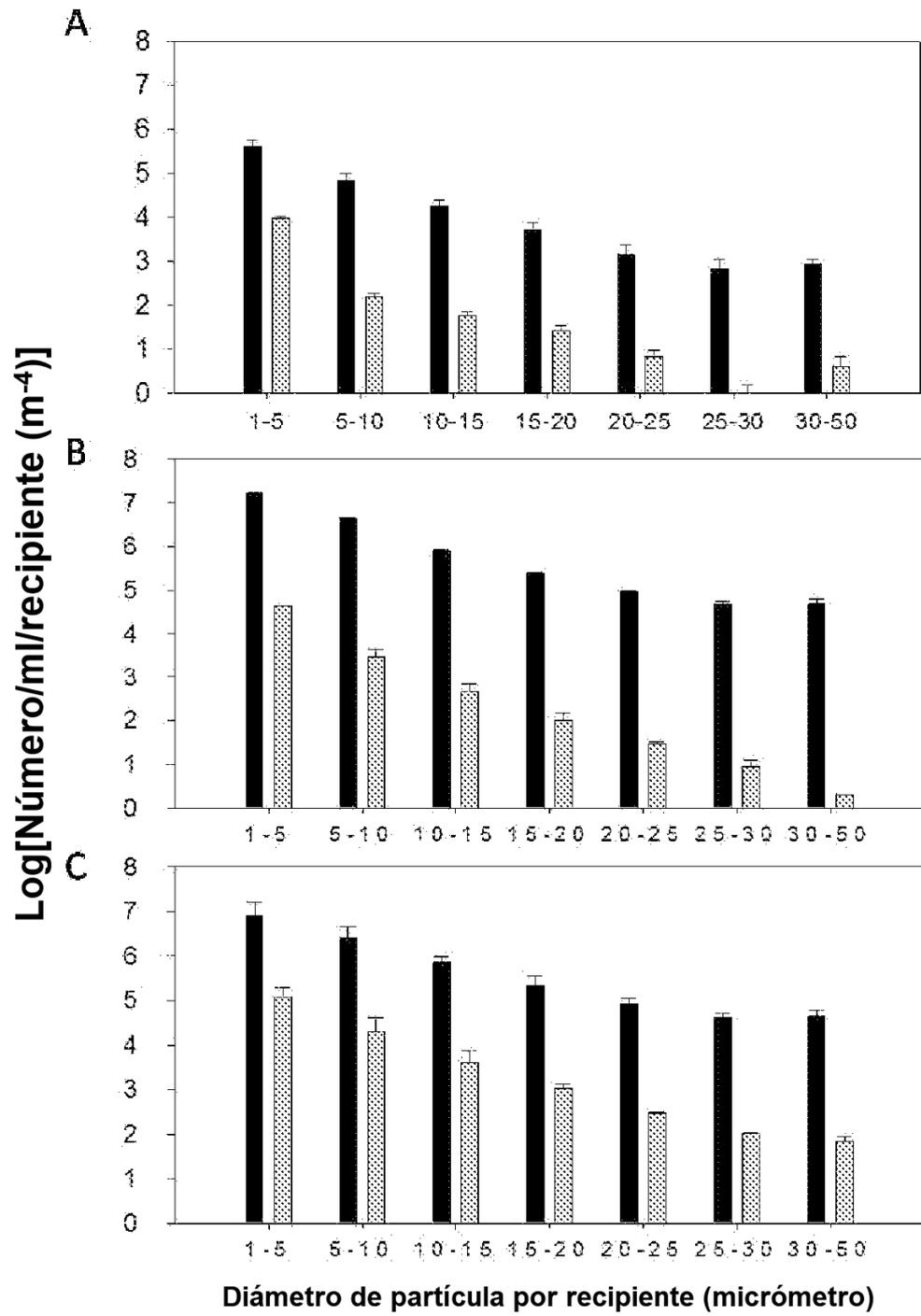


FIGURA 11

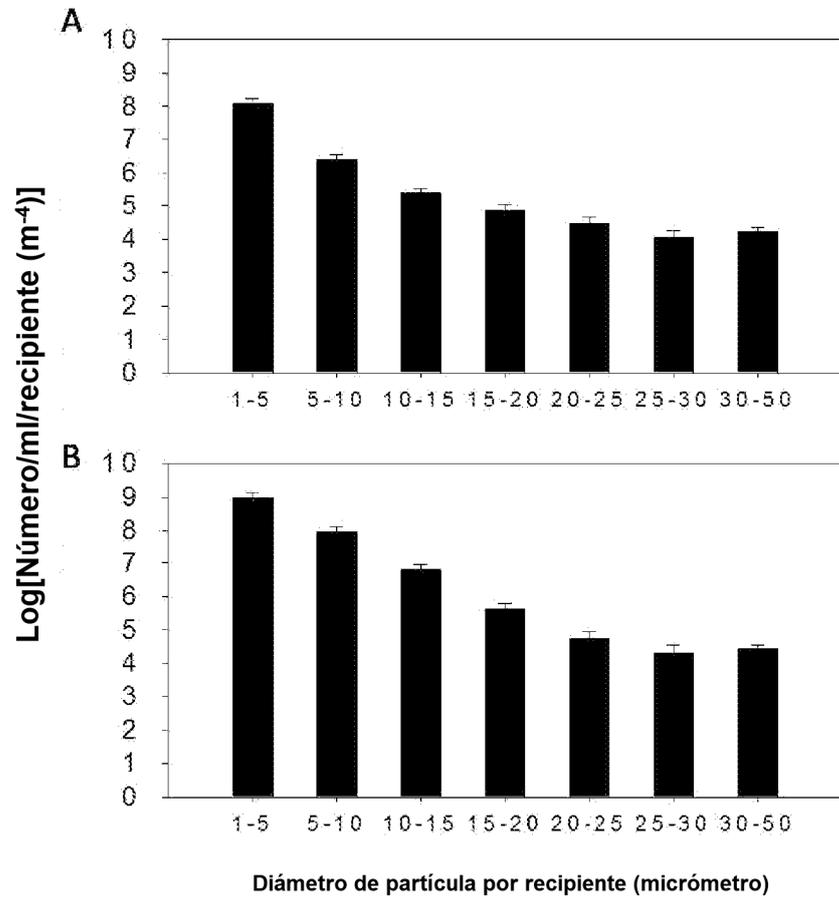
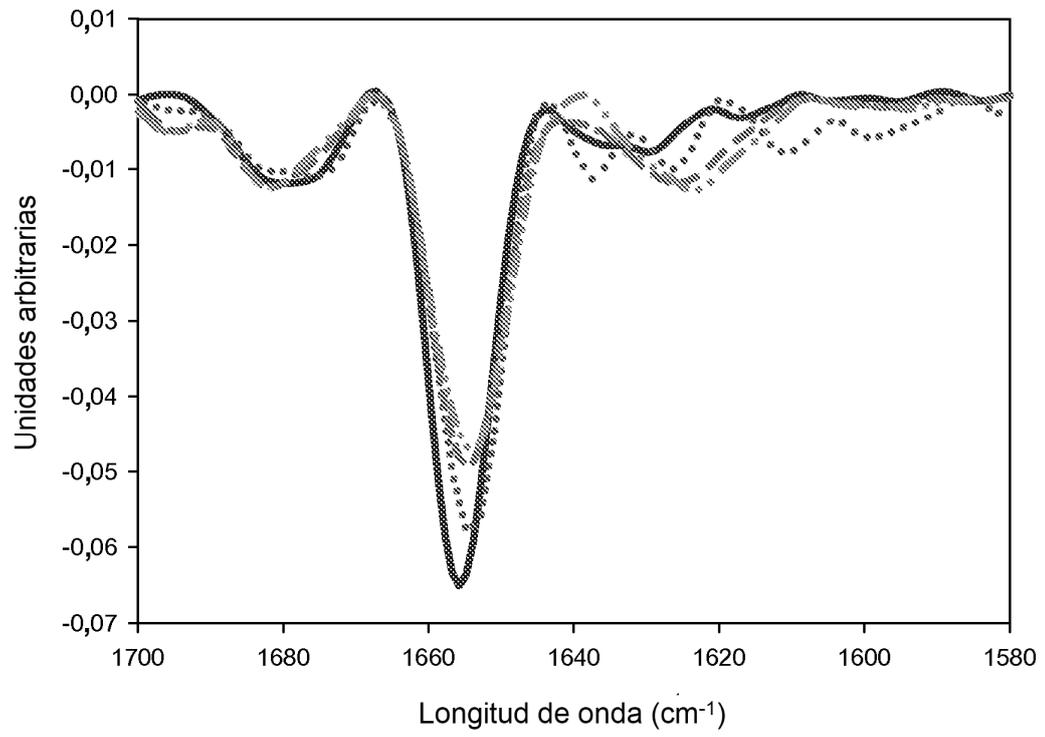
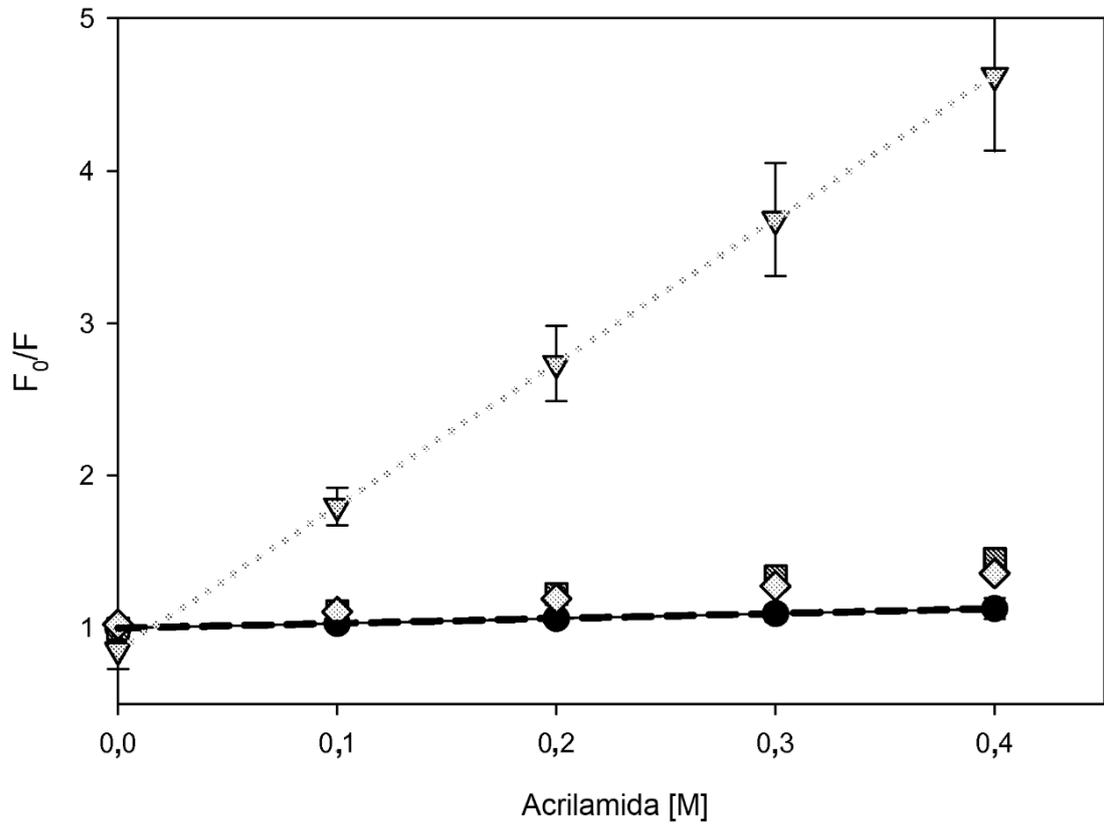
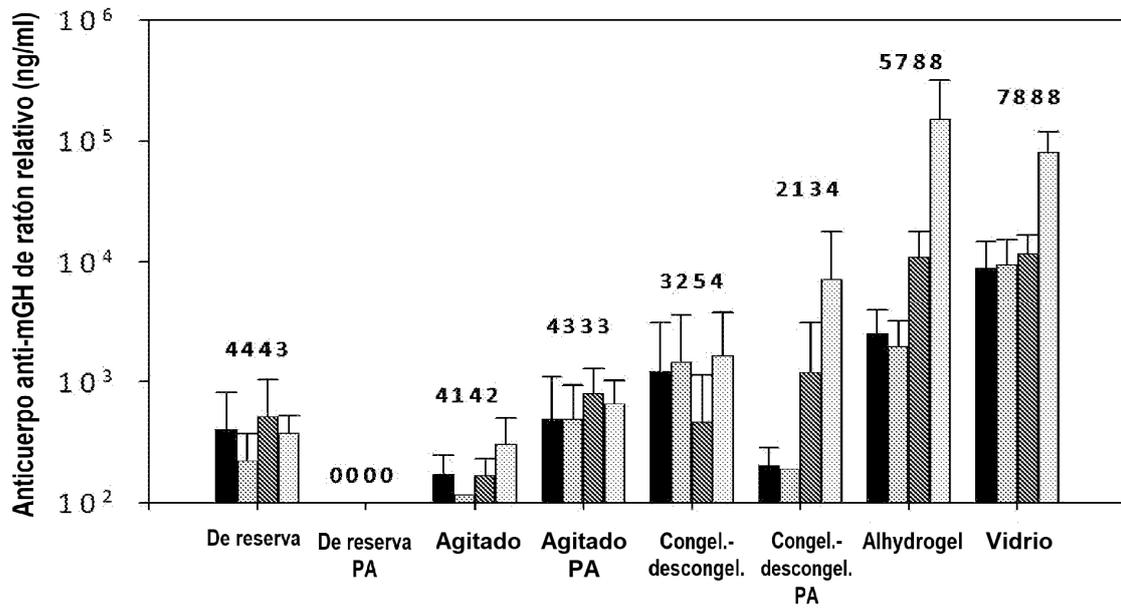
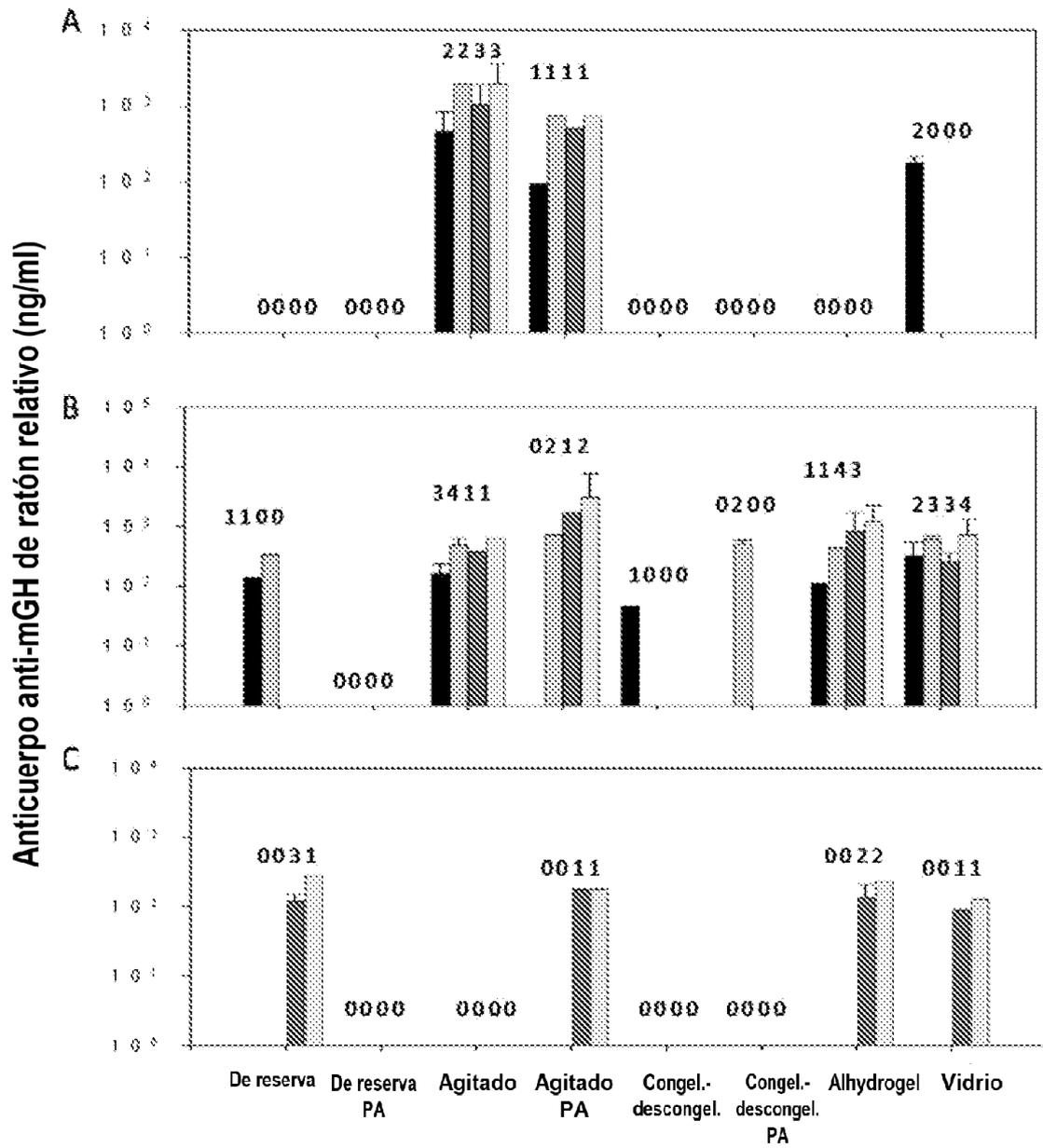


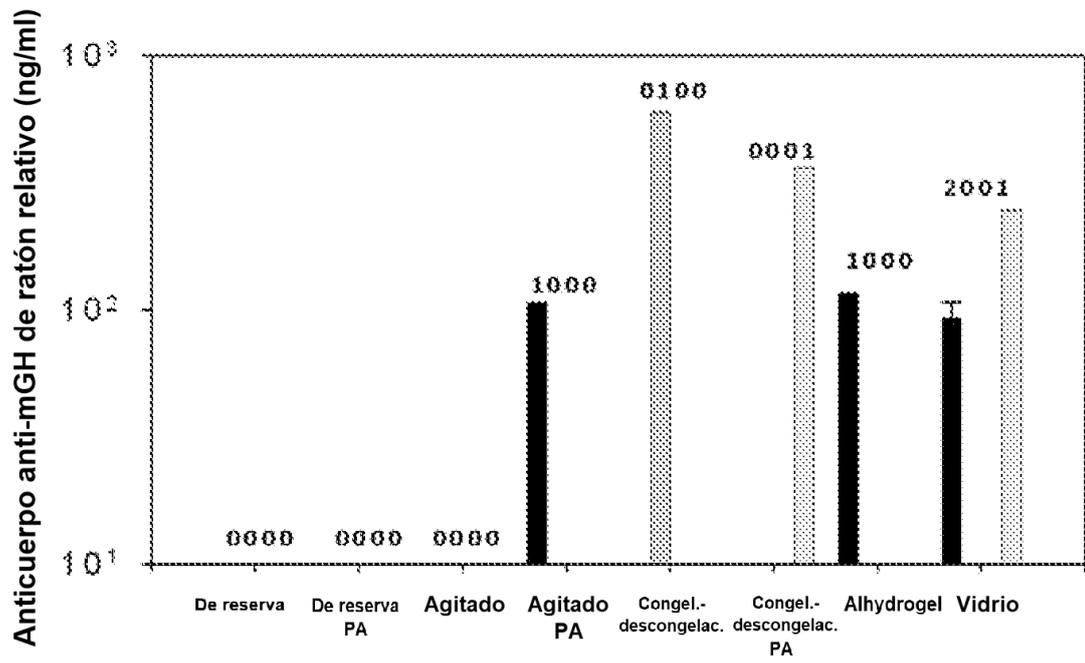
FIGURA 12

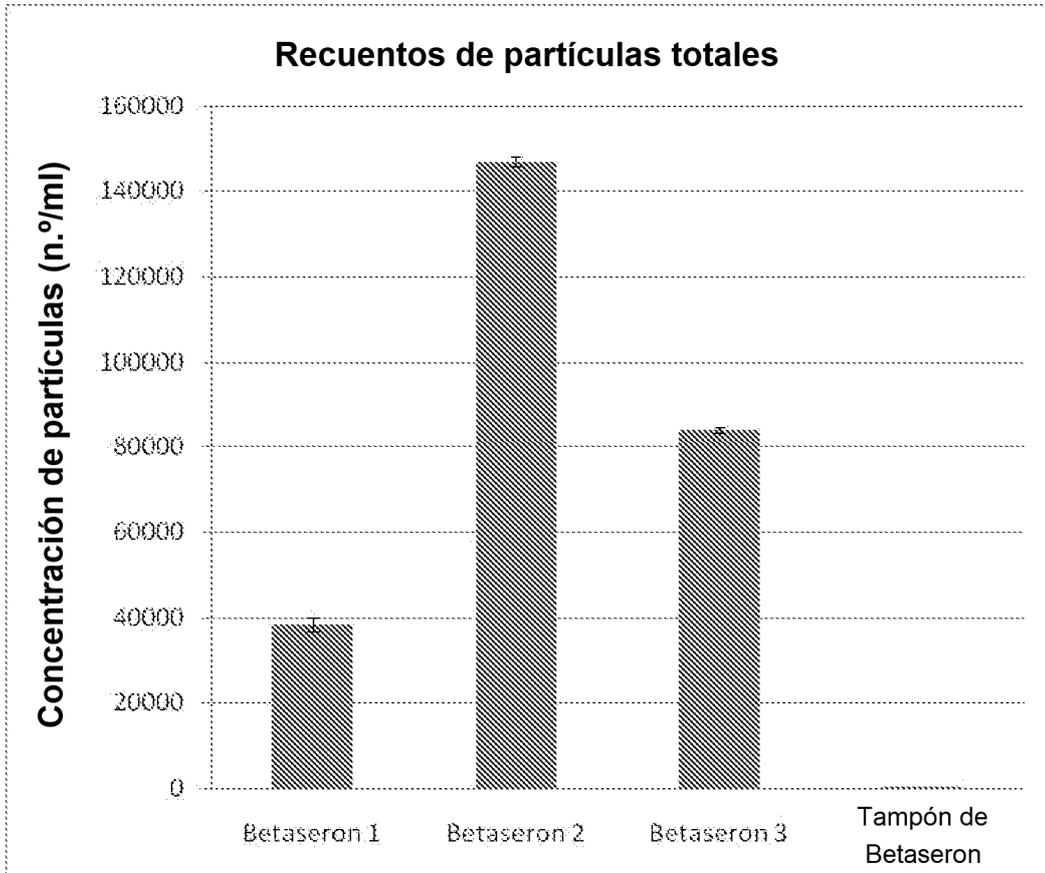


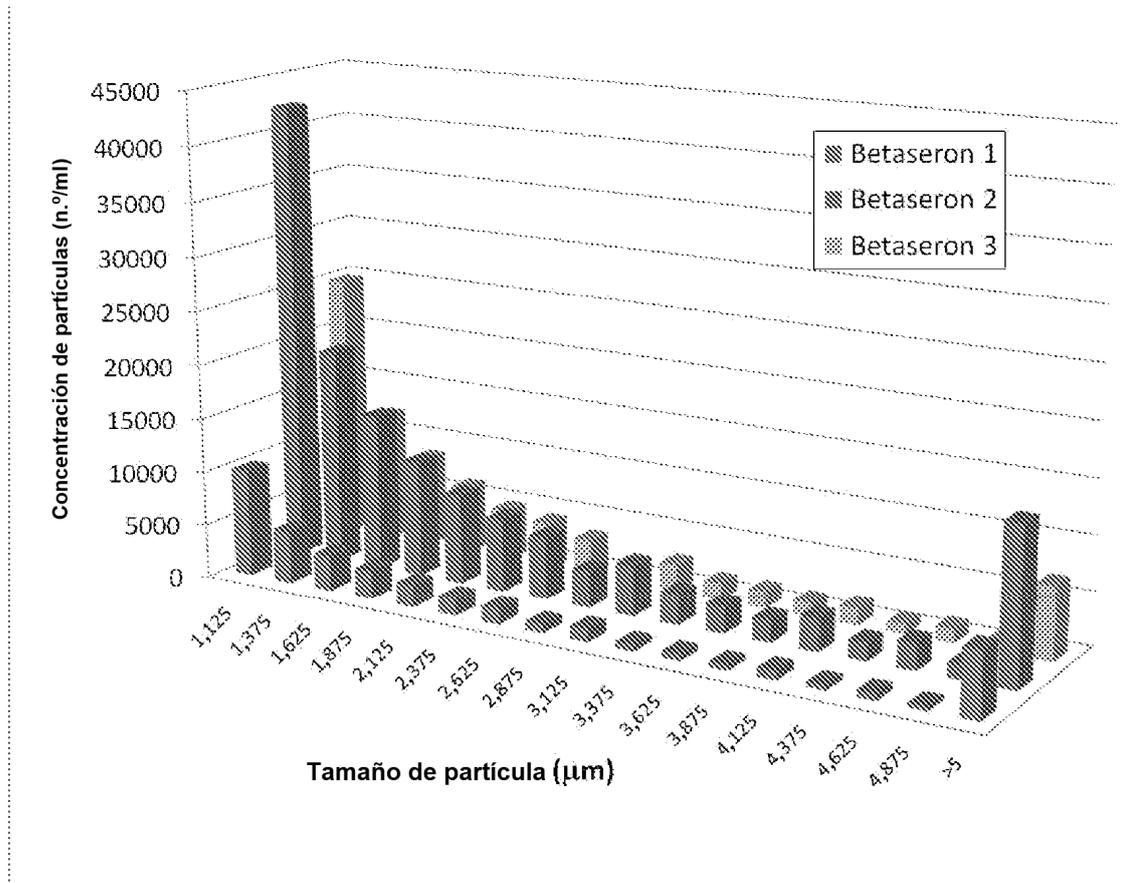


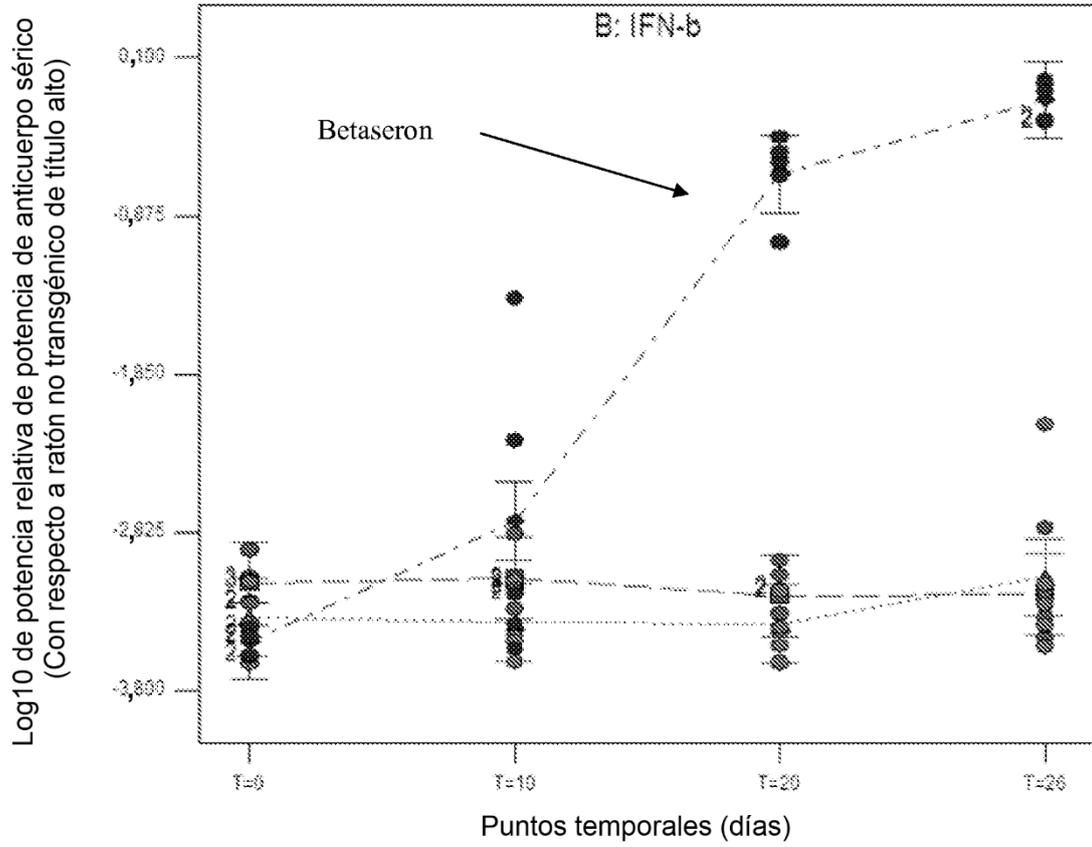












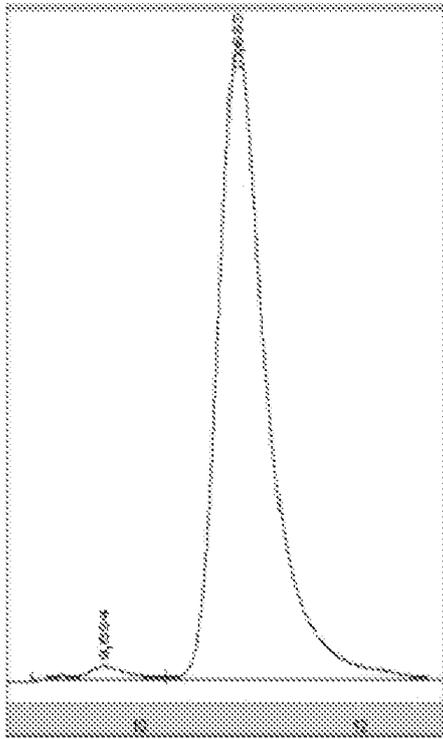


FIG. 20A

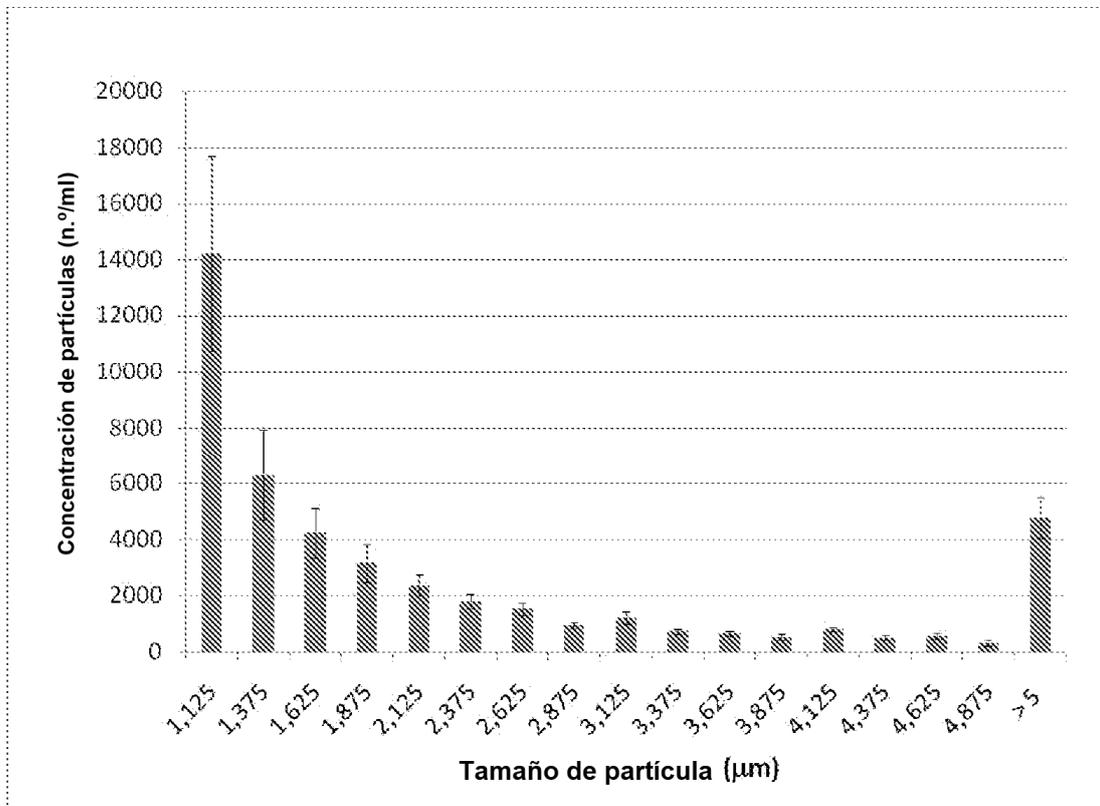
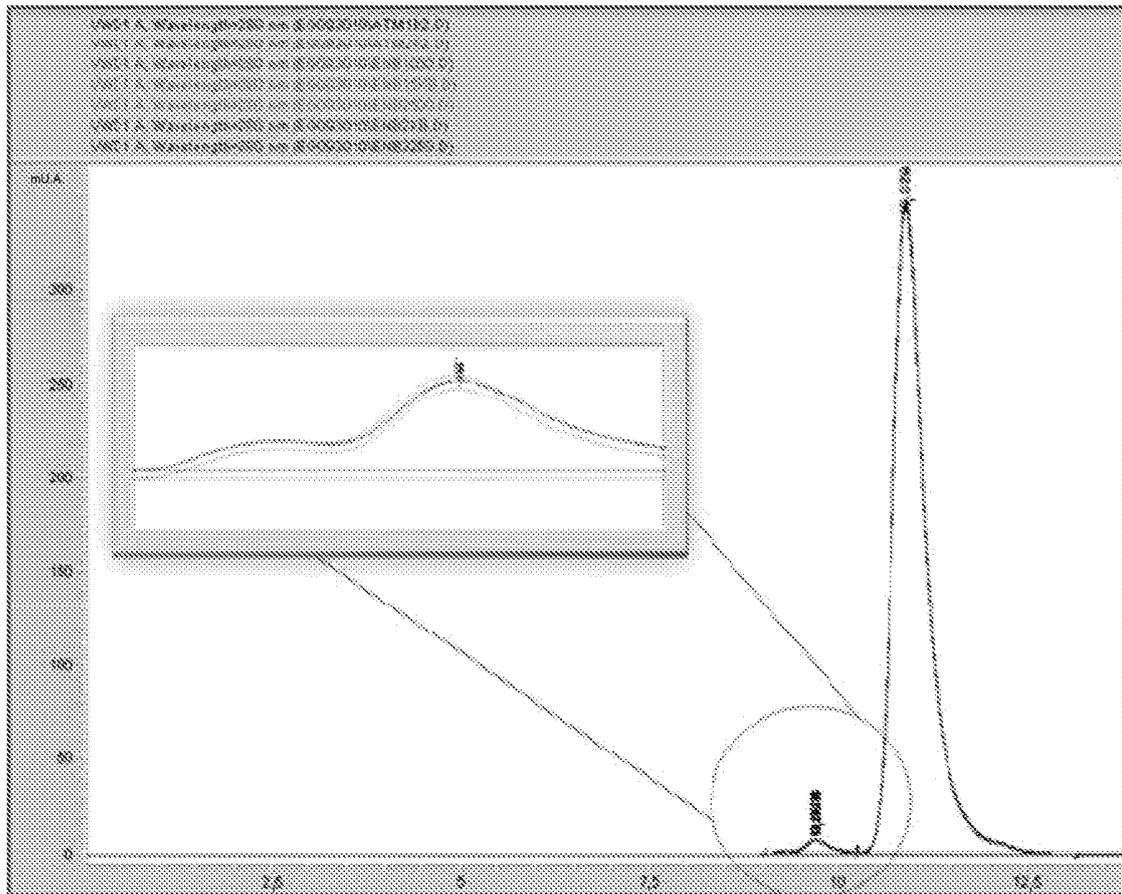
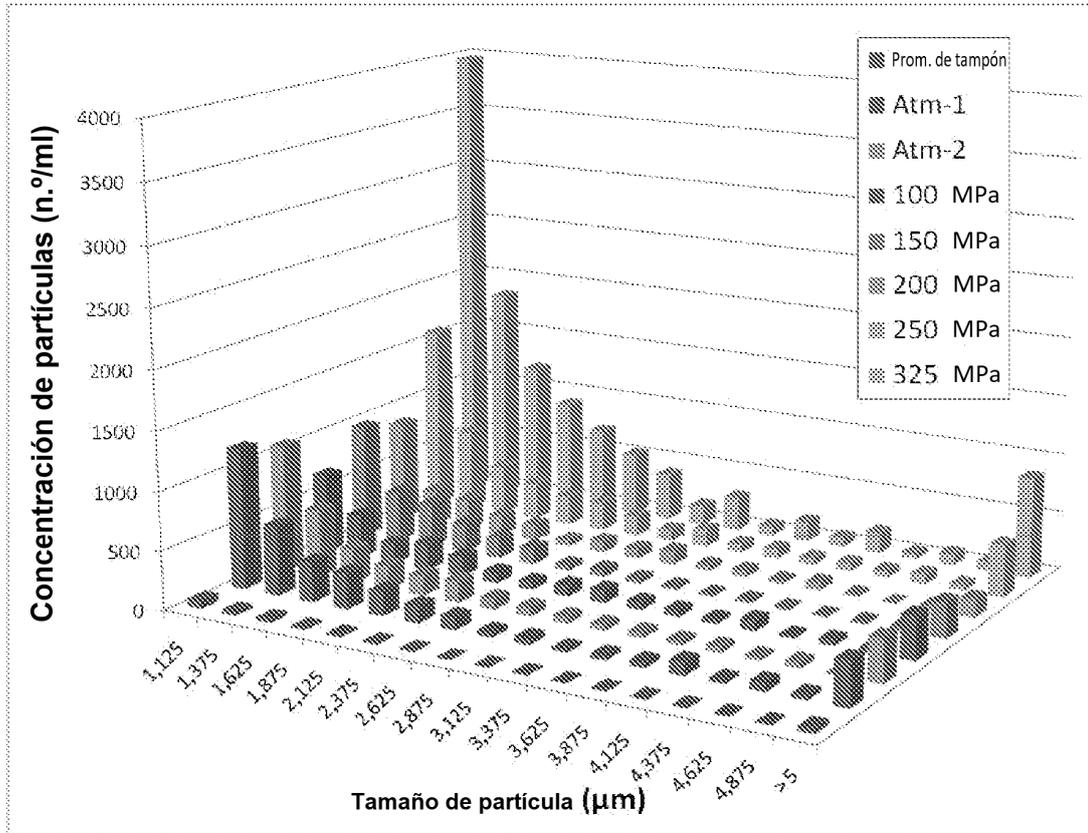


FIG. 20B





Recuentos de partículas totales	
Condición	n.º/ml
Atm 1	92700
Atm 2	83225
100 MPa	67225
150 MPa	74025
200 MPa	61975
250 MPa	70200
325 MPa	290800
Tampón de formulación	266

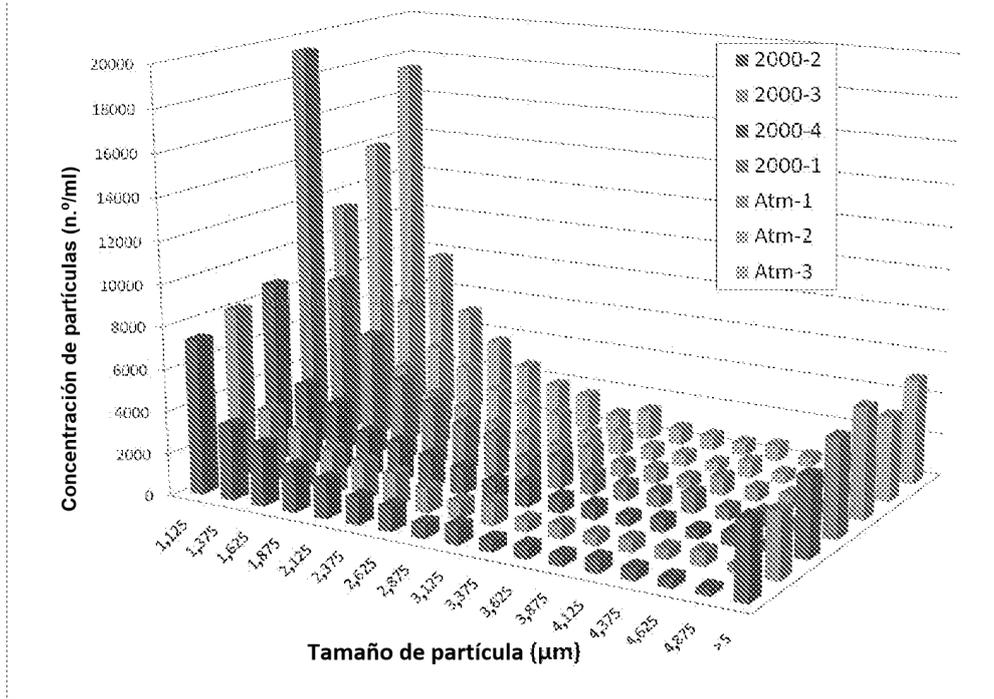


FIGURA 23B

