

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 776 657**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C12P 21/08 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **08.06.2006 E 17205734 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.01.2020 EP 3351269**

54 Título: **Formulaciones de proteínas autotamponantes**

30 Prioridad:

14.06.2005 US 690582 P

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

31.07.2020

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive M/S 28-2-C
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**GOKARN, YATIN, R.;
KRAS, EVA;
BREMS, DAVID, N.;
REMMELE, RICHARD, LOUIS, JR. y
HERSHENSON, SUSAN, IRENE**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 776 657 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones de proteínas autotamponantes

5 Campo de la invención

La invención se refiere a la formulación de proteínas, especialmente a proteínas farmacéuticas. En particular, se refiere a composiciones de proteínas biofarmacéuticas autotamponantes, y a métodos para diseñar, preparar y usar las composiciones. Se refiere además a composiciones farmacéuticas de proteínas para uso veterinario y/o médico humano, y a métodos relacionados con las mismas.

Antecedentes de la invención

15 Muchos aspectos de la producción farmacéutica y de los procesos de formulación son sensibles al pH. Mantener el pH correcto de un producto farmacéutico terminado es crítico para su estabilidad, eficacia y período de validez, y el pH es una consideración importante en el diseño de formulaciones para administración que sean aceptables, además de seguras y eficaces.

20 Para mantener el pH, los procesos y formulaciones farmacéuticas utilizan uno o más agentes tamponantes. Hay disponibles una variedad de agentes tamponantes para uso farmacéutico. El tampón o los tampones para una aplicación dada deben ser eficaces al pH deseado. También deben proporcionar capacidad tampón suficiente para mantener el pH deseado durante el tiempo que sea necesario. Un buen tampón para una composición farmacéutica debe satisfacer también muchos otros requisitos. Debe ser adecuadamente soluble. No debe formar complejos perjudiciales con iones metálicos, ser tóxico o penetrar, solubilizarse o absorberse indebidamente en membranas u otras superficies. No debe interactuar con otros componentes de la composición de ninguna manera que disminuya su disponibilidad o eficacia. Debe ser estable y eficaz para mantener el pH en el intervalo de condiciones a las que estará expuesto durante la formulación y durante el almacenamiento del producto. No debe verse afectado perjudicialmente por la oxidación u otras reacciones que se producen en su entorno, tal como las que se producen en el procesamiento de la composición en la que está proporcionando la acción tamponante. Si se transfiere o incorpora a un producto final, un agente tamponante debe ser seguro para la administración, compatible con otros componentes de la composición durante el período de validez del producto y aceptable para la administración al usuario final.

35 Aunque hay muchos tampones de uso general, solo un número limitado es adecuado para aplicaciones biológicas y, de estos, menos aún son aceptables para procesos y formulaciones farmacéuticas. Como resultado, con frecuencia es difícil encontrar un tampón que no solo sea eficaz para mantener el pH, sino que también cumpla con todos los demás requisitos para un proceso, formulación o producto farmacéutico determinado.

40 El desafío de encontrar un tampón adecuado para uso farmacéutico puede ser especialmente fuerte para las proteínas farmacéuticas. La conformación y la actividad de las proteínas son críticamente dependientes del pH. Las proteínas son susceptibles a una variedad de reacciones sensibles al pH que son perjudiciales para su eficacia, generalmente muchas más que afectan a los fármacos de molécula pequeña. Por ejemplo, por mencionar solo algunos ejemplos destacados, las amidas de cadena lateral de asparagina y glutamina se desamidán a pH bajo (menos de 4,0) y también a pH neutro o alto (más de 6,0). Los restos de ácido aspártico promueven la hidrólisis de enlaces peptídicos adyacentes a pH bajo. La estabilidad y la disposición de los enlaces disulfuro dependen en gran medida del pH, particularmente en presencia de tioles. La solubilidad, floculación, agregación, precipitación y fibrilación de las proteínas son críticamente dependientes del pH. El hábito cristalino importante para algunas formulaciones farmacéuticas también depende críticamente del pH. Y el pH también es un factor importante en la adsorción de la superficie de muchos péptidos y proteínas farmacéuticas.

50 Además, los agentes tamponantes que catalizan reacciones que inactivan y/o degradan uno o más ingredientes diferentes, no pueden usarse en formulaciones farmacéuticas. Los tampones para uso farmacéutico deben tener no solo la capacidad tampón necesaria para mantener el pH correcto, sino que tampoco deben tamponar con tanta fuerza que su administración perturbe perjudicialmente el pH fisiológico de un sujeto. Los tampones para formulaciones farmacéuticas también deben ser compatibles con procesos de formulación generalmente complejos. Por ejemplo, los tampones que subliman o se evaporan, tal como el acetato y el imidazol, generalmente no se pueden utilizar para mantener el pH durante la liofilización y en el producto de liofilización reconstituido. No se puede confiar en otros tampones que cristalizan en la fase amorfa de la proteína, tal como el fosfato de sodio, para mantener el pH en los procesos que necesitan congelación.

60 Los tampones utilizados para mantener el pH en los productos finales farmacéuticos también deben ser no solo eficaces para mantener el pH, sino también seguros y aceptables para la administración al sujeto. Por ejemplo, varios tampones de otro modo útiles, tal como el citrato a baja o alta concentración y el acetato a alta concentración, son, de manera no deseable, dolorosos cuando se administran por vía parenteral.

65 Se ha encontrado que algunos tampones son útiles en la formulación de proteínas farmacéuticas, tal como acetato, succinato, citrato, histidina (imidazol), fosfato y Tris. Todos tienen limitaciones y desventajas no deseables. Y todos

tienen la desventaja inherente de ser un ingrediente adicional en la formulación, lo que complica el proceso de formulación, plantea un riesgo de afectar perjudicialmente a otros ingredientes, estabilidad, al periodo de validez y a la aceptabilidad para el usuario final.

5 Existe la necesidad, por lo tanto, para métodos adicionales y mejorados de mantener el pH en la producción y formulación de productos farmacéuticos y en composiciones farmacéuticas, particularmente en la producción y formulación de proteínas biofarmacéuticas y en composiciones de proteínas biofarmacéuticas.

10 El documento WO 03/002713 describe anticuerpos que interactúan con el ligando de osteoprotegerina (OPGL), métodos para tratar trastornos osteopénicos mediante la administración de una cantidad farmacéuticamente eficaz de anticuerpos para OPGL y métodos para detectar la cantidad de OPGL en una muestra usando anticuerpos para OPGL.

15 El uso de proteínas como tampones se describe en Halvor N. Christensen "Proteins as Buffers" (Annals of the New York Academy of Sciences, vol. 133, n.º 1 Current Conce, 1 de abril de 1966, páginas 34-30, XP055045656).

La influencia de la histidina en la estabilidad y las propiedades físicas de un anticuerpo completamente humano en formas acuosas y sólidas se describe en Bei Chen et al ("Influence of histidine on the stability and physical properties of a fully human antibody in aqueous and solid forms", Pharmaceutical Research, Kluwer Academic Publishers, Nueva York, NY, US, vol. 20, n.º 12, 1 de diciembre de 2003, páginas 1952-1960, XP002386671).

20 El documento US 5.945.098 describe preparaciones estables de inmunoglobulinas administrables por vía intravenosa estabilizadas contra la agregación y la polimerización y que se vuelven isotónicas con aminoácidos y con los detergentes no iónicos, polisorbato y polietilenglicol.

25 Se requiere una relación molar específica de estabilizador a proteína para la estabilidad de almacenamiento de un anticuerpo monoclonal liofilizado como se describe en Cleland et al (Cleland J L at al "a specific molar ratio of stabilizer to protein is required for storage stability of a lyophilized monoclonal antibody", Journal of Pharmaceutical Sciences, American Pharmaceutical Association, Washington, US, vol. 90, n.º 3, 1 de marzo de 2001, páginas 310-321, XP001179875).

30 Sumario

La presente invención se refiere, en un primer aspecto, a una composición de un anticuerpo recombinante y uno o más polioles farmacéuticamente aceptables, en donde al pH de la composición, a 21 ° C, a una atmósfera y en equilibrio con la atmósfera ambiente, el anticuerpo tiene una capacidad tampón por unidad de volumen de al menos la de aproximadamente el tampón de acetato de sodio 4,0 mM en agua pura en el intervalo de pH 5,0 a 4,0 o pH 5,0 a 5,5 en las mismas condiciones, y en donde además, excluyendo la capacidad tampón de dicho anticuerpo, la capacidad tampón por unidad de volumen de la composición en las mismas condiciones no es más que la del tampón de acetato de sodio 2,0 mM en agua pura en el intervalo de pH 5,0 a 4,0 o pH 5,0 a 5,5 en las mismas condiciones, en donde el anticuerpo proporciona al menos el 80 % de la capacidad tampón de la composición, en donde la concentración del anticuerpo está entre aproximadamente 20 y 400 mg/ml, en donde el pH mantenido por la acción tamponante del anticuerpo está entre aproximadamente 3,5 y 8,0, y en donde el anticuerpo comprende:

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

E VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS YAMSWVRQAP GKGLEWVSGI
 TGSGGSTYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKDPG
 TTVIMSWFDP WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV
 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ
 TYTCNVDHKP SNTKVDKTVE RKCCVECPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT
 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF
 RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYV
 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPMLDS
 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPGK;

45 y

una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR GRYLAWYQQK PGQAPRLLIY
 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVFYCQ QYGSSPRTFG
 QGTKVEIKRT VAAPSVFI FP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPBREAKVQWK
 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSLSTL TLSKADYEKH KVYACEVTHQ
 GLSSPVTKSF NRGEC.

El pH mantenido por la acción tamponante del anticuerpo puede estar entre aproximadamente 4 y 6.

5 La composición puede comprender además una o más sales farmacéuticamente aceptables. La concentración total de sal puede ser inferior a 150 mM. La concentración total de sal puede ser inferior a 100 mM. El poliol puede ser uno o más de sorbitol, manitol, sacarosa, trehalosa o glicerol.

10 La composición puede comprender además uno o más tensioactivos farmacéuticamente aceptables. El tensioactivo puede ser uno o más de polisorbato 20, polisorbato 80, otros ésteres de ácidos grasos de sorbitán, polietoxilatos y poloxámero 188. El anticuerpo puede comprender un primer resto de unión de un par de restos de unión afines. El anticuerpo puede ser específico para OPGL.

15 La presente invención también se refiere, en un segundo aspecto, a un liofilizado que después de la reconstitución proporciona una composición del primer aspecto.

En un tercer aspecto, la presente invención se refiere a un kit que comprende en uno o más envases una composición del primer aspecto e instrucciones con respecto al uso del mismo o un liofilizado del segundo aspecto e instrucciones con respecto al uso del mismo.

20 La presente invención también se refiere a una composición del primer aspecto para su uso en medicina.

En un aspecto adicional, la invención se refiere a un proceso para preparar una composición del primer aspecto que comprende eliminar el tampón residual usando un contraíón o mediante diafiltración contra una solución sin tampón que tiene un pH por debajo del pH deseado.

25 La presente invención también se refiere en un aspecto adicional a un proceso para preparar una composición del primer aspecto que comprende eliminar el tampón residual usando uno cualquiera o más de los siguientes en presencia de un contraíón: cromatografía de exclusión por tamaño, diálisis y/o filtración de flujo tangencial y/o cromatografía de intercambio iónico.

30 Breve descripción de las figuras

35 La Figura 1 representa los datos de titulación y la capacidad tampón en función de la concentración de tampones de acetato de sodio patrón en el intervalo de pH 5,0 a 4,0. El panel A es un gráfico que representa el cambio de pH tras la titulación ácido de varias concentraciones diferentes de un tampón de acetato de sodio patrón, como se describe en el Ejemplo 1. El pH se indica en el eje vertical. La cantidad de ácido añadido a cada solución se indica en el eje horizontal en microequivalentes de HCl añadidos por ml de solución ($\mu\text{Eq/ml}$). Las líneas de tendencia lineales de mínimos cuadrados se representan para cada conjunto de datos. Las concentraciones de acetato se indican en el recuadro. El panel B es un gráfico que representa la capacidad tampón de los tampones de acetato sobre el intervalo de pH ácido como se determina a partir de los datos de titulación representados en el panel A, como se describe en el Ejemplo 1. La capacidad tampón se indica en el eje vertical como microequivalentes de ácido por ml de solución tampón por unidad de cambio de pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). La concentración de acetato se indica en el eje horizontal en mM.

40 La Figura 2 representa los datos de titulación y la capacidad tampón en función de las concentraciones de tampones de acetato de sodio patrón en el intervalo de pH 5,0 a 5,5. El panel A es un gráfico que representa el cambio de pH tras la titulación base de varias concentraciones diferentes de un tampón de acetato de sodio patrón, como se describe en el Ejemplo 2. El pH se indica en el eje vertical. La cantidad de base añadida a cada solución se indica en el eje horizontal en microequivalentes de NaOH añadidos por ml de solución ($\mu\text{Eq/ml}$). Las líneas de tendencia lineales de mínimos cuadrados se representan para cada conjunto de datos. Las concentraciones de acetato se indican en el recuadro. El panel B es un gráfico que representa la capacidad tampón de los tampones de acetato sobre el intervalo de pH básico como se determina a partir de los datos de titulación representados en el panel A y descritos en el Ejemplo 2. La capacidad tampón se indica en el eje vertical como microequivalentes de base por ml de solución tampón por unidad de cambio de pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). La concentración de acetato se indica en el eje horizontal en mM.

55 La Figura 3 representa la determinación de la concentración de acetato en patrones de tampón de acetato, como se describe en el Ejemplo 3. El gráfico muestra una curva patrón para las determinaciones, con el área máxima

indicada en el eje vertical y la concentración de acetato indicada en el eje horizontal. Las cantidades nominales y las medidas de acetato en las soluciones utilizadas para la determinación empírica de la capacidad tampón se tabulan debajo del gráfico.

La figura 4 es un gráfico que representa el cambio de pH tras la titulación ácido de varias concentraciones diferentes de Ac-hOPGL en el intervalo de pH 5,0 a 4,0, como se describe en el Ejemplo 4. El pH se indica en el eje vertical. La cantidad de ácido añadido a las soluciones se indica en el eje horizontal en microequivalentes de HCl añadidos por ml de solución ($\mu\text{Eq/ml}$). Las líneas de tendencia lineales de mínimos cuadrados se representan para cada conjunto de datos. Las concentraciones de Ac-hOPGL se indican en el recuadro.

La figura 5 es un gráfico que representa el cambio de pH tras la titulación base de varias concentraciones diferentes de Ac-hOPGL en el intervalo de pH 5,0 a 6,0, como se describe en el Ejemplo 5. El pH se indica en el eje vertical. La cantidad de base añadida a las soluciones se indica en el eje horizontal en microequivalentes de NaOH añadidos por ml de solución ($\mu\text{Eq/ml}$). Las líneas de tendencia lineales de mínimos cuadrados se representan para cada conjunto de datos. Las concentraciones de Ac-hOPGL se indican en el recuadro.

La Figura 6 muestra los niveles de acetato residual en las soluciones de Ac-hOPGL utilizadas para determinar la capacidad tampón. El gráfico muestra la curva patrón utilizada para las determinaciones de acetato como se describe en el Ejemplo 6. Las concentraciones de acetato nominales y medidas experimentalmente en las soluciones se tabulan debajo del gráfico.

La Figura 7 es un gráfico que representa la capacidad tampón de Ac-hOPGL más o menos acetato residual en el intervalo de pH de 5,0 a 4,0. Los datos se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 7. La línea superior muestra la capacidad tampón de Ac-hOPGL con acetato residual. La línea inferior muestra la capacidad tampón de Ac-hOPGL ajustada para el acetato residual. El eje vertical indica la capacidad tampón en microequivalentes de ácido por ml de solución de Ac-hOPGL por unidad de pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). El eje horizontal indica la concentración de Ac-hOPGL en mg/ml. Las capacidades tampón de diferentes concentraciones de tampones de acetato patrón como se describe en el Ejemplo 1 se muestran como líneas horizontales. Las concentraciones de los tampones se indican sobre las líneas.

La Figura 8 es un gráfico que representa la capacidad tampón de Ac-hOPGL más o menos acetato residual en el intervalo de pH básico de 5,0 a 6,0. Los datos se obtuvieron como se describe en el Ejemplo 8. La línea superior representa la capacidad tampón de Ac-hOPGL con acetato residual. La línea inferior representa la capacidad tampón de Ac-hOPGL ajustada para el acetato residual. El eje vertical indica la capacidad tampón en microequivalentes de base añadidos por ml de solución tampón por unidad de pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). El eje horizontal indica la concentración de Ac-hOPGL en mg/ml. Las capacidades tampón de diferentes concentraciones de tampones de acetato de sodio patrón como se describe en el Ejemplo 2 se indican mediante líneas horizontales. Las concentraciones de acetato se indican sobre cada línea.

La Figura 9 representa, en un par de gráficas, el pH y estabilidad de Ac-hOPGL en formulaciones autotamponantes y tamponadas convencionalmente. El panel A representa la estabilidad de Ac-hOPGL autotamponado, Ac-hOPGL formulado en tampón de acetato y Ac-hOPGL formulado en glutamato en función del tiempo de almacenamiento a 4 °C durante un período de seis meses. El eje vertical indica la estabilidad de Ac-hOPGL en porcentaje de monómeros de Ac-hOPGL determinado por SE-HPLC. El tiempo de almacenamiento de acetato se indica en el eje horizontal. El panel B representa el pH de las mismas tres formulaciones medido durante el mismo período de tiempo. Las determinaciones de la estabilidad de la proteína y las mediciones de pH se describen en el Ejemplo 9.

La Figura 10 representa las curvas de titulación y las capacidades tampón para varias concentraciones de formulaciones de Ac-hB7RP1 autotamponantes en el intervalo de pH 5,0 a 4,0. El panel A muestra los datos de titulación. El pH se indica en el eje vertical. La cantidad de ácido añadido a las soluciones se indica en el eje horizontal en microequivalentes de HCl añadidos por ml de solución ($\mu\text{Eq/ml}$). Las líneas de tendencia lineales de mínimos cuadrados se representan para cada conjunto de datos. Las concentraciones de hB7RP1 se indican en el recuadro. El panel B representa las capacidades tampón de las formulaciones de Ac-hB7RP1. La línea superior muestra las capacidades tampón para las formulaciones, incluyendo la contribución del acetato residual. La línea inferior muestra las capacidades tampón para formulaciones después de restar la contribución del acetato residual basándose en determinaciones por SE-HPLC como se describe en el Ejemplo 3. Se muestran líneas de tendencia de mínimos cuadrados lineales para los dos conjuntos de datos. El eje vertical indica la capacidad tampón en microequivalentes de ácido por ml de solución tampón por unidad de pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). La concentración de Ac-hB7RP1 se indica en el eje horizontal en mg/ml. Las capacidades tampón de diferentes concentraciones de tampones de acetato de sodio patrón como se describe en el Ejemplo 1 se muestran con líneas horizontales discontinuas. La concentración de tampón de acetato se muestra debajo de cada línea. Los datos se obtuvieron como se describe en el Ejemplo de Referencia 1.

La Figura 11 representa las curvas de titulación y las capacidades tampón para varias concentraciones de formulaciones de Ac-hB7RP1 autotamponantes en el intervalo de pH 5,0 a 6,0. El panel A muestra los datos de titulación. El pH se indica en el eje vertical. La cantidad de base añadida a las soluciones se indica en el eje horizontal en microequivalentes de NaOH añadidos por ml de solución ($\mu\text{Eq/ml}$). Las líneas de tendencia lineales de mínimos cuadrados se representan para cada conjunto de datos. Las concentraciones de hB7RP1 se indican en el recuadro. El panel B representa las capacidades tampón de las formulaciones de Ac-hB7RP1. La línea superior muestra las capacidades tampón para las formulaciones que contienen acetato residual. La línea inferior muestra las capacidades tampón para formulaciones ajustadas para eliminar la contribución del acetato residual. Se muestran líneas de tendencia de mínimos cuadrados lineales para los dos conjuntos de datos. El eje vertical indica la capacidad tampón en microequivalentes de base por ml de solución tampón por unidad de pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). La concentración de Ac-hB7RP1 se indica en el eje horizontal en mg/ml. Las capacidades tampón de

diferentes concentraciones de tampones de acetato de sodio patrón como se describe en el Ejemplo 2 se muestran con líneas horizontales discontinuas. Las concentraciones de tampón de acetato se muestran debajo de cada línea. Los datos se obtuvieron como se describe en el Ejemplo de Referencia 2.

La Figura 12 representa la estabilidad de Ac-hB7RP1 en formulaciones de autotamponantes y tamponadas convencionalmente a 4 °C y 29 °C. El panel A representa la estabilidad de Ac-hB7RP1 autotamponado, Ac-hB7RP1 formulado en tampón de acetato y Ac-hB7RP1 formulado en glutamato en función del almacenamiento a 4 °C durante un período de seis meses. El eje vertical representa el monómero Ac-hB7RP1 en las muestras determinado por SE-HPLC. El tiempo se indica en el eje horizontal. El panel B representa la estabilidad de las mismas tres formulaciones en función del almacenamiento a 29 °C durante el mismo período de tiempo. Los ejes en el Panel B son los mismos que en el Panel A. Las determinaciones de la estabilidad de la proteína por HPLC-SE se describen en el Ejemplo de Referencia 3.

La Figura 13 representa la estabilidad del pH en formulaciones autotampón de Ac-hB7RP1 a 4 °C y 29 °C. El eje vertical indica pH. El tiempo, e semanas, se indica en el eje horizontal. Las temperaturas de los conjuntos de datos se indican en el recuadro. Los datos se obtuvieron como se describe en el Ejemplo de Referencia 4.

La Figura 14 representa la capacidad tampón de las formulaciones autotamponantes de Ac-hCD22 en función de la concentración de Ac-hCD22 en el intervalo de pH 4,0 a 6,0. El panel A representa las capacidades tampón de las formulaciones de Ac-hCD22 autotamponantes en función de la concentración de Ac-hCD22 en el intervalo de pH 4,0 a 5,0. El panel B representa las capacidades tampón de las formulaciones de Ac-hCD22 autotamponantes en función de la concentración en el intervalo de pH 5,0 a 6,0. En ambos paneles el eje vertical indica la capacidad tampón en microequivalentes de base por ml de solución tampón por unidad de pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$) y eje horizontal indica las concentraciones de Ac-hCD22 en mg/ml. Como referencia, la capacidad tampón de acetato de sodio 10 mM como se describe en el Ejemplo 1 se muestra en ambos paneles mediante una línea horizontal discontinua. Los resultados mostrados en la Figura se obtuvieron como se describe en el Ejemplo de Referencia 5.

La Figura 15 representa las curvas de titulación y las capacidades tampón para varias concentraciones de formulaciones de Ac-hIL4R autotamponantes en el intervalo de pH 5,0 a 4,0. El panel A muestra los datos de titulación. El pH se indica en el eje vertical. La cantidad de ácido añadido a las soluciones se indica en el eje horizontal en microequivalentes de HCl añadidos por ml de solución ($\mu\text{Eq/ml}$). Las líneas de tendencia lineales de mínimos cuadrados se representan para cada conjunto de datos. Las concentraciones de hIL4R se indican en el recuadro. El panel B representa las capacidades tampón de Ac-hIL4R en función de la concentración. La línea de tendencia lineal de mínimos cuadrados se muestra para el conjunto de datos. El eje vertical indica la capacidad tampón en microequivalentes de base por ml de solución tampón por unidad de pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). La concentración de Ac-hIL4R se indica en el eje horizontal en mg/ml. Las capacidades tampón de diferentes concentraciones de tampones de acetato de sodio patrón como se describe en el Ejemplo 1 se muestran con líneas horizontales discontinuas. Las concentraciones de tampón de acetato se muestran debajo de cada línea. Los datos se obtuvieron como se describe en el Ejemplo de Referencia 6.

La Figura 16 representa las curvas de titulación y las capacidades tampón para varias concentraciones de formulaciones de Ac-hIL4R autotamponantes en el intervalo de pH 5,0 a 6,0. El panel A muestra los datos de titulación. El pH se indica en el eje vertical. La cantidad de base añadida a las soluciones se indica en el eje horizontal en microequivalentes de NaOH añadidos por ml de solución ($\mu\text{Eq/ml}$). Las líneas de tendencia lineales de mínimos cuadrados se representan para cada conjunto de datos. Las concentraciones de hIL4R se indican en el recuadro. El panel B representa las capacidades tampón de Ac-hIL4R en función de la concentración. La línea de tendencia lineal de mínimos cuadrados se muestra para el conjunto de datos. El eje vertical indica la capacidad tampón en microequivalentes de base por ml de solución tampón por unidad de pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). La concentración de Ac-hIL4R se indica en el eje horizontal en mg/ml. Las capacidades tampón de diferentes concentraciones de tampones de acetato de sodio patrón como se describe en el Ejemplo 2 se muestran con líneas horizontales discontinuas. Las concentraciones de tampón de acetato se muestran debajo de cada línea. Los datos se obtuvieron como se describe en el Ejemplo de Referencia 7.

La Figura 17 representa Ac-hIL4R y la estabilidad del pH en formulaciones tamponadas con acetato y autotamponadas de Ac-hIL4R a 37 °C en función del tiempo. El panel A es un gráfico de barras que muestra la estabilidad de Ac-hIL4R durante cuatro semanas a 37 °C. El eje vertical indica estabilidad en porcentaje de Ac-hIL4R monomérico como se determina por SE-HPLC. El eje horizontal indica el tiempo de almacenamiento en semanas. El inserto identifica los datos para el acetato y para las formulaciones autotamponadas. El panel B muestra la estabilidad del pH de las mismas formulaciones para las mismas condiciones y períodos de tiempo. El pH se indica en el eje vertical. El tiempo de almacenamiento en semanas se indica en el eje horizontal. Los datos para el acetato y las formulaciones autotamponadas se indican en el recuadro. Los datos se obtuvieron como se describe en el Ejemplo de Referencia 8.

Glosario

Los significados atribuidos a diferentes términos y frases como se usan en el presente documento se explican de forma ilustrativa a continuación.

"Un/una" o "unos/unas" en el presente documento significa "al menos uno/a"; "uno/a o más de uno/a".

"Aproximadamente", a menos que se indique lo contrario explícitamente en el presente documento, significa $\pm 20\%$. Por ejemplo, aproximadamente 100 en el presente documento significa de 80 a 120, aproximadamente 5 significa de

4 a 6, aproximadamente 0,3 significa de 0,24 a 0,36 y aproximadamente 60 % significa de 48 % a 72 % (no de 40 % a 80 %).

5 "Agonista(s)" significa en el presente documento una entidad molecular que es diferente de un ligando estimulante correspondiente pero que tiene el mismo efecto estimulante. Por ejemplo (aunque los agonistas funcionan a través de otros mecanismos), para una hormona que estimula una actividad al unirse a un receptor hormonal correspondiente, un agonista es una entidad químicamente diferente que se une al receptor hormonal y estimula su actividad.

10 "Antagonista(s)" significa en el presente documento una entidad molecular que es diferente de un ligando estimulante correspondiente y tiene un efecto opuesto. Por ejemplo (aunque los antagonistas funcionan a través de otros mecanismos), un tipo de antagonista de una hormona que estimula una actividad al unirse a un receptor hormonal correspondiente es una entidad química que es diferente de la hormona y se une al receptor hormonal pero no estimula la actividad generada por la unión de la hormona, y mediante esta acción inhibe la actividad efectora de la hormona.

15 "Anticuerpo(s)" se usa en el presente documento de acuerdo con su significado habitual en las técnicas bioquímicas y biotecnológicas.

20 Entre los anticuerpos dentro del significado del término tal como se usa en el presente documento, se encuentran los aislados de fuentes biológicas, incluyendo los anticuerpos monoclonales y policlonales, los anticuerpos preparados mediante técnicas de ADN recombinante (también denominados en ocasiones, en el presente documento, anticuerpos recombinantes), incluyendo los preparados por procesos que implican la activación de un gen endógeno y los que implican la expresión de una construcción de expresión exógena, incluyendo los anticuerpos preparados en cultivo celular y los preparados en plantas y animales transgénicos, y los anticuerpos preparados mediante métodos que implican síntesis química, incluyendo la síntesis y la semisíntesis de péptidos. También dentro del alcance del término tal como se usa en el presente documento, excepto que se establezca explícitamente lo contrario, están los anticuerpos quiméricos y los anticuerpos híbridos, entre otros.

30 El anticuerpo prototípico es una glicoproteína tetramérica compuesta por dos dímeros de cadena ligera-cadena pesada idénticos unidos entre sí por enlaces disulfuro. Existen dos tipos de cadenas ligeras en vertebrados, kappa y lambda. Cada cadena ligera comprende una región constante y una región variable. Las dos cadenas ligeras se distinguen por secuencias de región constante. Existen cinco tipos de cadenas pesadas en vertebrados: alfa, delta, épsilon, gamma y mu. Cada cadena pesada comprende una región variable y tres regiones constantes. Los cinco tipos de cadena pesada definen cinco clases de anticuerpos en vertebrados (isotipos): IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Cada isotipo está compuesto por, respectivamente, (a) dos cadenas pesadas alfa, delta, épsilon, gamma o mu, y (b) dos cadenas ligeras kappa o dos lambda. Las cadenas pesadas en cada clase se asocian con ambos tipos de cadenas ligeras; pero, las dos cadenas ligeras en una molécula dada son ambas kappa o ambas lambda. IgD, IgE e IgG generalmente se producen como glucoproteínas heterotetraméricas "libres". IgA e IgM generalmente se producen en complejos que comprenden heterotetrámeros de varios IgA o varios IgM asociados con un polipéptido de cadena "J". Algunos isotipos de vertebrados se clasifican en subclases, que se distinguen entre sí por las diferencias en las secuencias de la región constante. Existen cuatro subclases de IgG humana, IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y dos subclases de IgA, IgA1e IgA2, por ejemplo. Todos estos y otros no descritos de manera específica anteriormente están incluidos en el significado del término "anticuerpo(s)" como se usa en el presente documento.

45 El término "anticuerpo(s)" incluye además variantes de secuencia de aminoácidos de cualquiera de los anteriores como se describe adicionalmente en otra parte en el presente documento.

50 "Derivado de anticuerpo" como se usa en el presente documento significa cualquier proteína producida a partir de un anticuerpo, y cualquier proteína de un diseño basado en un anticuerpo. La expresión incluye en su significado proteínas producidas usando la totalidad o parte de un anticuerpo, aquellas que comprenden la totalidad o parte de un anticuerpo, y aquellas diseñadas en su totalidad o en parte basándose en la totalidad o parte de un anticuerpo. Las proteínas "derivadas de anticuerpos" incluyen, pero sin limitación, fragmentos Fc, Fab y Fab₂ y proteínas que comprenden los mismos, fragmentos del dominio V_H y del dominio V_L y proteínas que comprenden los mismos, otras proteínas que comprenden una región variable y/o una constante de un anticuerpo, en su totalidad o en parte, intracuerpos, maxicuerpos, minicuerpos, diacuerpos de scFv(s), variantes de secuencia de aminoácidos de los anteriores, y una variedad de otras moléculas de este tipo, que incluyen pero sin limitación a otras descritas en otra parte en el presente documento.

60 "Relacionado con el anticuerpo", como se usa en el presente documento, significa cualquier proteína o mimético que se asemeja en su estructura, función o diseño a un anticuerpo o cualquier parte de un anticuerpo. Entre las proteínas "relacionadas con anticuerpos" como se usa el término en el presente documento están las proteínas "derivadas de anticuerpos" como se describe anteriormente. Cabe señalar que los términos "derivados de anticuerpos" y "relacionados con anticuerpos" se solapan sustancialmente; ambos términos se aplican a muchas de esas proteínas. Ejemplos de proteínas "relacionadas con anticuerpos", sin implicar limitación a este respecto, son pepticuerpos y recepticuerpos. Otros ejemplos de proteínas "relacionadas con anticuerpos" se describen en otra parte en el presente documento.

65

"Polipéptido(s) de anticuerpo" como se usa en el presente documento, excepto que se indique lo contrario, significa un polipéptido que es parte de un anticuerpo, tal como un polipéptido de cadena ligera, un polipéptido de cadena pesada y un polipéptido de cadena J, por mencionar algunos ejemplos, que incluyen entre otros fragmentos, derivados y variantes de los mismos, y polipéptidos relacionados.

5 "Alrededor de" a menos que se indique lo contrario significa lo mismo que aproximadamente.

10 "Resto(s) de unión" significa una parte de una molécula o un complejo de moléculas que se une específicamente a parte de otra molécula o complejo de moléculas. El resto de unión puede ser igual o diferente de la parte de la molécula o complejo de moléculas a las que se une. El resto de unión también puede ser toda una molécula o complejo de moléculas.

15 "Se une específicamente" se usa en el presente documento de acuerdo con su significado habitual en las técnicas y significa, excepto que se indique lo contrario, que la unión es más fuerte con determinados restos específicos que con otros restos en general, que es más fuerte que la unión inespecífica que se puede producir con una amplia variedad de restos, y que la unión es selectiva para determinados restos y no se produce con tanta intensidad con otros. En el caso extremo de la unión específica, se produce una unión muy fuerte con un solo tipo de resto, y no hay unión no específica con ningún otro resto.

20 "Administrar conjuntamente" significa una administración de dos o más agentes en conjunto entre sí, incluyendo la administración simultánea y/o secuencial.

25 "Afin o afines" en el presente documento significa complementario, que encajan, coincidentes, tal como, por ejemplo, dos rompecabezas que encajan entre sí, el mecanismo del cilindro de una cerradura y la llave que lo abre, el sitio de unión del sustrato de una enzima y el sustrato de la enzima y una diana y una proteína de unión a la diana que se une específicamente a la misma.

30 "Restos de unión afines" en el presente documento significa restos de unión que se unen específicamente entre sí. Generalmente, pero no siempre, significa un par de restos de unión que se unen específicamente entre sí. Los restos responsables de la unión altamente selectiva de un ligando y receptor de ligando específicos proporcionan un ejemplo ilustrativo de restos de unión afines. Otro ejemplo lo proporcionan los restos que se unen a un antígeno y un anticuerpo.

35 "Composición" significa cualquier composición de materia que comprende uno o más constituyentes, tal como una formulación.

"Compuesto por es sinónimo de" que comprende "(véase a continuación).

40 "Que comprende" significa que incluye, sin más calificación, limitación o exclusión en cuanto a qué más se puede o no incluir. Por ejemplo, "una composición que comprende x e y" significa cualquier composición que contiene x e y, no importa qué más pueda contener. De manera análoga, "un método que comprende x" es cualquier método en que se realiza x, no importa qué más pueda producirse.

45 "Concentración" se usa en el presente documento de acuerdo con su significado bien conocido en la técnica para indicar la cantidad de un artículo en una cantidad dada de una mezcla que contiene el artículo, generalmente expresada como una relación. Por ejemplo, la concentración de un soluto, tal como una proteína en una solución, se puede expresar de muchas maneras, tal como (pero sin limitación: (A) Porcentaje en peso (i) = peso del soluto por 100 unidades de volumen de disolvente; (B) Porcentaje en peso (ii) = peso del soluto por 100 unidades de peso total; (C) Porcentaje en peso (iii) = peso del soluto por 100 unidades de disolvente en peso; (D) Porcentaje en masa = masa de soluto por 100 unidades de masa de solución; (E) Fracción molar = moles de soluto por moles totales de todos los componentes; (F) Molaridad = moles de soluto por litro de solución (es decir, soluto más disolvente); (G) Molalidad = moles de soluto por Kg de disolvente; y (H) Molalidad en volumen = moles de soluto por litro de disolvente.

55 "Región(es) de control" se usa en el presente documento de acuerdo con su significado bien conocido en la técnica, y salvo que se indique lo contrario, se refiere a regiones en el ADN o proteínas que son responsables de controlar una o más funciones o actividades de las mismas. Por ejemplo, "región de control de la expresión" con referencia al control de la expresión génica, significa las regiones en el ADN que se necesitan para que la transcripción se produzca correctamente y que están implicadas en la regulación de cuándo se produce la transcripción, cómo de eficientemente se produce, cuándo se detiene, y similares.

60 "De novo" se usa en el presente documento de acuerdo con su significado habitual en la técnica, para denotar algo hecho de nuevo. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos *de novo* es aquella que no deriva de una secuencia de aminoácidos de origen natural, aunque, tal secuencia *de novo* puede tener similitudes con una secuencia de origen natural. Las secuencias de aminoácidos de novo se pueden generar, por ejemplo, mediante un diseño *a priori*, mediante métodos combinatorios, mediante métodos de selección. Se pueden preparar, por ejemplo, por síntesis químicas, por síntesis y por una variedad de técnicas de ADN recombinante, todas ellas son bien conocidas por los expertos en la materia.

- "Perjudicial" significa, como se usa en el presente documento, nocivo. A modo de ilustración, los procesos "perjudiciales" incluyen, por ejemplo, efectos nocivos de procesos de enfermedad y efectos secundarios nocivos de los tratamientos.
- 5 "Derivado(s)" se usa en el presente documento para indicar derivado de, en sustancia, forma o diseño, tal como, por ejemplo, un polipéptido que se basa en pero difiere de un polipéptido de referencia, por ejemplo, por alteraciones en su secuencia de aminoácidos, por fusión a otro polipéptido, o por modificación covalente.
- 10 "Enfermedad(es)", una patología, una afección que afecta perjudicialmente la salud de un sujeto.
- "Trastorno(s)" una amenaza, una afección que altera perjudicialmente la salud. "Disfunción" significa, como se usa en el presente documento, un trastorno, enfermedades o efecto perjudicial de un proceso normal.
- 15 "Cantidad eficaz" generalmente significa una cantidad que proporciona el efecto local o sistémico deseado. Por ejemplo, una cantidad eficaz es una cantidad suficiente para lograr un resultado clínico beneficioso o deseado. La cantidad eficaz puede proporcionarse toda de una vez en una única administración o en cantidades fraccionadas que proporcionan la cantidad eficaz en varias administraciones. La determinación precisa de lo que se consideraría una cantidad eficaz puede basarse en factores individuales para cada sujeto, incluyendo su tamaño, edad, lesión y/o enfermedad o lesión a tratar y la cantidad de tiempo desde que se ha producido la lesión o ha empezado la enfermedad. Un experto en la materia también será capaz de determinar la cantidad eficaz para un sujeto dado basándose en estas consideraciones que son habituales en la técnica. Como se usa en el presente documento, "dosis eficaz" significa lo mismo que "cantidad eficaz".
- 20 "Ruta eficaz" generalmente significa una ruta que proporciona el suministro de un agente a un compartimento, sistema o localización deseados. Por ejemplo, una ruta eficaz es una a través de la que puede administrarse un agente para proporcionar en el sitio deseado de acción una cantidad del agente suficiente para efectuar un resultado clínico beneficioso o deseado.
- 25 "Endógeno" (tal como gen endógeno) se usa en el presente documento para referirse a, por ejemplo, genes y otros aspectos del ADN, tales como regiones de control, que son de origen natural en un genoma y organismo, a menos que se indique lo contrario.
- 30 Exógeno "(tal como gen exógeno), a menos que se indique lo contrario, se usa en el presente documento en general para indicar, por ejemplo, ADN de una fuente externa, tal como ADN introducido en una célula e incorporado en su genoma.
- 35 "FBS" significa suero fetal bovino.
- 40 "Formulación(es)" significa una combinación de al menos un principio activo con uno o más ingredientes diferentes para uno o más usos particulares, tales como almacenamiento, procesamiento adicional, venta y/o administración a un sujeto, tal como, por ejemplo, administración a un sujeto de un agente específico en una cantidad específica, por una ruta específica, para tratar una enfermedad específica.
- 45 "Fragmento(s)" en el presente documento significa parte de una entidad más grande, tal como una parte de una proteína; por ejemplo, un polipéptido que consiste en menos de la secuencia de aminoácidos completa de un polipéptido más grande. Como se usa en el presente documento, el término incluye fragmentos formados por eliminación terminal y fragmentos formados por eliminación interna, incluyendo aquellos en los que dos o más porciones no contiguas de un polipéptido se unen entre sí para formar un polipéptido más pequeño, que es un fragmento del original.
- 50 "Proteína(s) de fusión" en el presente documento significa una proteína formada fusionando la totalidad o parte de dos polipéptidos, que pueden ser iguales o diferentes. Las proteínas de fusión típicas se producen mediante técnicas de ADN recombinante, mediante la unión de extremo a extremo de nucleótidos que codifican los dos (o más) polipéptidos.
- 55 "Modificado por ingeniería genética" en el presente documento significa producido usando un proceso intencionado de alteración genética, tal como por tecnología de ADN recombinante, métodos clásicos de manipulación genética, métodos químicos, una combinación de los tres u otros métodos.
- 60 "Homólogo(s)" en el presente documento significa tener homología con otra entidad, tal como una proteína que es homóloga a otra proteína. Homólogo significa asemejarse en estructura o en función.
- "Ionización" en el presente documento significa el cambio de la carga neta en una sustancia por al menos una, incluyendo la pérdida o ganancia de carga, tal como la ionización del ácido acético en solución de pH bajo, de HOAc a OAc⁻ y H⁺.
- 65

"k" en el presente documento denota un coeficiente de equilibrio, de acuerdo con su significado convencional en química.

5 "k_a" en el presente documento denota la constante de disociación de un hidrógeno particular de una molécula, de acuerdo con su significado convencional en química, tal como, por ejemplo, la constante de disociación del hidrógeno ácido del ácido acético.

10 "k_d" en el presente documento denota una constante de disociación de un par de entidades (o restos) químicas, de acuerdo con su significado convencional en química.

Kit "significa una colección de artículos usados juntos para un propósito o propósitos dados.

15 "Ligando(s)" en el presente documento significa una entidad molecular que se une selectivamente y estequiométricamente a uno o más sitios específicos en otras entidades moleculares diferentes. La unión generalmente no es covalente, pero también puede ser covalente. Unos pocos ejemplos, entre muchos otros, son (a) antígenos, que generalmente se unen de forma no covalente a los sitios de unión en anticuerpos afines; (b) hormonas, que generalmente se unen a receptores hormonales, de forma no covalente; (c) lectinas, que se unen a azúcares específicos, de forma no covalente; (d) biotinas, que se unen a múltiples sitios en la avidina y otras proteínas tipo avidina, de forma no covalente; (e) antagonistas hormonales, que se unen a los receptores hormonales e inhiben su actividad y/o la de la hormona correspondiente; y (f) agonistas hormonales, que se unen de manera similar a los receptores hormonales pero estimulan su actividad.

20 "Resto(s) de unión a ligando" en el presente documento significa una entidad molecular que se une a un ligando, generalmente, una parte de una entidad molecular más grande que se une al ligando, o una entidad molecular derivada de la misma.

"Proteína(s) de unión a ligando" en el presente documento significa una proteína que se une a un ligando.

30 "Resto(s) de ligando" en el presente documento significa una entidad molecular que se une a una entidad molecular de unión a ligando de la misma manera que el ligando correspondiente. Un resto de ligando puede ser todo un ligando, o parte de él, derivado de un ligando, o generado *de novo*. Generalmente, sin embargo, el resto de ligando es más o menos exclusivamente el elemento del mismo que se une a las correspondientes entidades de unión al ligando. El resto ligando no necesita comprender, y el término generalmente no lo denota, características estructurales distintas de las necesarias para la unión del ligando.

35 "mEq" en el presente documento significa miliequivalente(s).

"μEq" en el presente documento significa microequivalente(s).

40 "Mimético(s)" en el presente documento significa una entidad química con características estructurales o funcionales de otra entidad química, generalmente no relacionada. Por ejemplo, un tipo de mimético hormonal es una molécula orgánica no peptídica que se une al receptor correspondiente de la misma manera que la hormona correspondiente.

45 "mM" significa milimolar; 10⁻³ moles por litro.

50 "Proteína(s) modificada(s)", "polipéptido(s) modificado(s)", o "fragmento(s) modificado(s)" en el presente documento significa una proteína o un polipéptido o un fragmento de una proteína o polipéptido que comprende un resto químico (estructura) distinto de los del veinte aminoácidos de origen natural que forman proteínas de origen natural. Las modificaciones con mayor frecuencia se unen de forma covalente, pero también se pueden unir de forma no covalente a una proteína u otro polipéptido, tal como un fragmento de una proteína.

55 "Resto(s)" en el presente documento significa una entidad molecular que representa una estructura y/o función específica, sin componentes extraños. Por ejemplo, en la mayoría de los casos, solamente una pequeña parte de una proteína de unión a ligando es responsable de la unión a ligando. Esta parte de la proteína, si está codificada de forma continua o de forma discontinua, es un ejemplo de un resto de unión a ligando.

"De origen natural" significa en la naturaleza, sin intervención humana.

60 "De origen no natural" significa que no se produce en la naturaleza o, si se produce en la naturaleza, no está en su estado, ambiente, circunstancias o similares de origen natural.

"PBS" significa solución salina tamponada con fosfato.

65 "Peptidocuerpo" se refiere a una molécula que comprende un dominio Fc de anticuerpo (es decir, dominios de anticuerpos C_H2 y C_H3) que excluye los dominios de anticuerpos C_H1, C_L, V_H y V_L, así como Fab y F(ab)₂, en donde el dominio Fc está unido a uno o más péptidos, preferentemente a un péptido farmacológicamente activo,

particularmente, preferentemente a un péptido farmacológicamente activo generado aleatoriamente. La producción de peptidocuerpos se describe de forma general en la publicación PCT WO00/24782, publicada el 4 de mayo de 2000, particularmente en cuanto a la estructura, síntesis, propiedades y usos de los peptidocuerpos.

5 "Péptido(s)" en el presente documento significa lo mismo que polipéptido; a menudo, pero no necesariamente, se usa en referencia a un polipéptido relativamente corto,

"pH" se usa de acuerdo con su definición bien conocida y universal como sigue:

10
$$\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+].$$

"Producto farmacéutico", como se usa en el presente documento, significa que es aceptable para su uso en un sujeto humano o no humano para el tratamiento del mismo, particularmente para su uso en seres humanos, y aprobado para ello por una autoridad reguladora facultada para regular el uso del mismo tal como, por ejemplo, la Food and Drug Administration en los Estados Unidos, la European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, el Japan's Ministry of Health, Labor and Welfare, u otra agencia reguladora como las enumeradas en R. Ng, DRUGS: FROM DISCOVERY TO APPROVAL, Wiley-Liss (Hoboken, NJ) (2004) particularmente en cuanto a las autoridades reguladoras relacionadas con la aprobación de fármacos, especialmente las enumeradas en el Capítulo 7. Como se usa en el presente documento, la frase "en donde la composición ha sido aprobada para uso farmacéutico por una autoridad legalmente facultada para otorgar dicha aprobación" significa una entidad o institución o similar, establecida por ley y encargada por ley de la responsabilidad y el poder de regular y aprobar el uso de fármacos para su uso en seres humanos, y en algunos casos, en no humanos. La aprobación de cualquiera de estas agencias en cualquier parte cumple con esta calificación. No es necesario que la agencia de aprobación sea la del estado en el que, por ejemplo, se está cometiendo una infracción. Ejemplos de tales entidades incluyen la Food and Drug Administration de los EE. UU. y las otras agencias enumeradas en el presente documento anteriormente.

Como se usa en el presente documento, "producto farmacéutico" también puede referirse a un producto producido de acuerdo con las buenas prácticas de fabricación, tales como los descritos en, entre otros, el Capítulo 9 y el Capítulo 10, de R. Ng, DRUGS: FROM DISCOVERY TO APPROVAL, Wiley-Liss (Hoboken, NJ) (2004) particularmente en las partes pertinentes a las buenas prácticas de fabricación para formulaciones de proteínas farmacéuticas, en particular, como se establece en los Capítulos 9 y 10.

"Farmacéuticamente aceptable" se usa en el presente documento de acuerdo con su significado bien conocido en la técnica para denotar lo que es aceptable para uso médico o veterinario, preferentemente para uso médico en seres humanos, particularmente aprobado para dicho uso por la Food and Drug Administration de los EE. UU. u otra autoridad como se describe anteriormente con respecto al significado de "producto farmacéutico".

"Polipéptido(s)" véase "Proteína(s)".

40 "Precursor(es)" se usa en el presente documento de acuerdo con su significado bien conocido en la técnica para denotar una entidad de la que deriva otra entidad. Por ejemplo, una proteína precursora es una proteína que se somete a procesamiento, tal como escisión o modificación proteolítica, dando lugar, de este modo, a otra proteína precursora (que se someterá a un procesamiento adicional) o a una proteína madura.

45 "Proteína(s)" en el presente documento significa un polipéptido o un complejo de polipéptidos, de acuerdo con su significado bien conocido en la técnica. Como se usa en el presente documento, "proteína(s)" incluye tanto polipéptidos de cadena lineal como ramificados. Incluye polipéptidos no modificados y modificados, incluyendo las modificaciones de origen natural y las que no son de origen natural. Dichas modificaciones incluyen modificaciones químicas de los extremos, de la cadena principal del péptido y las cadenas laterales de aminoácidos; sustituciones, eliminaciones y adiciones de aminoácidos; e incorporación de aminoácidos inusuales y otros restos, por nombrar solo algunas de esas modificaciones. También incluye polipéptidos "modificados por ingeniería" y complejos de los mismos, tal como, pero sin limitación, cualquier polipéptido o complejo de polipéptidos que ha sido alterado de manera intencionada en su estructura por, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante, síntesis química y/o modificación covalente, incluyendo alteración intencionada de la secuencia de aminoácidos y/o modificaciones postraduccionales.

55 "Protonación" significa la adición de al menos un hidrógeno.

"Autotamponante" significa la capacidad de una sustancia, tal como una proteína farmacéutica, para resistir el cambio en el pH suficiente para una aplicación dada, en ausencia de otros tampones.

60 "Semi-de *nov*o" en el presente documento significa (a) parcialmente diseñado de acuerdo con una referencia particular y/o producido a partir de un precursor, y (b) parcialmente diseñado sin referencia a una referencia particular (tal como diseñado únicamente por principios generales y no basado en ninguna referencia particular). Por ejemplo, un polipéptido hecho produciendo un primer péptido en un sistema de expresión bacteriano, produciendo un segundo péptido por síntesis química, y uniendo después los dos péptidos entre sí para formar el polipéptido.

"Semisíntesis" significa, como se usa en el presente documento, una combinación de métodos de síntesis químicos y no químicos.

5 "Sujeto" significa un vertebrado, tal como un mamífero, tal como se un ser humano. Los mamíferos incluyen, pero sin limitación, seres humanos, animales de granja, animales de deporte y mascotas. Los sujetos que necesitan tratamiento por métodos y/o composiciones de la presente invención incluyen aquellos que padecen un trastorno, disfunción o enfermedad, o un efecto secundario de los mismos, o un efecto secundario de un tratamiento de los mismos.

10 "Sustancialmente" se usa en el presente documento de acuerdo con su definición simple y corriente que significa en gran medida o grado. Por ejemplo, sustancialmente completo significa completo en gran medida, completo en gran grado. A modo de ilustración adicional, sustancialmente sin restos significa en gran medida sin restos, sin restos en gran grado. Si se requiere precisión numérica, dependiendo del contexto, "sustancialmente", como se usa en el presente documento significa, al menos, el 80 % o más, particularmente el 90 % o más, muy particularmente el 95 % o más.

15 "Terapéuticamente eficaz" se usa en el presente documento de acuerdo con su significado bien conocido en la técnica para denotar aquello que logra una mejora en el pronóstico o la afección de un sujeto o que de otro modo logra un objetivo terapéutico, incluyendo, por ejemplo, una reducción en el tasa de progreso de una enfermedad, incluso si la afección de un sujeto, no obstante, continúa deteriorándose.

20 "Cantidad terapéuticamente eficaz" generalmente se usa para calificar la cantidad de un agente para abarcar aquellas cantidades que logran una mejora en la gravedad del trastorno. Por ejemplo, los agentes terapéuticos neoplásicos eficaces prolongan la capacidad de supervivencia del sujeto, inhiben el crecimiento celular que prolifera rápidamente asociado con la neoplasia, o efectúan una regresión de la neoplasia. Los tratamientos que son terapéuticamente eficaces dentro del significado de la expresión como se usa en el presente documento, incluyen tratamientos que mejoran la calidad de vida de un sujeto incluso si no mejoran el resultado de la enfermedad *per se*.

25 "Tratar "que trata" o "tratamiento" se usan ampliamente en relación con la invención y cada uno de estos términos abarca, entre otros, prevención, mejora, inhibición o cura de una deficiencia, disfunción, enfermedad u otro proceso perjudicial, incluyendo los que interfieren con y/o son el resultado de una terapia.

30 "Variante(s)" en el presente documento significa una versión de origen natural o sintético de, por ejemplo, una proteína que es estructuralmente diferente de la original pero está relacionada en estructura y/o función, tal como una variante alélica, un parólogo o un homólogo de una proteína.

35 Descripción de la invención

40 La invención proporciona por primera vez formulaciones de proteínas autotamponantes, particularmente formulaciones de proteínas biofarmacéuticas, métodos para preparar las formulaciones y métodos para usar las formulaciones, entre otras cosas. Cualquier proteína que proporcione suficiente capacidad tampón dentro del intervalo de pH necesario a una concentración adecuada para su uso previsto puede prepararse como una formulación de proteínas autotamponantes de acuerdo con la invención. La invención se puede practicar con una variedad de proteínas, incluyendo tanto las proteínas de origen natural como las proteínas "modificadas por ingeniería genética", particularmente las proteínas biofarmacéuticas, como se analiza más adelante a continuación.

45 La utilidad de las proteínas, particularmente las proteínas biofarmacéuticas, para formularse en composiciones autotamponantes, particularmente composiciones farmacéuticamente aceptables, no se había reconocido antes de la invención divulgada en el presente documento. La influencia de las proteínas en la regulación del pH fisiológico ha sido reconocida y estudiada durante algún tiempo. Sin embargo, hasta ahora no se ha reconocido que las proteínas, particularmente las proteínas biofarmacéuticas, puede tener suficiente capacidad tampón para mantener una formulación dentro de un intervalo de pH deseado, sin agentes tamponantes adicionales.

50 Las proteínas biofarmacéuticas para su uso en los Estados Unidos se formulan como soluciones tamponadas, soluciones no tamponadas, suspensiones amorfas o cristalinas y liofilizados.

55 La mayoría de las formulaciones de soluciones tamponadas usan un agente tamponante convencional. Dos proteínas, Pulmozyme® y Humulin®, están formuladas como soluciones sin agentes tamponantes convencionales. Ninguna de estas proteínas proporciona una capacidad autotamponante sustancial en las formulaciones.

60 Pulmozyme® tiene un peso molecular de aproximadamente 37.000 Daltons y contiene 5 histidinas, 22 ácidos aspárticos y 12 ácidos glutámicos, entre sus 260 aminoácidos. La capacidad tamponante de la proteína dentro de 0,5 unidades de pH de pH 6,3 está determinada sustancialmente por su contenido de histidina. Basándose en esto, el límite superior de la capacidad autotamponante de la formulación está determinado por la concentración eficaz de los restos de histidina, 0,15 mM. La concentración molar de ácido aspártico y ácido glutámico en la formación es de 0,9 mM. La concentración molar total de los tres aminoácidos juntos, por lo tanto, es un poco más de 1 mM, a la concentración de la formulación.

Humulin® se formula a 3,5 g/ml. Tiene un peso molecular de aproximadamente 6.000 Daltons y contiene 2 ácidos aspárticos, 8 ácidos glutámicos y 2 histidinas. Ninguno de estos aminoácidos es un tampón particularmente eficaz al pH de la formulación: 7,0 a 7,8. A esta concentración, la concentración molar de histidinas, que están más cercanas en pK_a al pH de la formulación, es 1,16 mM.

Los liofilizados biofarmacéuticos se reconstituyen antes de su uso formando soluciones o suspensiones. La mayoría de los liofilizados contienen tampones convencionales que mantienen el pH adecuado de las formulaciones reconstituidas. Algunos otros, en los que la concentración de proteínas es baja o el pH debe ser bajo (menos de 3) o alto (mayor de 9,5), no están tamponados de manera eficaz.

Por lo tanto, el tamponamiento se logra en las formulaciones actuales de proteínas biofarmacéuticas utilizando agentes tamponantes convencionales. La capacidad de las proteínas por sí mismas para tamponar las formulaciones de proteínas farmacéuticas no se ha apreciado completamente y no se ha utilizado para la fabricación de productos farmacéuticos de proteínas.

La determinación de la capacidad tampón de proteínas, generalmente, es importante para desarrollar formulaciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con la invención. Relacionado con esto, se describen a continuación los métodos para medir la capacidad tampón y para determinar la capacidad tampón de las proteínas. Para permitir una fácil comparabilidad de los datos, la capacidad tampón de las proteínas debe expresarse en unidades comparables y/o relacionada con un patrón de tampón. Por consiguiente, la siguiente sección describe las métricas y patrones de pH que cumplen con estos requisitos, de acuerdo con la invención.

1. Tamponamiento

Una definición ampliamente aceptada de tamponamiento es la resistencia al cambio en el pH de una composición tras la adición de ácido o base. La capacidad tampón, por lo tanto, con frecuencia se define como la capacidad de una composición para resistir el cambio de pH.

Generalmente, la capacidad tampón se expresa en términos de la cantidad de ácido o base fuerte necesaria para cambiar el pH de una composición en una cantidad dada. Van Slyke proporcionó la medida cuantitativa más ampliamente utilizada de la capacidad tampón, según la cual, para una solución, la capacidad tampón se expresa como la cantidad de ácido o base fuerte necesaria para cambiar el pH de un litro de la solución en una unidad de pH en condiciones naturales de temperatura y presión.

De acuerdo con esta medición, por ejemplo, la capacidad tampón de 1 litro de HOAc 5 mM, NaOAc 5 mM, pH 4,76 en agua pura es $4,09 \times 10^{-3}$ moles de una base fuerte univalente (es decir, $4,09 \times 10^{-3}$ equivalentes de base), que se puede calcular como sigue.

La ecuación de Henderson-Hasselbalch para la solución es:

$$\text{pH} = \log \{ \text{NaOAc [5 mM]}/\text{HOAc [5 mM]} \} + 4,76$$

Por consiguiente, la concentración, X, de una base fuerte univalente necesaria para aumentar el pH de este tampón es:

$$\text{de } 4,76 \text{ a } 5,76 \text{ es } 5,76 = \log \{ \text{NaOAc [5 mM + X mM]}/\text{HOAc [5 mM - X mM]} \} + 4,76$$

Por lo tanto:

$$1,00 = \log \{ \text{NaOAc [5 mM + X mM]}/\text{HOAc [5 mM - X mM]} \}$$

$$10,0 = \text{NaOAc [5 mM + X mM]}/\text{HOAc [5 mM - X mM]}$$

$$55 \quad 10,0 = (5 \text{ mM} + X \text{ mM})/(5 \text{ mM} - X \text{ mM})$$

$$50 \text{ mM} - 10X \text{ mM} = 5 \text{ mM} + X \text{ mM}$$

$$60 \quad 11X \text{ mM} = 45 \text{ mM}$$

X = 4,09 mM,
que, para rendimientos de un litro:

$$(4,09 \times 10^{-3} \text{ moles/litro}) (1 \text{ litro}) (1 \text{ equivalente/mol}) = 4,09 \times 10^{-3} \text{ equivalentes}$$

Por lo tanto, de acuerdo con esta medición, la capacidad tampón de 1 litro de un tampón de acetato 10 mM que contiene NaOAc 5 mM y HOAc 5 mM a un pH de 4,76 en agua pura es $4,09 \times 10^{-3}$ equivalentes de base por litro por

unidad de pH. Dicho de otra forma, la capacidad tampón de la solución es de 4,09 miliequivalentes de base por litro por unidad de pH, 4,09 microequivalentes de base por mililitro por unidad de pH, 0,409 microequivalentes de base por 100 microlitros por unidad de pH, 40,9 nanomoles de base por 10 microlitros por unidad de pH, y 4,09 nanomoles de base por microlitro por unidad de pH.

El mismo cálculo produce la siguiente capacidad tampón para otras concentraciones de este tampón de acetato a pH 4,76. Un tampón de acetato 2 mM como el anterior tiene una capacidad tampón de 0,818 mEq por litro por unidad de pH. A 4 mM, la capacidad tampón es 1,636 mEq por litro por unidad de pH. La capacidad a 5 mM es 2,045 mEq por litro por unidad de pH. A 7,5 mM, la capacidad es de 3,068 mEq por litro por unidad de pH. A 10 mM, el tampón de acetato tiene una capacidad tampón de 4,091 mEq por litro por unidad de pH. A 15 mM su capacidad es de 6,136 mEq por litro por unidad de pH.

Vale la pena señalar que una solución tampón de acetato en el pK_a de ácido acético (pH 4,76) es equimolar en ácido acético y base de acetato. (es decir, en el pK_a , el ácido y la base están presentes en cantidades iguales). Como resultado, la resistencia al cambio en el pH (capacidad tampón) de un tampón de acetato en el pK_a del ácido acético es la misma para la adición de ácido y de base. El equilibrio con el ácido y la base es una característica general de los agentes tamponantes en tampones a un pH igual a su pK_a .

A cualquier otro pH, un tampón contendrá diferentes cantidades de formas ácidas y básicas y, por lo tanto, su resistencia al cambio (es decir, su capacidad tampón) tras la adición de ácido no será la misma que su resistencia al cambio tras la adición de base. Como resultado, Es preferible definir la capacidad de tales tampones en términos de (i) la cantidad de ácido necesaria para reducir el pH en una unidad, y (ii) la cantidad de base necesaria para elevar el pH en una unidad.

El reparto en un tampón entre las formas de ácido y base en una composición dada, tal como un patrón de pH, se puede calcular a cualquier pH y concentración de tampón utilizando los procedimientos establecidos anteriormente al describir la capacidad tampón de NaOAc 10 mM a pH 4,76 más o menos (que contiene cantidades equimolares de ácido acético y acetato de sodio). Y los resultados se pueden usar para definir la capacidad tampón de un patrón para uso como referencia.

Por lo tanto, por ejemplo, El reparto del ácido acético en ácido acético y base de acetato en una solución a pH 5,0 se puede calcular fácilmente utilizando los procedimientos anteriores, y a partir de esto se puede calcular la capacidad tampón tanto para la adición tanto de base como de ácido. Calculado de esta manera, la capacidad tampón teórica del tampón de acetato de sodio 10 mM en el intervalo de pH 5,0 a 5,5 es aproximadamente 2,1 mM por 0,5 unidades de pH y 4,2 mM por unidad de pH. Dicho de otra forma, la capacidad tampón del tampón, teóricamente, es aproximadamente 4,2 μ Eq por ml de solución tampón por unidad de cambio de pH. De manera similar, la capacidad tampón teórica del tampón de acetato de sodio 10 mM en el intervalo de pH 5,0 a 4,0 es 4,9 mM, y, dicho de otra forma, 4,9 μ Eq por ml de tampón por unidad de cambio de pH en un intervalo dado de pH.

Si bien estos cálculos a menudo son bastante útiles en muchos casos, se prefieren los patrones empíricos y las determinaciones empíricas. Entre los patrones empíricos particularmente preferidos están los tampones de acetato de sodio en el intervalo de pH 5,0 a 4,0 y pH 5,0 a 5,5 como se ejemplifica en los Ejemplos 1 y 2. Especialmente preferidos son los tampones de acetato de sodio de acuerdo con los cuales la concentración de acetato total es, en particular, 10 mM, preferentemente 5 mM, especialmente 4 mM, entre otros como se establece en otra parte del presente documento.

Los tampones de acetato a pH 5,0 son más resistentes al cambio de pH al añadir ácido que al añadir base, como se analiza anteriormente. En un estándar patrón preferido de capacidad tampón, la capacidad tampón de un tampón de acetato patrón como estos se define como: (i) la pendiente de la línea de regresión de mínimos cuadrados calculada para los datos de titulación base para el tampón de pH 5,0 a pH 5,5, y (ii) la pendiente de la línea de regresión de mínimos cuadrados calculada para los datos de titulación ácido para el tampón de pH 5,0 a pH 4,0. La preparación de tampones de acetato patrón y la determinación de sus capacidades tampón se describen en los Ejemplos 1, 2 y 3. Debe apreciarse que pueden usarse los mismos métodos para establecer y usar patrones de capacidad tampón usando otros agentes tamponantes adecuados.

Al medir la capacidad tampón de una composición de proteínas autotamponantes de acuerdo con la invención, con frecuencia es conveniente expresar la capacidad tampón en términos de la concentración de un tampón patrón al mismo pH que tiene la misma capacidad tampón. Cuando se usa un patrón que no está en el pK_a del agente tamponante, tal como un tampón de acetato de sodio inicialmente a pH 5,0, de acuerdo con la invención, la composición autotamponante se define como que tiene una capacidad tampón igual o mayor que la del patrón, si su capacidad tampón en la titulación base o su capacidad tampón en la titulación ácido (o ambas) es igual o superior a la capacidad tampón correspondiente del patrón.

Debe apreciarse además que el pH de las composiciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con la invención generalmente no estará en el pK_a de la proteína autotamponante, o de cualquier sustituyente ácido-base en ella. De hecho, las proteínas son polipróticas y, como se analiza en el presente documento, con frecuencia tendrán varios

sustituyentes, cada uno con un pK_a algo diferente que contribuye a su capacidad tampón en un intervalo de pH dado. Por consiguiente, la capacidad tampón de las formulaciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con la invención se determina preferentemente de manera empírica tanto por titulación ácido como por titulación base en un intervalo dado de cambio de pH desde el pH deseado de la composición. En realizaciones preferidas a este respecto, la capacidad tampón se determina titulando con ácido y por separado con base sobre un cambio de respectivamente + y - 1 unidad de pH desde el pH inicial de la formulación. En realizaciones particularmente preferidas, los datos de titulación se recogen para un cambio en el pH de más o menos 0,5 unidades de pH. Como se describe en los Ejemplos, la capacidad tampón es la pendiente de la línea de regresión de mínimos cuadrados para los datos de pH en función de los equivalentes de ácido o base añadidos a la composición en el intervalo de titulación.

a. Medidas y Patrones Empíricas de Capacidad Tampón

En determinadas realizaciones preferidas de la invención, la medida de la capacidad tampón es un patrón empírico. Entre los patrones empíricos preferidos a este respecto se encuentran un volumen particular de una solución acuosa a una temperatura particular y un pH particular, que contiene un agente tamponante particular a una concentración particular y que no tiene otros componentes distintos de agua, o uno o más componentes particulares distintos, cada uno a una concentración particular.

Un patrón específico particularmente preferido para determinar la capacidad tampón de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones preferidas de la invención es acetato de sodio 10 mM, pH 5,00 en agua pura sin otros constituyentes a 21 °C, en equilibrio con aire ambiente a 1 atmósfera, como se describe en Ejemplos 1 y 2, preferentemente expresados en equivalentes por unidad de volumen por unidad de pH, tal como $\mu\text{Eq/ml-pH}$. La capacidad tampón del patrón debe medirse empíricamente como se describe en los Ejemplos 1, 2 y 3, y como se analiza adicionalmente en otra parte del presente documento.

Un patrón específico particularmente preferido para determinar la capacidad tampón de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones preferidas de la invención es acetato de sodio 10 mM, pH 4,76 en agua pura sin otros constituyentes a 21 °C, en equilibrio con aire ambiente a 1 atmósfera, como se describe en Ejemplos 1 y 2, preferentemente expresados en equivalentes por unidad de volumen por unidad de pH, tal como $\mu\text{Eq/ml-pH}$. La capacidad tampón del patrón debe medirse empíricamente como se describe en los Ejemplos 1, 2 y 3, y como se analiza adicionalmente en otra parte del presente documento. De acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch, como se indica anteriormente, la capacidad tampón calculada de este patrón en el intervalo de pH 4,76 más o menos 1 unidad de pH es 4,09 microequivalentes por mililitro por unidad de pH (4,09 $\mu\text{Eq/ml-pH}$).

Una variedad de otros tampones están disponibles para su uso como patrones en otros intervalos de pH de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones preferidas de la invención a este respecto. Los tampones de referencia son particularmente preferidos a este respecto, tal como los bien conocidos y empleados habitualmente para las determinaciones de química analítica. En los libros de texto sobre química analítica y en monografías sobre la determinación precisa del pH y la capacidad tampón se establece una variedad de dichos agentes tamponantes.

También son útiles en la invención a este respecto los tampones biológicos, tales como los descritos en, entre otros textos: TEITZ TEXTBOOK OF CLINICAL CHEMISTRY, 3ª ed., Burtis y Ashwood, eds., W.B. Saunders Company, Filadelfia, PA (1999), en particular en las Tablas 50-13 a 50-16, en cuanto a agentes tamponantes y tampones y su uso como patrones de pH y/o capacidad tampón de acuerdo con la invención a este respecto; THE TOOLS OF BIOCHEMISTRY, Terrance G. Cooper, John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1977), en particular el Capítulo 1, páginas 1-35, en cuanto a agentes tamponantes y tampones y su uso como patrones de pH y capacidad tampón de acuerdo con la invención a este respecto, más particularmente en cuanto a las Tablas 1-3, 1-4 y 1-5 y el texto relacionado con las mismas, y PROTEIN PURIFICATION PRINCIPLES AND PRACTICE, 3ª ed., Robert K. Scopes, Springer-Verlag, Nueva York, NY (1994), en particular las páginas 160-164, especialmente en las Tablas 6.4 y 6.5 y el texto relacionado con las mismas, Capítulo 12, sección 3, páginas 324-333, especialmente en las Tablas 12-4 y 12-5 y el texto relacionado con las mismas, y todo el Apéndice C: Buffers for Use in Protein Chemistry, en cuanto a agentes tamponantes y tampones y su uso de acuerdo con la invención a este respecto.

Sin embargo, debido a que algunos gases disueltos en el agua reaccionan con OH^- y/o H_3O^+ , la capacidad tampón de la solución patrón determinada empíricamente puede variar algo del valor teórico. Por tanto, la definición del patrón requiere que la solución esté en equilibrio con la atmósfera a una presión de 1 atmósfera. Además, el patrón de tampón debe mantenerse y ponerse en contacto solo con materiales que no alteren sus componentes o su capacidad tampón, tal como aquellos que lixivian ácidos, bases u otros reactivos que pueden alterar la concentración o actividad eficaz del tampón de acetato de cualquier manera que altere su capacidad tampón. Teniendo en cuenta lo anterior, el equilibrio atmosférico y la inercia del recipiente, la capacidad tampón del patrón variará en escala directa y linealmente con su volumen. Por consiguiente, la capacidad tampón de 100 ml será 1/10 de 1,00 litro y la capacidad tampón de 10 ml será 1/100 de 1,00 litro. Por consiguiente, el volumen del patrón se puede ajustar por comodidad de uso y después normalizarlo nuevamente a 1 litro, según se desee.

Puede que no siempre sea conveniente hacer que la capacidad tampón de acetato 10 mM anterior sea patrón para uso práctico. Sin embargo, se pueden preparar y usar una variedad de otros patrones de capacidad tampón de la

misma manera que el tampón de acetato, usando una variedad de otros agentes tamponantes. Siempre que los patrones tamponantes se preparen adecuadamente, se pueden calibrar contra el patrón tamponante de acetato descrito anteriormente y después usarse en la práctica. Los resultados obtenidos con tales patrones alternativos pueden expresarse en términos del patrón de acetato anterior sin distorsión o error sustancial.

La capacidad tampón de dichos patrones alternativos también se puede calibrar mediante cálculo. Para ello, la capacidad tampón del patrón alternativo se determina directamente y se expresa en mEq por unidad de volumen por unidad de pH. Las determinaciones basadas en el patrón alternativo pueden normalizarse al patrón de acetato utilizando la relación entre las capacidades tampón expresadas en mEq por unidad de volumen por unidad de pH de los patrones alternativo y de acetato.

Utilizando dichos métodos, que se emplean habitualmente en metrología para relacionar los patrones prácticos con un patrón de referencia, el patrón de tampón de acetato descrito anteriormente proporciona una referencia portátil, escalable, confiable y precisa para determinar la capacidad tampón de cualquier composición que pueda compararse fácilmente con medidas dispares hechas en otras composiciones usando métodos similares.

b. Preparación de Patrones de Capacidad Tampón

Los patrones de capacidad tampón se pueden preparar utilizando métodos bien establecidos de química analítica. Véanse, por ejemplo, ANALYTICAL CHEMISTRY, 3ª ed., Douglas A. Skoog y Donald M. West, Holt, Rinehart y Winston, Nueva York (1979), particularmente el capítulo 9 (páginas 186-226), el capítulo 10 (páginas 227-233) y los métodos descritos en las páginas 583-588; TEITZ TEXTBOOK OF CLINICAL CHEMISTRY, 3ª ed., Burtis y Ashwood, eds., W.B. Saunders Company, Filadelfia, PA (1999), particularmente el Capítulo 1 sobre técnicas generales de laboratorio para preparar y calibrar tampones y las Tablas 50-13 a 50-16; THE TOOLS OF BIOCHEMISTRY, Terrance G. Cooper, John Wiley & Sons, Nueva York, NY (1977), en particular el Capítulo 1, páginas 1-35, y las Tablas 1-3, 1-4, y 1-5 y el texto relacionado con las mismas; PROTEIN PURIFICATION PRINCIPLES AND PRACTICE, 3ª ed., Robert K. Scopes, Springer-Verlag, Nueva York, NY (1994), en particular las páginas 160-164, especialmente en las Tablas 6.4 y 6.5 y el texto relacionado con las mismas, Capítulo 12, sección 3, páginas 324-333, especialmente en las Tablas 12-4 y 12-5 y el texto relacionado con las mismas, y todo el Apéndice C: Buffers for Use in Protein Chemistry; y REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 21ª Ed., Beringer et al. Editors, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA (2005), particularmente en las partes relacionadas con agentes tamponantes, tampones, capacidad tampón y similares, particularmente en la preparación y uso de tampones y patrones de capacidad tampón de acuerdo con la invención a este respecto.

El agua utilizada para preparar los patrones de capacidad de tampón debe ser altamente purificada, preferentemente agua Tipo I, tal como agua milliQ o agua destilada triple. Los reactivos tampón deben ser puros y, en particular, sin ninguna sustancia que pueda alterar el pH o la capacidad tampón de la solución patrón, tal como los reactivos de grado de referencia o de grado de reactivo ACS adecuados para su uso en análisis químicos analíticos exigentes, tal como se describe en el referencias anteriores, TEITZ y REMINGTON citado anteriormente en particular, particularmente en partes relacionadas con el agua y reactivos de grado analítico.

Las composiciones exactas de los reactivos tampón deben estar bien establecidas. El peso molecular de los reactivos tampón debe conocerse con precisión para cada reactivo tampón. Los pesos moleculares deben ser para el reactivo exacto que se utilizará y deben incluir el peso de los aductos como los hidratos que están presentes en el reactivo. El número eficaz de donantes de hidrógeno o aceptores de hidrógeno por molécula debe conocerse con precisión para cada reactivo tampón. La distribución proporcional de diferentes formas, tal como los hidratos, debe conocerse para cada reactivo que contiene una mezcla de tales formas. Las concentraciones de reactivos tampón líquidos se deben conocer exactamente, preferentemente en moles/volumen y en moles/masa (por ejemplo, moles/litro y moles/g o kg. Los agentes higroscópicos se deben secar para eliminar la humedad, de modo que el reactivo se pueda pesar con precisión.

Hablando en general, la información proporcionada por vendedores bien establecidos de reactivos y productos químicos de grado de referencia es lo suficientemente precisa para la preparación de patrones de capacidad tampón como se describe anteriormente. Y se pueden utilizar técnicas convencionales bien conocidas empleadas habitualmente en química analítica para secar "reactivos higroscópicos" para que se puedan pesar con precisión.

Como se describe en el presente documento, se pueden emplear métodos de química analítica bien establecidos y habitualmente empleados para preparar y calibrar soluciones ácidas y básicas, tal como HCl 1 N y NaOH 1 N (por nombrar solo dos) para titular soluciones patrón de capacidad tampón, así como soluciones de proteínas de muestra, para determinar la capacidad tampón. Cabe señalar que la preparación de soluciones de NaOH para la titulación debe realizarse para eliminar imprecisiones que surgen de la interacción de determinados gases disueltos con soluciones básicas y los efectos de alteración del pH de su solvatación. Véanse, por ejemplo, Skoog y West (1979) y otras referencias citadas anteriormente con respecto a la preparación y calibración de tampones y patrones de tampón, particularmente en partes relacionadas con la preparación de soluciones patrón para titulación, como se analiza anteriormente.

c. Medidas Empíricas de Capacidad Tampón

La titulación de patrones y muestras para determinar la capacidad tampón se puede hacer utilizando métodos habituales bien conocidos. Las titulaciones se pueden llevar a cabo manualmente. También se pueden llevar a cabo utilizando un autotitador. Una amplia variedad de autotitadores que son adecuados para su uso en la invención a este respecto están disponibles comercialmente en numerosos proveedores. Los métodos adecuados para su uso en la invención a este respecto son los mismos que los descritos en las referencias citadas anteriormente con respecto a la preparación y calibración de patrones de tampón, particularmente en partes relacionadas con la titulación de soluciones conocidas y desconocidas para determinar su capacidad tampón.

2. Tamponamiento por Proteínas y Capacidad Tampón de Proteínas

a. Determinación de los Equilibrios de Hidrógeno de las Proteínas y de la Capacidad Tampón

Las proteínas contienen invariablemente muchos componentes ácidos y básicos. Como resultado, el equilibrio de los iones de hidrógeno de las proteínas es altamente complejo. De hecho, una descripción completa de los equilibrios de iones de hidrógeno de una proteína en un entorno dado está fuera del alcance de los métodos teóricos e informáticos actuales. Por lo tanto, se prefieren las mediciones empíricas de las capacidades tampón de las proteínas. Los métodos desarrollados para la medición empírica precisa de los equilibrios de hidrógeno de las proteínas, que pueden emplearse habitualmente por los expertos en la materia, son adecuados para medir las propiedades tamponantes de las proteínas relacionadas con el desarrollo de formulaciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con la invención. Por lo tanto, las curvas de titulación de pH de las proteínas se pueden determinar de acuerdo con la invención mediante métodos bien conocidos como los descritos en y ejemplificados por los estudios de titulación de pH de Tanford y colaboradores en ribonucleasa. Véanse C. Tanford, "Hydrogen Ion Titration Curves of Proteins," en T. Shedlovsky (ed.), ELECTROCHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE, John Wiley and Sons, Nueva York, 1955, Ch. 13; C. Tanford y J.D. Hauenstein, J. Am. Chem. Soc. 78, 5287 (1956), C. Tanford, PHYSICAL CHEMISTRY OF MACROMOLECULES, John Wiley and Sons, Nueva York, 1961, particularmente las páginas 554-567, particularmente en partes relacionadas con la titulación de proteínas con iones de hidrógeno y con la determinación de la acción tamponante y la capacidad tampón de las proteínas.

Sin embargo, la presente invención no necesita determinaciones tan precisas como las descritas en las referencias anteriores. Más bien, las propiedades tamponantes y la capacidad tampón de las proteínas de acuerdo con la invención se pueden determinar utilizando los métodos descritos en las referencias convencionales sobre química analítica y bioquímica, tal como, por ejemplo, Skoog (1979), Cooper (1977) y Scopes (1994)., citadas anteriormente, particularmente en cuanto a la determinación empírica de curvas de titulación, particularmente de proteínas dentro de un intervalo dado de pH de acuerdo con la invención.

La determinación de las curvas de titulación y la capacidad tampón de acuerdo con la invención se describe en detalle para numerosos tampones de acetato y una variedad de proteínas farmacéuticas en los Ejemplos a continuación. Por lo tanto, las curvas de titulación de pH de las proteínas pueden determinarse empíricamente de acuerdo con los métodos descritos en las referencias anteriores sobre intervalos de pH limitados particulares que son de interés para una formulación dada. En muchos aspectos, estos métodos son los mismos que los utilizados en química analítica para la valoración de moléculas pequeñas, tal como los tampones de acetato (como se ilustra en los Ejemplos). Sin embargo, se debe tener un cuidado mayor en el manejo de proteínas para mantener la conformación y la función necesarias para una formulación eficaz.

Las titulaciones de proteínas pueden llevarse a cabo manualmente o utilizando tituladores automáticos. Los equipos para titulación manual y los tituladores automáticos están fácilmente disponibles en una gran cantidad de proveedores y vendedores. Los métodos adecuados para determinar las curvas de titulación de pH y la capacidad tampón de las proteínas se ejemplifican en los Ejemplos por referencia a la titulación de patrones de tampón de acetato y a la titulación de varias proteínas terapéuticas diferentes sobre intervalos de pH definidos. Estos métodos pueden emplearse para determinar el comportamiento de ionización de hidrógeno y la capacidad tampón de cualquier otra proteína de acuerdo con la invención.

Es un aspecto particular de la invención determinar la capacidad tampón de las proteínas en función de la concentración en solución. En un método preferido a este respecto, las soluciones de una proteína dada se preparan en una serie graduada de concentraciones. Se determina una curva de titulación de pH para la proteína en cada concentración en el intervalo de pH de interés. Preferentemente, las curvas de titulación se determinan para el intervalo de interés utilizando tanto la titulación base como la titulación ácido. Los datos, en determinadas realizaciones preferidas, se trazan en un gráfico de equivalentes de ácido o base añadidos frente al pH medido de cada solución. Generalmente, para intervalos de aproximadamente 0,5 a 1,0 unidades de pH, los datos de titulación para cada concentración se ajustan estrechamente a una línea recta, preferentemente determinada por un análisis de regresión de mínimos cuadrados. En realizaciones preferidas a este respecto, la capacidad tampón para la proteína a cada concentración se equipará a la pendiente de la línea de regresión, expresada en unidades de equivalentes por ml por unidad de pH (o fracciones de la misma). También es útil en la invención a este respecto la relación entre la capacidad tampón de la proteína y su concentración. En determinadas realizaciones preferidas, esta relación se determina

mediante un análisis de regresión de mínimos cuadrados del mejor ajuste en línea recta de los datos de capacidad tampón determinados de acuerdo con lo anterior trazado en un gráfico de capacidad tampón frente a la concentración de proteína.

5 Los datos empíricos sobre la capacidad tampón de las proteínas de acuerdo con la invención se relacionan preferiblemente con la capacidad tampón de un tampón de acetato patrón. Es decir, en realizaciones particularmente preferidas de la invención a este respecto, la capacidad tampón de una proteína dada a una concentración dada en una formulación dada, determinada como anteriormente, se equipará a la concentración de un tampón de acetato patrón que tiene la misma capacidad tampón.

10 Si bien las determinaciones empíricas como se describen en el presente documento son generalmente un aspecto crucial de la formulación de composiciones autotamponantes de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones preferidas de la invención, los métodos teóricos e informáticos también pueden emplearse de forma productiva para guiar el diseño, fabricación y uso de tales composiciones (junto con determinaciones empíricas), tal como se describe a continuación.

15

b. Predicción de los Equilibrios de Iones Hidrógeno de las Proteínas y de la Capacidad Tampón

20 La ionización del hidrógeno en las proteínas es compleja, pero se puede descomponer en términos generales en intervalos de pH definidos por los hidrógenos ionizables de las cadenas laterales de aminoácidos y los grupos terminales amino y carboxilo. El pK_a de los carboxilos terminales en los polipéptidos generalmente oscila alrededor de 3,1. El pK_a de los hidrógenos ácidos en las cadenas laterales de ácido aspártico y ácido glutámico oscila alrededor de 4,4. El pK_a de la histidina en los polipéptidos generalmente oscila alrededor de 6,0. El pK_a de la ionización del hidrógeno del grupo amino terminal generalmente oscila alrededor de 7,5. El sulfhidrilo en la cisteína tiene un pK_a que oscila alrededor de 8,5. La tirosina hidroxilo y la amina lisina tienen pK_a que oscilan alrededor de 10. El pK_a de la arginina oscila alrededor de 12.

25

30 El plegamiento conformacional generalmente divide los grandes polipéptidos y proteínas en disolventes polares en regiones accesibles a disolventes expuestas y en regiones centrales más o menos no polares que tienen poco o ningún contacto con el entorno ambiental. El plegamiento produce muchos entornos entre estos dos extremos. Asimismo, el microambiente alrededor de una cadena lateral de aminoácidos dada en una proteína generalmente se ve afectado por uno o más de: efectos de los disolventes; unión de iones; quelación; formación de complejos; asociación con cofactores; y modificaciones postraduccionales; por nombrar solamente algunas posibilidades. Cada uno de estos puede influir en el pK_a de una ionización de aminoácidos dada en una proteína. Los pK_a para restos específicos en una proteína dada, por lo tanto, pueden variar drásticamente del de un aminoácido libre.

35

40 De hecho, la alteración de los pK_a por microambientes de aminoácidos en proteínas se ha utilizado para estudiar el plegamiento de proteínas y la disposición y el estado de carga de aminoácidos específicos en proteínas plegadas. Las curvas de titulación de proteínas indicadas por Tanford y otros son complejas con algunas características generales en común. Generalmente, solo algunos de los protones ionizables se tienen en cuenta en las curvas de titulación. Otros aparentemente están ubicados en el núcleo y son inaccesibles al disolvente. Los pK_a de cadenas laterales individuales del mismo tipo que pueden detectarse en algunos casos pueden distinguirse entre sí. No obstante, si bien son diferentes de manera detectable, sus pK_a generalmente son similares a los del aminoácido libre.

40

45 La acción tamponante más fuerte de las proteínas generalmente no se produce en el punto isoeléctrico, como se puede suponer erróneamente. De hecho, el tamponamiento depende de los hidrógenos de las cadenas laterales de los aminoácidos y de los hidrógenos terminales, y por lo tanto se produce en intervalos que abarcan los pK_a de los hidrógenos ionizables en los aminoácidos libres, como se analiza anteriormente. El más importante de estos, para formular composiciones de proteínas, especialmente determinadas proteínas farmacéuticas que son más solubles y/o más estables, entre otras cosas, a pH débilmente ácido (pH 4 a 6), es la acción tamponante que se produce en el intervalo de los pK_a del hidrógeno carboxílico de los aminoácidos ácido aspártico y ácido glutámico; es decir, pH 4,0 a 5,5, particularmente alrededor de 4,5.

50

55 Existe una variedad de formas disponibles para estimar la capacidad tampón de una proteína dada en una solución dada a un pH dado. Los métodos van desde modelos informáticos altamente técnicos y complejos hasta aquellos que se pueden llevar a cabo en una calculadora manual. Ninguno de los métodos es completo o totalmente exacto; pero, en algunos casos, pueden proporcionar estimaciones útiles.

55

60 Por ejemplo, en algunos casos, se puede calcular una idea potencialmente útil de la capacidad tampón para una proteína en una solución basada en su composición de aminoácidos, los pK_a (en el disolvente en cuestión) de los grupos amino y carboxi terminales y los donantes y aceptores de hidrógeno de cadenas laterales de aminoácidos, la concentración de la proteína y el pH de la solución.

60

65 Por ejemplo, se puede obtener una estimación potencialmente útil de la capacidad tampón de una proteína a pH en el intervalo del pK_a de la cadena lateral de hidrógeno carboxílico del ácido glutámico (como aminoácido libre) a partir del peso molecular de la proteína y el número de restos de ácido glutámico que contiene. Dividir el primero por el último

65

proporciona el peso por equivalente de ácido glutámico y, por lo tanto, el peso por equivalente de hidrógeno ionizable en el pK_a del ácido glutámico. Debido a que los grupos carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico y el ácido aspártico tienen casi los mismos pK_a , los resultados de tales cálculos para los dos deben sumarse entre sí para obtener una estimación de la capacidad tampón en un intervalo alrededor de sus dos pK_a . La capacidad tampón estimada de una solución de la proteína en el pK_a se puede calcular a partir de la concentración de proteína en la solución y el factor intrínseco que se acaba de proporcionar, es decir, el peso por equivalente de hidrógeno ionizable. Al dividir la concentración entre el peso por equivalente, se obtiene una estimación de la capacidad tampón en unidades de Eq/volumen. Tales estimaciones, con frecuencia, serán demasiado altas, ya que algunos restos generalmente están secuestrados en regiones de la proteína que no son accesibles para el disolvente y, por lo tanto, no contribuyen a su capacidad tampón real. Puede ser posible en determinados casos tener en cuenta el efecto del secuestro en la capacidad tampón. Por ejemplo, se puede aplicar un coeficiente fraccionario que refleje estimaciones teóricas o empíricas de secuestro para ajustar el cálculo original.

Dichos cálculos generalmente serán de menor utilidad y menos precisos que las determinaciones empíricas de la capacidad tampón de las proteínas, de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Pero pueden ser útiles para proporcionar estimaciones máximas aproximadas de la capacidad tampón de las proteínas en solución.

3. Proteínas

La presente divulgación se puede poner en práctica con cualquier proteína que proporcione suficiente capacidad tampón en un intervalo de pH deseado dentro de los parámetros de concentración de proteína y similares necesarios para una formulación deseada. Entre las proteínas preferidas a este respecto están las proteínas farmacéuticas para uso terapéutico veterinario y/o humano, particularmente proteínas para uso terapéutico humano. También entre las proteínas preferidas se encuentran las proteínas que son solubles en soluciones acuosas, particularmente aquellas que son solubles en concentraciones relativamente altas y aquellas que son estables durante largos períodos de tiempo. De manera adicional, entre las proteínas preferidas se encuentran aquellas que tienen un número relativamente alto de aminoácidos accesibles al disolvente con constantes de ionización de hidrógeno de cadena lateral cerca del pH de la acción tamponante deseada.

Además, entre las proteínas preferidas de la divulgación se encuentran las proteínas para formulaciones farmacéuticas que no inducen una respuesta antigénica altamente perjudicial después de la administración a un sujeto. A este respecto, se prefieren las proteínas para uso médico veterinario y/o humano, particularmente, en relación con este último, proteínas humanizadas y humanas.

Además, entre las proteínas preferidas de la divulgación están las proteínas que se unen selectivamente a dianas específicas, incluyendo las proteínas de unión a ligando y los ligandos de proteínas. Las proteínas de unión a antígeno, las proteínas derivadas de las mismas y las proteínas relacionadas con las mismas se encuentran entre las realizaciones particularmente preferidas de la divulgación a este respecto. Las proteínas altamente preferidas de la divulgación a este respecto, son anticuerpos y proteínas derivadas de anticuerpos o que incorporan anticuerpos, en su totalidad o en parte, incluyendo, por nombrar solo algunas de esas entidades: anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos modificadas por ingeniería genética, anticuerpos híbridos, anticuerpos biespecíficos, anticuerpos monocatenarios, anticuerpos genéticamente alterados, incluyendo anticuerpos con una o más sustituciones, adiciones y/o eliminaciones de aminoácidos (muteínas de anticuerpos), anticuerpos quiméricos, derivados de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, que pueden ser de cualquiera de los anteriores y también pueden ser modificadas por ingeniería de manera similar o derivados modificados de los mismos, proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo o un resto derivado de un anticuerpo o de un fragmento de anticuerpo, que puede ser cualquiera de los anteriores o una modificación o derivado del mismo, conjugados que comprenden un anticuerpo o un resto derivado de un anticuerpo, incluyendo cualquiera de los anteriores, o modificaciones o derivados de los mismos, y anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, proteínas de fusión de anticuerpos y similares modificados químicamente, incluyendo todos los anteriores.

a. Anticuerpos, Proteínas Derivadas de Anticuerpos y Relacionadas con Anticuerpos y similares

Entre las proteínas particularmente preferidas de acuerdo con la divulgación se encuentran los polipéptidos de anticuerpos, tales como los polipéptidos de cadena pesada y ligera que tienen la misma secuencia de aminoácidos que aquellos que se producen y forman los anticuerpos de origen natural, tales como los que se producen en sueros y antisueros, incluyendo los polipéptidos y proteínas aislados de fuentes naturales, así como los que están hechos mediante tecnologías de hibridoma, mediante la activación de un gen endógeno (por recombinación homóloga o no homóloga, por ejemplo), mediante la expresión de un gen exógeno bajo el control de una región de control de la transcripción endógena, mediante la expresión de una construcción de expresión exógena, mediante semisíntesis y mediante síntesis *de novo*, por nombrar algunas técnicas comúnmente empleadas para preparar anticuerpos y polipéptidos y proteínas relacionados con anticuerpos que pueden usarse para producir polipéptidos y proteínas de anticuerpos de acuerdo con la divulgación.

Se incluyen entre estos polipéptidos y proteínas relacionados con los anticuerpos aquellos que, en su totalidad o en parte, tienen una secuencia de aminoácidos *de novo*, aquellos que comprenden la totalidad o una o más partes de un

anticuerpo (es decir: una cadena continua de aminoácidos que tiene la misma secuencia que cuatro o más restos cualquiera en la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de anticuerpo de origen natural), aquellos que tienen una secuencia de aminoácidos que coincide de alguna manera con la de un anticuerpo de origen natural, pero difiere de él en otras formas, aquellos que tienen las mismas pero diferentes secuencias de aminoácidos a un homólogo o secuencia de origen natural que se relaciona con ellos, pero difieren del homólogo en una o más modificaciones postraduccionales, y aquellos comprendidos en parte de cualquiera de los anteriores (en parte o en su totalidad) fusionados a una o más regiones de polipéptidos que pueden ser de o derivar de o estar relacionados con un segundo polipéptido de anticuerpo diferente, y pueden ser o derivar de cualquier otro polipéptido o proteína, ya sea de origen natural, similar pero que difieren de los mismos, teniendo una secuencia de aminoácidos semi-*de novo* y/o una secuencia *de novo*, entre otros. Tales híbridos se denominan generalmente en el presente documento polipéptidos de fusión y/o proteínas de fusión.

Además, entre las proteínas preferidas de acuerdo con la divulgación descrita en el presente documento, se encuentran las proteínas modificadas de acuerdo con todo lo anterior. Se incluyen entre tales proteínas modificadas las proteínas modificadas químicamente por un enlace no covalente, enlace covalente, o tanto un enlace covalente como un enlace no covalente. También se incluye todo lo anterior que comprende además una o más modificaciones postraduccionales que pueden realizarse mediante sistemas de modificación celular o modificaciones introducidas *ex vivo* mediante métodos enzimáticos y/o químicos, o introducidas de otras maneras.

Entre las proteínas preferidas de la divulgación a este respecto se encuentran los fragmentos Fab, tales como los producidos al escindir un anticuerpo dimérico típico (LH)₂ con determinada proteasa que deja intacta la cadena ligera mientras se escinden las cadenas pesadas entre la región variable y región constante adyacente, "sobre" los enlaces disulfuro que mantienen unidas las cadenas pesadas. Tal escisión libera un fragmento Fc que comprende las porciones restantes de las cadenas pesadas unidas entre sí, y dos fragmentos Fab diméricos que comprenden cada uno una cadena ligera intacta y la región variable de la cadena pesada. Los fragmentos Fab también se pueden producir mediante otras técnicas que no necesitan el aislamiento de un anticuerpo de origen natural y/o la escisión con una proteasa.

También se prefieren los fragmentos Fab₂ tales como los producidos de manera muy similar a los fragmentos Fab usando una proteasa que escinde "entre o debajo" de los enlaces disulfuro. Como resultado, los dos fragmentos Fab se mantienen unidos mediante enlaces disulfuro y se liberan como un solo fragmento Fab₂. Los fragmentos Fab₂ se pueden producir mediante muchas técnicas diferentes, incluyendo aquellas que no necesitan el aislamiento de un anticuerpo intacto o la escisión con una proteasa que tiene la especificidad necesaria. Asimismo, los fragmentos Fab₂ tanto mono como biespecíficos ahora se pueden preparar mediante una variedad de técnicas habituales.

También entre las proteínas preferidas a este respecto están los fragmentos Fab₃, que son fragmentos de anticuerpos modificados por ingeniería genética en los que se unen tres fragmentos Fab entre sí. Los fragmentos Fab₃ pueden ser mono, bi-, or tri-específicos. Se pueden preparar en una variedad de formas bien conocidas por los expertos en las materias relacionadas. Entre otras proteínas preferidas a este respecto están los fragmentos Fc, tales como los producidos por escisión con una proteasa de la misma manera utilizada para la producción bien de fragmentos Fab o de fragmentos Fab₂. Sin embargo, para la producción de fragmentos Fc, se aíslan los fragmentos que contienen cadenas pesadas diméricas en lugar de los fragmentos que contienen cadenas ligeras. Los fragmentos Fc carecen de sitios de combinación con antígeno, pero comprenden regiones efectoras que desempeñan un papel en los procesos fisiológicos que implican anticuerpos. Los fragmentos Fc se pueden preparar mediante una variedad de técnicas que son bien conocidas y empleadas habitualmente por los expertos en la materia para este propósito.

Entre otras proteínas preferidas a este respecto están los fragmentos variables de cadena sencilla ("scFv"). Los scFv son proteínas de fusión preparadas uniendo las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de una inmunoglobulina. Las cadenas pesadas y ligeras en un scFv generalmente están unidas por un conector de serina y glicina corto. Los scFv tienen la misma especificidad que los anticuerpos de los que derivaron. Originalmente producido a través de presentación en fagos, scFv ahora se puede hacer mediante una variedad de métodos bien conocidos.

También se prefieren Bis-scFv que son fusiones de dos scFv. Los Bis-scFv pueden ser mono- o bi-específicos. Una variedad de métodos son bien conocidos y se pueden aplicar para preparar Bis-scFv de acuerdo con la divulgación.

También se prefieren de acuerdo con la divulgación a este respecto minicuerpos; diacuerpos mono y biespecíficos; triacuerpos mono, bi- y triespecíficos; tetracuerpos mono, bi-, tri- y tetraespecíficos; dominios V_HH; Dominios V-NAR; dominios V_H; dominios V_L; Ig de camello; Ig NAR; y otros.

También entre las realizaciones preferidas de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones preferidas de la divulgación en estos y otros aspectos están las proteínas que comprenden una o más regiones CDR y/o derivadas de CDR y/o relacionadas con CDR de un anticuerpo o una o más FR y/o regiones derivadas de FR y/o relacionadas con FR de un anticuerpo. A este respecto, CDR significa región determinante de la complementariedad; es decir, una región hipervariable de una cadena ligera o pesada de un anticuerpo, generalmente de aproximadamente 9 a 12 aminoácidos de longitud que normalmente es una parte importante de un resto de unión específico de antígeno de un anticuerpo. FR a este respecto significa una región marco de un anticuerpo; es decir, una región de aproximadamente

15 a 20 aminoácidos que separa las CDR en el resto de unión específico de antígeno de un anticuerpo. Las expresiones derivadas de CDR y relacionadas con CDR, y las expresiones derivadas de FR y relacionadas con FR tienen los mismos significados para CDR y FR, respectivamente, como se establece en el Glosario anterior para las expresiones derivadas de anticuerpos y relacionados con anticuerpos como al término anticuerpo.

Con respecto a los anticuerpos, proteínas derivadas de anticuerpos y relacionadas con anticuerpos de acuerdo con lo anterior y con otros aspectos de la divulgación, véanse, por ejemplo, Protein Engineering: Principles and Practice, Jeffrey L. Cleland and Charles S. Craik, eds. Wiley-Liss, Inc., Nueva York (1996), particularmente en Kelley, Robert F., "Engineering Therapeutic Antibodies," Capítulo 15, páginas. 399-434 y Hollinger, P. & Hudson, P., "Engineered antibody fragments and the rise of single domains," Nature Biotechnology, septiembre de 2005, 1126-1136, particularmente en las partes relacionadas con la estructura y modificación por ingeniería de anticuerpos, particularmente anticuerpos biofarmacéuticos, y proteínas derivadas de anticuerpos y relacionadas con anticuerpos, particularmente proteínas farmacéuticas derivadas de anticuerpos y relacionadas con anticuerpos de acuerdo con la invención descrita en el presente documento.

En cuanto a todo lo anterior, particularmente preferidas en la divulgación son proteínas humanas, humanizadas y otras que no generan una respuesta inmunitaria significativamente perjudicial cuando se administra a un ser humano. También se prefieren en la divulgación proteínas de acuerdo con todo lo anterior que de manera similar no causan respuestas inmunitarias significativamente perjudiciales en la administración a seres no humanos.

Entre las proteínas muy particularmente preferidas de acuerdo con la divulgación a este respecto están las proteínas de fusión que comprenden anticuerpos y/o proteínas, polipéptidos o fragmentos derivados de anticuerpos o similares, que incluyen todos los descritos anteriormente. Entre las proteínas de fusión muy particularmente preferidas de la divulgación a este respecto se encuentran las proteínas de fusión que comprenden un anticuerpo o una proteína o fragmento derivado de anticuerpo como los descritos anteriormente y un resto de unión a ligando, como los descritos de manera ilustrativa en el presente documento.

b. Proteínas de Unión a Dianas

También entre las proteínas preferidas de la divulgación a este respecto están los anticuerpos y otros tipos de proteínas de unión a dianas, y proteínas relacionadas con las mismas o derivados de las mismas, y ligandos de proteínas, y proteínas derivadas de las mismas o relacionadas con las mismas. Entre las proteínas de unión a ligando especialmente preferidas a este respecto se encuentran las proteínas que se unen a proteínas señal y efectoras, y proteínas relacionadas con las mismas o derivadas de las mismas.

Entre dichas proteínas de unión, incluyendo los anticuerpos, incluyendo las proteínas derivadas de los mismos y las proteínas relacionadas con los mismos, están aquellas que se unen a uno o más de los siguientes, solos o en cualquier combinación:

- (i) proteínas CD que incluyen pero sin limitación, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34;
- ii) proteínas de la familia de receptores HER, incluyendo, por ejemplo, HER2, HER3, HER4 y el receptor EGF;
- (iii) moléculas de adhesión celular, por ejemplo, LFA-1, Mol, p150.95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina alfa v/beta 3;
- (iv) factores de crecimiento, incluyendo pero sin limitación, por ejemplo, factor de crecimiento endotelial vascular ("VEGF"); hormona del crecimiento, hormona estimulante tiroidea, hormona folículoestimulante, hormona luteinizante, factor de liberación de la hormona del crecimiento, hormona paratiroidea, sustancia inhibidora mulleriana, proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1-alfa), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-beta, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de fibroblastos, incluyendo, por ejemplo, aFGF y bFGF, factor de crecimiento epidérmico (EGF), factores de crecimiento transformantes (TGF), incluyendo, entre otros, TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4 o TGF-beta5, factores de crecimiento tipo insulina I y II (IGF-I e IGF-II), des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral) y factores osteoinductores;
- (v) insulinas y proteínas relacionadas con la insulina, incluyendo pero sin limitación, insulina, cadena A de insulina, cadena B de insulina, proinsulina y proteínas de unión a factores de crecimiento tipo insulina;
- (vi) proteínas de coagulación y relacionadas con la coagulación, tal como, entre otros, factor VIII, factor tisular, factor de von Willebrand, proteína C, alfa -1 antitripsina, activadores de plasminógeno, tales como urocinasa y activador de plasminógeno tisular ("t-PA"), bombazina, trombina y trombosoyetina;
- (vii) factores estimulantes de colonias (CSF, por sus siglas en inglés), incluyendo los siguiente, entre otros, M-CSF, GM-CSF y G-CSF;
- (viii) otras proteínas sanguíneas y séricas, incluyendo pero sin limitación, albúmina, IgE y antígenos de grupos sanguíneos;
- (ix) receptores y proteínas asociadas a receptores, incluyendo, por ejemplo, receptor flk2/flt3, receptor de obesidad (OB), receptores de hormona de crecimiento y receptores de linfocitos T;
- (x) factores neurotróficos, incluyendo pero sin limitación, factor neurotrófico derivado de huesos (BDNF) y neurotrofina-3, -4, -5, o -6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6);
- (xi) cadena A de relaxina, cadena B de relaxina y prorrelaxina;

- (xii) interferones, incluyendo, por ejemplo, interferón-alfa, -beta y -gamma;
- (xiii) interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10;
- (xiv) antígenos víricos, incluyendo pero sin limitación, un antígeno vírico de envoltura de SIDA;
- (xv) lipoproteínas, calcitonina, glucagón, factor natriurético auricular, tensorioactivo pulmonar, factor de necrosis tumoral alfa y beta, encefalinasa, RANTES (regulado en la activación normalmente de linfocitos T expresados y secretados), péptido asociado a gonadotropina de ratón, DNasa, inhibina y activina;
- (xvi) integrina, proteína A o D, factores reumatoides, inmunotoxinas, proteína morfogenética ósea (BMP), superóxido dismutasa, proteínas de membrana superficial, factor acelerador de la descomposición (DAF), envoltura del SIDA, proteínas transportadoras, receptores de migración dirigida, adresinas, proteínas reguladoras, inmuno adhesinas, anticuerpos; y
- (xvii) fragmentos o variantes biológicamente activos de cualquiera de los anteriores.

En cuanto a todo lo anterior, particularmente preferidos son aquellos que son agentes terapéuticos eficaces, particularmente aquellos que ejercen un efecto terapéutico mediante la unión a una diana, particularmente una diana entre las enumerados anteriormente, incluyendo las dianas derivadas de los mismos, las dianas relacionadas con los mismos y modificaciones de las mismas.

C. Proteínas Ilustrativas Particulares

Entre las proteínas ilustrativas particulares se encuentran determinados anticuerpos y proteínas relacionadas con anticuerpos, incluyendo pepticuerpos, tal como, por ejemplo, los que se enumeran inmediatamente a continuación y en otra parte del presente documento:

anticuerpos y pepticuerpos específicos de OPGL y similares (también denominados anticuerpos, pepticuerpos RANKL específicos y similares, incluyendo anticuerpos específicos de OPGL totalmente humanizados y humanos, particularmente anticuerpos monoclonales totalmente humanizados. En particular, la invención incluye los anticuerpos descritos en el número de Publicación Internacional WO 03/002713, que se incorpora en el presente documento, como anticuerpos y proteínas relacionadas con anticuerpos específicos de OPGL, particularmente aquellos que tienen las secuencias establecidas en los mismos, particularmente, pero sin limitación, los indicados en ella: 9H7; 18B2; 2D8; 2E11; 16E1; y 22B3, incluyendo los anticuerpos específicos de OPGL que tienen la cadena pesada de la SEQ ID NO: 2 como se establece en la Figura 2 (produciendo de este modo, la cadena pesada del anticuerpo) y/o la cadena ligera de la SEQ ID NO: 4 (produciendo de este modo la cadena ligera del anticuerpo), como se establece en la Figura 4, cada uno de los cuales se incorpora individual y específicamente por referencia en el presente documento en su totalidad, tal como se divulga en la publicación anterior. Las titulaciones ácido y base de un anticuerpo específico de OPGL ("Ac-hOPGL") en los intervalos de pH de 4,5 a 5,0 y 5,0 a 5,5 se describen en los Ejemplos a continuación. El cálculo de la capacidad tampón de Ac-hOPGL en estos intervalos de pH también se describe en los Ejemplos a continuación.

Agentes o pepticuerpos de unión a la miostatina, incluyendo los pepticuerpos específicos de miostatina, particularmente los descritos en la Publicación de Solicitud de EE. UU. N.º 2004/0181033, particularmente en partes relacionadas con los péptidos específicos de miostatina, incluyendo, pero sin limitación, los péptidos de la familia mTN8-19, incluyendo aquellos de las SEQ ID NO: 305-351, incluyendo TN8-19-1 a través de TN8-19-40, TN8-19 con1 y TN8-19 con2; péptidos de la familia ml2 de las SEQ ID NO: 357-383; la familia ml15 de las SEQ ID NO: 384409; la familia ml17 de las SEQ ID NO: 410-438; la familia ml20 de las SEQ ID NO: 439-446; la familia ml21 de las SEQ ID NO: 447-452; la familia ml24 de las SEQ ID NO: 453-454; y aquellos de las SEQ ID NO: 615-631.

Anticuerpos específicos del receptor de IL-4, particularmente aquellos que inhiben actividades mediadas por la unión de IL-4 y/o IL-13 al receptor, incluyendo los descritos en la Publicación internacional N.º WO 2005/047331 del Número de Solicitud Internacional PCT/US2004/03742, particularmente en partes relacionadas con los anticuerpos específicos del receptor de IL-4, particularmente los anticuerpos que se describen en los mismos, particularmente, y sin limitación, aquellos designados en las mismas: L1H1; L1H2; L1H3; L1H4; L1H5; L1H6; L1H7; L1H8; L1H9; L1H10; L1H11; L2H1; L2H2; L2H3; L2H4; L2H5; L2H6; L2H7; L2H8; L2H9; L2H10; L2H11; L2H12; L2H13; L2H14; L3H1; L4H1; L5H1; L6H1. Las titulaciones ácido y base sobre los intervalos de pH de 4,5 a 5,0 y 5,0 a 5,5, y el cálculo de la capacidad tampón en este intervalo de un anticuerpo específico para el receptor de IL-4 ("Ac-hIL4R") se describen en los ejemplos a continuación.

Anticuerpos, pepticuerpos y proteínas relacionadas específicos del receptor 1 de interleucina 1 ("IL1-R1"), y similares, incluyendo, pero sin limitación, los descritos en la Publicación de Solicitud de los Estados Unidos Número US2004/097712A1, en partes relacionadas con proteínas de unión específicas de IL1-R1, anticuerpos monoclonales en particular, especialmente, sin limitación, aquellos designados en las mismas: 15CA, 26F5, 27F2, 24E12 y 10H7.

Anticuerpos y pepticuerpos específicos de Ang2 y proteínas relacionadas y similares, incluyendo pero sin limitación, los descritos en la Publicación Internacional Número WO 03/057134 y en la Publicación de Solicitud de Estados Unidos Número US2003/0229023, particularmente en partes relacionadas con anticuerpos y pepticuerpos específicos de Ang2 y similares, especialmente aquellos de secuencias descritas en las mismas e incluyendo pero sin limitación: L1(N); L1(N) TS; L1(N) 1K TS; 2xL1(N); 2xL1(N) TS; Con4 (N), Con4 (N) 1K TS, 2xCon4 (N) 1K; L1 (C); L1(C) 1K; 2xL1 (C); Con4 (C); Con4 (C) 1K; 2xCon4 (C) 1K; Con4-L1 (N); Con4-L1 (C); TN-12-9 (N); C17 (N); TN8-8(N); TN8-

14 (N); Con 1 (N), incluyendo también anticuerpos anti-Ang 2 y formulaciones como las descritas en la Publicación Internacional Número WO 2003/030833, particularmente Ab526; Ab528; Ab531; Ab533; Ab535; Ab536; Ab537; Ab540; Ab543; Ab544; Ab545; Ab546; A551; Ab553; Ab555; Ab558; Ab559; Ab565; AbF1AbFD; AbFE; AbFJ; AbFK; AbG1D4; AbGC1E8; AbH1C12; AbIAI; AbIF; Ab1KAb1P; y bIP, en sus diversas permutaciones como se describe en ella.

Anticuerpos específicos de NGF, incluyendo, en particular, pero sin limitación, los descritos en la Publicación de Solicitud de los Estados Unidos Número US2005/0074821, particularmente en cuanto a anticuerpos específicos de NGF y proteínas relacionadas a este respecto, incluyendo en particular, pero sin limitación, los anticuerpos específicos de NGF en ella designados 4D4, 4G6, 6H9, 7H2, 14D10 y 14D11.

Anticuerpos específicos de CD22 y proteínas relacionadas, tales como las descritas en el documento US 5.789.554 en cuanto a anticuerpos específicos de CD22 y proteínas relacionadas, particularmente anticuerpos específicos de CD22 humanos, tales como, pero sin limitación, anticuerpos humanizados y completamente humanos, incluyendo, pero sin limitación, anticuerpos monoclonales humanizados y completamente humanos, incluyendo particularmente, pero sin limitación, anticuerpos IgG específicos de CD22 humanos, tal como, por ejemplo, un dímero de un disulfuro de cadena hLL2 gamma monoclonal de humano-ratón unido a una cadena kappa monoclonal hLL2 de humano-ratón, incluyendo, pero sin limitación, por ejemplo, el anticuerpo completamente humanizado específico de CD22 humano en Epratuzumab, número de registro CAS 501423-23-0. Ilustrativas de la invención, se describen las titulaciones ácido y base de un anticuerpo específico de CD22 ("Ac-hCD22") en los intervalos de pH de 4,5 a 5,0 y 5,0 a 5,5 en los ejemplos a continuación. El cálculo de la capacidad tampón de Ac-hCD22 en estos intervalos de pH también se describe en los Ejemplos a continuación.

Anticuerpos específicos del receptor de IGF-1 y proteínas relacionadas tales como las descritas en la Solicitud de Patente Internacional Número PCT/US2005/046493, en cuanto a anticuerpos específicos del receptor de IGF-1 y proteínas relacionadas, incluyendo, pero sin limitación, los anticuerpos específicos de IGF-1 en ella designados L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51H51 y L52H52.

Anticuerpos específicos de la proteína 1 relacionada con B-7 ("B7RP-1"), (B7RP-1 también se conoce en la bibliografía como B7H2, ICOSL, B7 h y CD275), particularmente anticuerpos IgG2 monoclonales completamente humanos específicos de B7RP, particularmente anticuerpo IgG2 monoclonal completamente humano que se une a un epítipo en el primer dominio similar a inmunoglobulina de B7RP-1, especialmente aquellos que inhiben la interacción de B7RP-1 con su receptor natural, ICOS, en linfocitos T activados en particular, especialmente, en todos los aspectos anteriores, los divulgados en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Número 60/700.265, presentada el 18 de julio de 2005 como tales anticuerpos y proteínas relacionadas, incluyendo pero sin limitación, los anticuerpos designados en ella como sigue: 16H (que tiene las secuencias variable de cadena ligera y variable de cadena pesada, SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 7 respectivamente en ella); 5D (que tiene las secuencias variable de cadena ligera y variable de cadena pesada, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 9 respectivamente en ella); 2H (que tiene las secuencias variable de cadena ligera y variable de cadena pesada, SEQ ID NO: 3 y SEQ ID NO: 10 respectivamente en ella); 43H (que tiene las secuencias variable de cadena ligera y variable de cadena pesada, SEQ ID NO: 6 y SEQ ID NO: 14 respectivamente en ella); 41H (que tiene las secuencias variable de cadena ligera y variable de cadena pesada, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 13 respectivamente en ella); y 15H (que tiene las secuencias variable de cadena ligera y variable de cadena pesada, SEQ ID NO: 4 y SEQ ID NO: 12 respectivamente en ella). Las titulaciones ácido y base y la determinación de la capacidad tampón de un anticuerpo específico de B7RP-1 ("Ac-hB7RP1") se ilustran en los Ejemplos a continuación.

Anticuerpos, peptidocuerpos y proteínas relacionadas específicos de IL-15, tal como, en particular, anticuerpos monoclonales humanizados, particularmente anticuerpos como los divulgados en la Publicación de Solicitud de EE.UU. números: US2003/0138421; US2003/023586; US2004/0071702 en cuanto a anticuerpos específicos de IL-15 y proteínas relacionadas, incluyendo peptidocuerpos, incluyendo particularmente, por ejemplo, pero sin limitación, anticuerpos de IL-15 HuMax y proteínas relacionadas, tal como, por ejemplo, 146B7.

Anticuerpos específicos de IFN gamma, especialmente anticuerpos específicos de IFN gamma humanos, particularmente anticuerpos anti-IFN gamma completamente humanos, tal como, por ejemplo, los descritos en la Publicación de Solicitud de EE.UU. Número US2005/0004353 en cuanto a anticuerpos específicos de IFN gamma, particularmente, por ejemplo, los anticuerpos en ella designados 1118; 1118*; 1119; 1121; y 1121*.

Anticuerpos específicos de TALL-1 y otras proteínas de unión específicas de TALL como las descritas en la Publicación de la Solicitud de Estados Unidos Número 2003/0195156, en cuanto a proteínas de unión de TALL-1, particularmente las moléculas de las Tablas 4 y 5B.

Factor(es) de células madre ("SCF", por sus siglas en inglés) y proteínas relacionadas tales como las descritas en las Patentes de Estados Unidos Números 6.204.363 y 6.207.802, en cuanto a factores de células madre y proteínas relacionadas, particularmente, por ejemplo, el factor de células madre "STEMGEN™".

Ligandos Flt3, ("Flt3L") y proteínas relacionadas tales como las descritas en la Patente de los Estados Unidos Número 6.632.424, en cuanto a ligandos Flt3 y proteínas relacionadas a este respecto.

- 5 Receptores de IL-17 y proteínas relacionadas ("IL-17R"), como los descritos en la Patente de Estados Unidos Número 6.072.033, en cuanto a ligandos Flt3 y proteínas relacionadas a este respecto.

Etanercept, también conocido como Embrel y proteínas relacionadas.

- 10 Actimmune (Interferón-gamma-Ib), Activase (Alteplasa), Aldurazme (Laronidasa), Amevive (Alefacept), Avonex (Interferón beta-1a), BeneFIX (Nonacog alfa), Beromun (Tasonermina), Beatseron (Interferón-beta-Ib), BEXXAR (Tositumomab), Tev-Tropin (Somatropina), Bioclate o RECOMBINATE (Recombinante), CEREZME (Imiglucerasa), ENBREL (Etanercept), Eprex (epoetina alfa), EPOGEN/Procit (Epoetina alfa), FABRAZYME (Agalsidasa beta), Fasturtec/Elitek ELITEK (Rasburicasa), FORTEO (Teriparatida), GENOTROPIN (Somatropina), GlucaGen (Glucagón), Glucagon (Glucagón, origen de ADNr), GONAL-F (folitropina alfa), KOGENATE FS (Octocog alfa), HERCEPTIN (Trastuzumab), HUMATROPE (SOMATROPINA), HUMIRA (Adalimumab), Insulina en Solución, INFERGEN® (Interferón alfacon-1), KINERET® (anakinra), Kogenate FS (Factor Antihemofílico), LEUKIN (SARGRAMOSTIM factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos humanos recombinante (rhuGM-CSF)), CAMPATH (Alemtuzumab), RITUXAN® (Rituximab), TNKase (Tenecteplasa), MYLOTARG (gemtuzumab ozogamicina), NATRECOR (nesiritida), ARANESP (darbepoetina alfa), NEULASTA (pegfilgrastim), NEUMEGA (oprelvekina), NEUPOGEN (Filgrastim), NORDITROPIN CARTRIDGES (Somatropina), NOVOSEVEN (Eptacog alfa), NUTROPIN AQ (somatropina), Oncaspar (pegaspargasa), ONTAK (denileucina difitox), ORTHOCLONE OKT (muromonab-CD3), OVIDREL (coriogonadotropina alfa), PEGASYS (peginterferón alfa-2a), PROLEUKIN (Aldesleucina), PULMOZYME (dornasa alfa), Retavase (Retepalasa), REBETRON Terapia de Combinación que contiene REBETOL® (Ribavirina) e INTRON® A (Interferón alfa-2b), REBIF (interferón beta-1a), REFACTO (Factor Antihemofílico), REFLUDAN (Iepirudina), REMICADE (infliximab), REOPRO (abciximab)ROFERON®-A (Interferón alfa-2a), SIMULECT (baasiliximab), SOMAVERT (Pegivisomant), SYNAGIS® (palivizumab), Stemben (Ancestima, Factor de células madre), THYROGEN, INTRON® A (Interferón alfa-2b), PEG-INTRON® (Peginterferón alfa-2b), XIGRIS® (Drotrecogina alfa activada), XOLAIR® (Omalizumab), ZENAPAX® (daclizumab), ZEVALIN® (Ibritumomab Tiuxetan).

d. Variación de secuencia

- 35 Las proteínas particularmente preferidas con respecto a todo lo de la divulgación anterior y de la siguiente divulgación, incluyen aquellas que comprenden una región que es el 70 % o más, especialmente el 80 % o más, más especialmente el 90 % o más, aún más especialmente el 95 % o más, particularmente el 97 % o más, más particular el 98 % o más, aún más particularmente el 99 % o más idénticas en la secuencia de aminoácidos a una secuencia de aminoácidos de referencia de una proteína de unión, como se ilustra anteriormente, particularmente una proteína de unión farmacéutica, tal como una secuencia de GenBank u otra de referencia de una proteína de referencia.

- 40 La identidad a este respecto puede determinarse usando una variedad de programas informáticos de análisis de secuencias de aminoácidos bien conocidos y fácilmente disponibles. El software preferido incluye aquellos que implementan los algoritmos de Smith-Waterman, considerados una solución satisfactoria al problema de la búsqueda y alineación de secuencias. También se pueden emplear otros algoritmos, particularmente cuando la velocidad es una consideración importante. Los programas comúnmente empleados para la alineación y la coincidencia de homología de ADN, ARN y polipéptidos que se pueden usar a este respecto incluyen FASTA, TFASTA, BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLASTN, PROSRCH, BLAZE y MPSRCH, siendo, este último, una implementación del algoritmo de Smith-Waterman para la ejecución en procesadores masivamente paralelos realizados por MasPar.

- 50 Los programas BLASTN, BLASTX y BLASTP se encuentran entre los programas preferidos para tales determinaciones, el primero para las comparaciones de secuencias de polinucleótidos y los dos últimos para las comparaciones de secuencias polipeptídicas: BLASTX para la comparación de las secuencias polipeptídicas de los tres marcos de lectura de la secuencia de polinucleótidos y BLASTP para una única secuencia polipeptídica.

- 55 BLAST proporciona una variedad de parámetros definibles por el usuario que se establecen antes de implementar una comparación. Algunos de ellos son más evidentes que otros en las interfaces gráficas de usuario, tal como los proporcionados por NCBI BLAST y otros programas de alineación de secuencias a los que se puede acceder en Internet. La configuración y sus valores se exponen y explican en los sitios web de servicios y se explican y exponen con particular detalle en una variedad de textos fácilmente disponibles, incluyendo pero sin limitación, BIOINFORMATICS: SEQUENCE AND GENOME ANALYSIS, 2ª Ed., David W. Mount, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York (2004), especialmente los capítulos 3, 4, 5 y 6 en cuanto a la comparación de secuencias de proteínas y ácidos nucleicos en general y en cuanto a las comparaciones y búsquedas BLAST en particular; SEQUENCE ANALYSIS IN A NUTSHELL: A GUIDE TO COMMON TOOLS AND DATABASES, Scott Markel y Darryl Leon, O'Reilly & Associates, Sebastopol, California (2003), especialmente el Capítulo 7 en cuanto a BLAST en particular, particularmente en las partes relacionadas con la comparación de secuencias de nucleótidos y polipéptidos y para determinar su grado de identidad, similitud, homología y/o similares, especialmente en cuanto a la

comparación de una secuencia de prueba y una secuencia de referencia para calcular un grado (porcentaje) de identidad entre ellas.

5 En las realizaciones preferidas de la invención a este respecto, la relación de secuencias se define como la puntuación de identidad en porcentaje devuelta por una u otra de las búsquedas de comparación BLAST mencionadas anteriormente con $e = 10$ y todos los demás parámetros configurados a sus valores predeterminados en el servidor web de NCBI como se establece en SEQUENCE ANALYSIS IN A NUTSHELL: A GUIDE TO COMMON TOOLS AND DATABASES, Scott Markel y Darryl Leon, O'Reilly & Associates, Sebastopol, California (2003), páginas 47-51 y en todos los detalles de los ajustes preferidos para los parámetros de la presente invención para comparar secuencias usando BLAST, tales como las de BLAST de NCBI.

15 Las siguientes referencias proporcionan información adicional sobre comparaciones de secuencias a este respecto y en otros. GUIDE TO HUMAN GENOME COMPUTING, Ed. Martin J. Bishop, Academic Press, Harcourt Brace & Company Publishers, Nueva York (1994), particularmente en las partes relacionadas con la determinación de la identidad y/o homología de secuencias de aminoácidos o polinucleótidos, especialmente el Capítulo 7. Los programas BLAST se describen en Altschul et al., "Basic Local Alignment Research Tool," J Mol Biol 215: 403-410 (1990). Se proporciona información adicional sobre análisis de secuencias y determinaciones de homología e identidad en, entre muchas otras referencias bien conocidas y fácilmente disponibles para los expertos en la materia: NUCLEIC ACID AND PROTEIN SEQUENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH, Eds. M. J. Bishop y C. J. Rawings, IRL Press, Oxford, RU (1987); PROTEIN STRUCTURE: A PRACTICAL APPROACH, Ed. T. E. Creighton, IRL Press, Oxford, RU (1989); Doolittle, R. F.: "Searching through sequence databases," Met Enz. 183: 99-110 (1990); Meyers y Miller: "Optimal alignments in linear space" Comput. Applic. in Biosci 4: 11-17 (1988); Needleman y Wunsch: "A general method applicable to the search for similarities in amino acid sequence of two proteins," J Mol Biol 48: 443-453 (1970) y Smith y Waterman "Identification of common molecular subsequences," J Mol Biol 147: 1950 et seq. (1981), particularmente en partes relacionadas con la comparación de secuencias y determinaciones de identidad y homología.

20 Las realizaciones particularmente preferidas a este respecto tienen del 50 % al 150 % de la actividad de la proteína de referencia mencionada anteriormente, las realizaciones particularmente altamente preferidas a este respecto tienen del 60 % al 125 % de la actividad de la proteína de referencia, las realizaciones aún más altamente preferidas tienen del 75 % al 110 % de la actividad de la proteína de referencia, las realizaciones todavía más altamente preferidas tienen del 85 % al 125 % de la actividad de la referencia, las realizaciones todavía más altamente preferidas tienen del 90 % al 110 % de la actividad de la referencia.

35 4. Formulaciones

Se pueden usar muchos reactivos y métodos empleados convencionalmente para la formulación de productos farmacéuticos proteicos para la formulación de composiciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones preferidas de la divulgación. Sin embargo, en las formulaciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con la divulgación, el tamponamiento es proporcionado sustancialmente por completo por la proteína en sí misma, no por un agente tamponante, como es el caso de las formulaciones convencionales. Además, las formulaciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones preferidas de la divulgación están sustancialmente libres de tales agentes tamponantes.

45 Sin embargo, en muchos otros aspectos, las composiciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones de la divulgación pueden formularse usando reactivos y métodos empleados convencionalmente para la formulación de proteínas, en particular, reactivos y métodos empleados para la formulación de productos farmacéuticos, incluyendo productos farmacéuticos para uso veterinario y humano, especialmente aquellos reactivos y métodos adecuados para formular productos farmacéuticos proteicos para uso veterinario y especialmente para uso humano.

50 De acuerdo con esto, se pueden usar muchos métodos e ingredientes para formular y usar productos farmacéuticos que son bien conocidos y habituales en las técnicas relacionadas, en el diseño, preparación y uso de formulaciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones preferidas de la divulgación en relación con esto. Dichos métodos e ingredientes se describen en, por nombrar solo algunas referencias fácilmente disponibles a este respecto, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 21ª Ed.; Beringer et al. Editors, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA (2005); ANSEL'S PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 8ª edición, Allen et al., Editores, Lippincott, Williams & Wilkins, Filadelfia, PA (2005); y PHARMACEUTICAL FORMULATION OF PEPTIDES AND PROTEINS, Sven Frokjaer y Lars Hovgaard, Editores, CRC Press, Boca Ratón, Florida (2000), particularmente en las partes relacionadas con ingredientes y métodos convencionales que se pueden usar en formulaciones de proteínas de autotamponantes de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones preferidas de la invención relacionadas con los mismos.

65 Métodos e ingredientes adicionales que pueden ser útiles a este respecto se describen en, entre otros, el documento US 6.171.586; el documento WO 2005/044854; el documento US 6.288.030; el documento US 6.267.958; el documento WO 2004/055164; el documento US 4.597.966; el documento US 2003/0138417; el documento US

6.252.055; el documento US 5.608.038; el documento US 6.875.432; el documento US 2004/0197324; el documento WO 02/096457; el documento US 5.945.098; el documento US 5.237.054; el documento US 6.485.932; el documento US 6.821.515; el documento US 5.792.838; el documento US 5.654.403; el documento US 5.908.826; el documento EP 0 804 163; y el documento WO 2005/063291, particularmente en las partes relacionadas con formulaciones de proteínas autotamponantes farmacéuticamente aceptables de acuerdo con la invención.

Diversos aspectos específicos de los ingredientes y tipos específicos de formulaciones se describen adicionalmente a continuación, a modo de ilustración. La descripción proporcionada de este modo no es exhaustiva de los métodos y composiciones posibles para las formulaciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con los diversos aspectos y realizaciones de la divulgación, ni es de ninguna manera exclusiva.

En realizaciones preferidas de una variedad de aspectos de la divulgación, las formulaciones de proteínas autotamponantes comprenden una proteína y un transportador, que también pueden denominarse en el presente documento, de manera diversa, según sea el caso, como uno o más de: un vehículo, un vehículo primario, un diluyente, un diluyente primario, un transportador primario, un disolvente y/o un disolvente primario. En el sentido más amplio, el transportador puede ser un gas, un líquido o un sólido, según convenga a la fase de la composición y/o su(s) uso(s). En algunas realizaciones de la divulgación a este respecto, el transportador es un sólido, tal como un polvo en el que se puede dispersar una proteína. En realizaciones preferidas a este respecto, el transportador es un líquido, particularmente un líquido en el que la proteína autotamponante es altamente soluble, particularmente a concentraciones que proporcionan la capacidad tampón deseada. Los portadores líquidos pueden ser orgánicos o no orgánicos. Preferentemente son acuosos, lo más preferentemente están compuestos en gran parte o completamente por agua pura.

Se apreciará que las formulaciones para uso farmacéutico de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones de la invención deben ser compatibles con los procesos y condiciones a los que serán sometidos, tal como, por ejemplo, procedimientos de esterilización (generalmente aplicados antes de mezclar con un principio activo), y condiciones durante el almacenamiento.

Casi invariablemente, las formulaciones de acuerdo con numerosos aspectos y realizaciones de la invención contendrán ingredientes adicionales incluyendo, pero sin limitación, excipientes y otros agentes farmacéuticos. No obstante, debe entenderse que las formulaciones de acuerdo con la invención son formulaciones autotamponantes en las que la capacidad tampón está proporcionada sustancial o completamente por la proteína primaria en sí misma, tal como se describe en otra parte del presente documento.

Las formulaciones de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones de la invención pueden contener, entre otros, excipientes, tal como se describe más adelante, incluyendo pero sin limitación, ingredientes para modificar, mantener o conservar, por ejemplo, la osmolalidad, osmolaridad, viscosidad, claridad, color, tonicidad, olor, esterilidad, estabilidad, velocidad de disolución o liberación, adsorción o penetración de las formulaciones y/o del polipéptido y/o de la proteína primarios.

Las formulaciones dependerán, por supuesto, de, por ejemplo, la proteína particular a formular, los diferentes principios activos, tal como otros productos farmacéuticos, que estarán incluidos en la formulación, la ruta de administración prevista, el método de administración a emplear, la dosificación, la frecuencia de dosificación y el formato de suministro, entre otros.

Las formulaciones de acuerdo con algunas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la invención proporcionan composiciones que comprenden una proteína, preferentemente una proteína farmacéutica y un disolvente, teniendo la proteína una capacidad tampón por unidad de volumen de al menos la de aproximadamente: el tampón de acetato de sodio 4,0 mM como se determina en el intervalo de pH 5,0 a 4,0 pH o 5,0 a 5,5 como se describe en el Ejemplo 1 o 2 y en otra parte del presente documento.

Las formulaciones de acuerdo con algunas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la invención proporcionan composiciones de proteínas autotamponantes, particularmente composiciones farmacéuticas de proteínas, en donde, excluyendo la capacidad tampón de la proteína, la capacidad de tampón por unidad de volumen de la composición es igual a o menor que la del tampón de acetato de sodio 1,0 o 1,5 o 2,0 mM como se determina en el intervalo de pH 5,0 a 4,0 o pH 5,0 a 5,5 como se describe en el Ejemplo 1 o 2 y en otra parte del presente documento.

Las formulaciones de acuerdo con algunas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la divulgación proporcionan composiciones de proteínas autotamponantes, particularmente composiciones farmacéuticas de proteínas, que comprenden una proteína y un disolvente, en donde al pH de la composición, la capacidad tampón de la proteína es al menos aproximadamente: 1,00 o 1,50 o 1,63 o 2,00 o 3,00 o 4,00 o 5,00 o 6,50 o 8,00 o 10,0 o 15,0 o 20,0 o 40,0 o 50,0 o 75,0 o 100 o 125 o 150 o 200 o 250 o 300 o 350 o 400 o 500 o 700 o 1.000 o 1.500 o 2.000 o 2.500 o 3.000 o 4.000 o 5.000 mEq por litro y por cambio de pH de una unidad de pH.

Las formulaciones de acuerdo con algunas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la invención

proporcionan composiciones de proteínas autotamponantes, particularmente composiciones farmacéuticas de proteínas, que comprenden una proteína y un disolvente, en donde al pH de la composición, excluyendo la proteína, la capacidad tampón por unidad de volumen de la composición es igual o menor que la de un tampón de acetato 0,50 o 1,00 o 1,50 o 2,00 mM según se determina en el intervalo de pH 5,0 a 4,0 o pH 5,0 a 5,5 como se describe en el Ejemplo 1 o 2 y en otra parte del presente documento.

Las formulaciones de acuerdo con algunas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la invención proporcionan composiciones de proteínas autotamponantes, particularmente composiciones farmacéuticas de proteínas, que comprenden una proteína y un disolvente, en donde al pH deseado, la proteína proporciona al menos aproximadamente el 80 % de la capacidad tampón de la composición.

Las formulaciones de acuerdo con algunas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la invención proporcionan composiciones de proteínas autotamponantes, particularmente composiciones farmacéuticas de proteínas, que comprenden una proteína y un disolvente, A, en donde la concentración de la proteína esta entre aproximadamente: 20 y 400, o 20 y 300, o 20 y 250, o 20 y 200, o 20 y 150 mg/ml.

Las formulaciones de acuerdo con algunas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la invención proporcionan composiciones de proteínas autotamponantes, particularmente composiciones farmacéuticas de proteínas, que comprenden una proteína y un disolvente, en donde al pH mantenido por la acción tamponante de la proteína es un pH entre aproximadamente: 3,5 y 8,0, o 4,0 y 6,0, o 4,0 y 5,5, o 4,5 y 5,5.

Las formulaciones de acuerdo con algunas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la invención proporcionan composiciones de proteínas autotamponantes, particularmente composiciones farmacéuticas de proteínas, que comprenden una proteína y un disolvente, en donde la concentración de sal es menor que: 150 mM o 125 mM o 100 mM o 75 mM o 50 mM o 25 mM.

Las formulaciones de acuerdo con algunas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la invención proporcionan composiciones de proteínas autotamponantes, particularmente composiciones farmacéuticas de proteínas, que comprende una proteína y un disolvente, y que comprende además una o más sales farmacéuticamente aceptables; agentes de equilibrio osmótico (agentes de tonicidad); antioxidantes; antibióticos; antimicóticos; agentes de carga; lioprotectores; agentes antiespumantes; agentes quelantes; conservantes; colorantes; analgésicos; o agentes farmacéuticos adicionales.

Las formulaciones de acuerdo con algunas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la invención proporcionan composiciones de proteínas autotamponantes, particularmente composiciones farmacéuticas de proteínas, que comprende una proteína y un disolvente, y que comprende además uno o más polioles farmacéuticamente aceptables en una cantidad que es hipotónica, isotónica o hipertónica, preferentemente aproximadamente isotónica, particular y preferentemente isotónica, especialmente preferentemente uno o más de sorbitol, manitol, sacarosa, trehalosa o glicerol, particularmente de manera especial y preferentemente aproximadamente sorbitol al 5 %, manitol al 5 %, sacarosa al 9 %, trehalosa al 9 % o glicerol al 2,5 %, muy especialmente a este respecto sorbitol al 5 %, manitol al 5 %, sacarosa al 9 %, trehalosa al 9 % o glicerol al 2,5 %.

Las formulaciones de acuerdo con algunas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la invención proporcionan composiciones de proteínas autotamponantes, particularmente composiciones farmacéuticas de proteínas, que comprende una proteína y un disolvente, y que comprende además uno o más tensioactivos farmacéuticamente aceptables, preferentemente uno o más de polisorbato 20, polisorbato 80, otros ésteres de ácidos grasos de sorbitán, polietoxilatos y poloxámero 188, particularmente preferentemente polisorbato 20 o polisorbato 80, preferentemente aproximadamente de 0,001 a 0,1 % de polisorbato 20 o polisorbato 80, muy preferentemente aproximadamente de 0,002 a 0,02% de polisorbato 20 o polisorbato 80, especialmente de 0,002 a 0,02% de polisorbato 20 o polisorbato 80.

Las formulaciones de acuerdo con algunas de las realizaciones preferidas en diversos aspectos de la invención proporcionan composiciones de proteínas autotamponantes, particularmente composiciones farmacéuticas de proteínas, que comprenden una proteína y un disolvente, en donde la proteína es un agente farmacéutico y la composición es una formulación estéril de la misma adecuada para el tratamiento de un sujeto médico veterinario o humano.

También entre las formulaciones de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones de la invención descritas en el presente documento, se encuentran composiciones liofilizadas de acuerdo con lo anterior, particularmente composiciones liofilizadas que cuando se reconstituyen proporcionan una formulación como se describe anteriormente y en otra parte del presente documento.

a. Excipientes y otros Ingredientes Adicionales

Como se analiza anteriormente, determinadas realizaciones de acuerdo con aspectos de la invención proporcionan composiciones de proteínas autotamponantes, particularmente composiciones farmacéuticas de proteínas, que

comprenden, además de la proteína, particularmente una proteína farmacéutica, uno o más excipientes tales como los descritos de manera ilustrativa en esta sección y en otra parte del presente documento. Los excipientes pueden usarse en la invención a este respecto para una amplia variedad de fines, tales como el ajuste de las propiedades físicas, químicas o biológicas de las formulaciones, tales como el ajuste de la viscosidad y/o los procesos de la invención para mejorar la eficacia y/o estabilizar tales formulaciones y procesos contra la degradación y el deterioro debido a, por ejemplo, tensiones que se producen durante la fabricación, transporte, almacenamiento, preparación previa al uso, administración y después de los mismos.

Hay una variedad de exposiciones disponibles sobre estabilización de proteínas y materiales y métodos de formulación útiles a este respecto, tal como Arakawa et al., "Solvent interactions in pharmaceutical formulations," Pharm Res. 8(3): 285-91 (1991); Kendrick et al., "Physical stabilization of proteins in aqueous solution," en: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter y Manning, eds. Pharmaceutical Biotechnology. 13: 61-84 (2002) y Randolph et al., "Surfactant-protein interactions," Pharm Biotechnol. 13: 159-75 (2002), particularmente en partes relacionadas con excipientes y procesos de los mismos para formulaciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con la presente invención, especialmente en cuanto a productos y procesos farmacéuticos de proteínas para usos médicos veterinarios y/o humanos.

En la Tabla 1 se enumeran diversos excipientes útiles en la invención y se describen adicionalmente a continuación.

20

Tabla 1: Tipos de Excipientes y Sus Funciones

Tipo	Función	
	Líquidos	Liofilizados
-		-
Agentes de Tonicidad/Estabilizadores	<ul style="list-style-type: none"> • Proporciona isotonicidad a la formulación de manera que sea adecuada para inyección • Los ejemplos incluyen polioles, sales y aminoácidos • Ayudan a mantener la proteína en un estado más compacto (polioles) • Minimizan las interacciones electrostáticas solución de proteínas-proteína (sales) 	<ul style="list-style-type: none"> • Los estabilizadores incluyen crio y lioprotectores Los ejemplos incluyen polioles, azúcares y polímeros • Los crioprotectores protegen las proteínas del estrés por congelación • Los lioprotectores estabilizan las proteínas en estado liofilizado
Agentes de carga	<ul style="list-style-type: none"> • No aplica 	<ul style="list-style-type: none"> • Se utilizan para potenciar la elegancia del producto y evitar escapes • Proporciona resistencia estructural a la costra liofilizada • Los ejemplos incluyen manitol y glicina

(continuación)

Tipo	Función	
	Líquidos	Liofilizados
-		-
Tensioactivos	<ul style="list-style-type: none"> • Previenen/controlan la agregación, formación de partículas y adsorción en la superficie del fármaco • Los ejemplos incluyen polisorbato 20 y 80. 	<ul style="list-style-type: none"> • Empleados si la agregación durante el proceso de liofilización es un problema Pueden servir para reducir los tiempos de reconstitución • Los ejemplos incluyen polisorbato 20 y 80
Antioxidantes	<ul style="list-style-type: none"> • Control de la oxidación de proteínas 	<ul style="list-style-type: none"> • Generalmente si no se emplean, las reacciones moleculares en la costra liofilizada se retrasan mucho
Iones metálicos/Agentes quelantes	<ul style="list-style-type: none"> • Un ión metálico específico se incluye en una formulación líquida solo como cofactor • Los cationes divalentes tales como el zinc y el magnesio se utilizan en formulaciones en suspensión • Los agentes quelantes se utilizan para inhibir las reacciones catalizadas por iones de metales pesados 	<ul style="list-style-type: none"> • Pueden incluirse si un ión metálico específico se incluye solo como cofactor • Generalmente no se necesitan agentes quelantes en las formulaciones liofilizadas
Conservantes	<ul style="list-style-type: none"> • Importantes particularmente para formulaciones multidosis • Protege contra el crecimiento microbiano, • Ejemplo: alcohol bencílico 	<ul style="list-style-type: none"> • Solamente para formulaciones multidosis • Proporciona protección contra el crecimiento microbiano en la formulación • Generalmente se incluye en el diluyente de reconstitución (p. ej., bWFI)

i. Sales

5 Las sales se pueden usar de acuerdo con ciertas de las realizaciones preferidas de la invención para, por ejemplo, ajustar la fuerza iónica y/o la isotonicidad de una formulación autotamponante y/o mejorar la solubilidad y/o la estabilidad física de un proteína autotamponante u otro ingrediente de una composición de proteínas autotamponantes de acuerdo con la invención.

10 Como es bien sabido, los iones pueden estabilizar el estado natural de las proteínas uniéndose a los restos cargados en la superficie de la proteína y protegiendo los grupos cargados y polares en la proteína y reduciendo la fuerza de sus interacciones electrostáticas, interacciones atractivas y repulsivas. Los iones también pueden estabilizar el estado desnaturalizado de una proteína uniéndose, en particular, a los enlaces peptídicos desnaturalizados (-CONH) de la proteína. Asimismo, la interacción iónica con grupos cargados y polares en una proteína también puede reducir las interacciones electrostáticas intermoleculares y, de este modo, prevenir o reducir la agregación y la insolubilidad de las proteínas.

15 Las especies iónicas difieren significativamente en sus efectos sobre las proteínas. Se han desarrollado una serie de clasificaciones categóricas de iones y sus efectos sobre las proteínas que se pueden usar en la formulación de composiciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con la invención. Un ejemplo es la serie Hofmeister, que clasifica los solutos iónicos y polares no iónicos por su efecto sobre la estabilidad conformacional de las proteínas en solución. Los solutos estabilizadores se denominan "cosmotrópicos". Los solutos desestabilizadores se denominan caotrópicos. Los agentes cosmotrópicos se usan comúnmente en altas concentraciones (por ejemplo, > 1 molar de sulfato de amonio) para precipitar proteínas de la solución ("precipitación de proteínas por adición de sal"). Los agentes caotrópicos se usan comúnmente para desnaturalizar y/o para solubilizar proteínas ("disolución de proteínas por adición de sal"). La eficacia relativa de los iones para "precipitación de proteínas por adición de sal y disolución de proteínas por adición de sal" define su posición en la serie Hofmeister.

25 Además de sus utilidades y sus inconvenientes (como se analiza anteriormente), las sales también son eficaces para reducir la viscosidad de las formulaciones de proteínas y pueden usarse en la invención para ese fin.

30

Con el fin de mantener la isotonicidad en una formulación precursora de acuerdo con las realizaciones preferidas de la invención, mejorar la solubilidad y/o estabilidad de las proteínas, mejorar las características de viscosidad, evitar efectos perjudiciales de la sal sobre la estabilidad y agregación de la proteína, y prevenir la degradación de las proteínas mediada por la sal, la concentración de sal en formulaciones autotamponantes de acuerdo con diversas realizaciones preferidas de la invención es menor de 150 mM (en cuanto a iones monovalentes) y 150 mEq/litro para iones multivalentes. A este respecto, en determinadas realizaciones particularmente preferidas de la invención, la concentración de sal total es de aproximadamente 75 mEq/l a aproximadamente 140 mEq/l.

ii. Aminoácidos

Los aminoácidos libres pueden usarse en formulaciones de proteínas de acuerdo con diversas realizaciones preferidas de la invención como, por nombrar algunos, agentes de carga, estabilizantes y antioxidantes. Sin embargo, los aminoácidos comprendidos en las formulaciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con la invención no proporcionan acción tamponante. Por este motivo, no se emplean aquellos con capacidad tampón significativa, no se emplean a ningún pH alrededor del cual tengan una actividad tamponante significativa, o se usan a baja concentración de modo que, como resultado, su capacidad tampón en la formulación no es significativa. Este es particularmente el caso de la histidina y otros aminoácidos que comúnmente se usan como tampones en formulaciones farmacéuticas.

Sujetos a la consideración anterior, se pueden usar lisina, prolina, serina y alanina para estabilizar proteínas en una formulación. La glicina es útil en la liofilización para garantizar la estructura y propiedades correctas de la costra. Como resultado, es un ingrediente común en formulaciones liofilizadas y liofilizados reconstituidos, tales como Neumega®, Genotropin® y Humatrope®. La arginina puede ser útil para inhibir la agregación de proteínas, tanto en formulaciones líquidas como liofilizadas, tales como Activase®, Avonex® y Enbrel® líquido. La metionina es útil como antioxidante.

iii. Poliololes

Los polioles incluyen azúcares, por ejemplo, manitol, sacarosa y sorbitol y alcoholes polihídricos tales como, por ejemplo, glicerol y propilenglicol, y, para fines de análisis en el presente documento, polietilenglicol (PEG) y sustancias relacionadas. Los polioles son cosmotrópicos. Son agentes estabilizadores útiles tanto en formulaciones líquidas como liofilizadas para proteger las proteínas de los procesos de degradación física y química. Los polioles también son útiles para ajustar la tonicidad de las formulaciones.

Entre los polioles útiles en la invención a este respecto, se encuentra el manitol, comúnmente utilizado para asegurar la estabilidad estructural de la costra en formulaciones liofilizadas, tales como, por ejemplo, Leukine®, Enbrel® - Lyo y Betaseron®. Asegura la estabilidad estructural a la costra. Generalmente se usa con un lioprotector, por ejemplo, sacarosa. El sorbitol y la sacarosa se encuentran entre los agentes preferidos para ajustar la tonicidad y como estabilizadores para proteger contra las tensiones de congelación y descongelación durante el transporte o la preparación de cargas durante el proceso de fabricación. Los azúcares reductores (que contienen grupos aldehído o cetona libres), tales como glucosa y lactosa, pueden glicosilar los restos de lisina y arginina de la superficie. Por lo tanto, generalmente no se encuentran entre los polioles preferidos para su uso de acuerdo con la invención. Además, los azúcares que forman tales especies reactivas, tal como la sacarosa, que se hidroliza a fructosa y glucosa en condiciones ácidas, y en consecuencia genera glicosilación, tampoco se encuentran entre los aminoácidos preferidos de la invención a este respecto. El PEG es útil para estabilizar proteínas y como un crioprotector y puede usarse en la invención a este respecto, como lo es en Recombinate®.

iv. Tensioactivos

Las moléculas de proteínas son susceptibles a la adsorción en las superficies y a la desnaturalización y la consiguiente agregación en las interfaces aire-líquido, sólido-líquido y líquido-líquido. Estos efectos generalmente escalan inversamente con la concentración de proteínas. Estas interacciones perjudiciales generalmente escalan inversamente con la concentración de proteínas y generalmente se ven exacerbadas por la agitación física, tal como la que se genera durante el transporte y la manipulación de un producto.

Los tensioactivos se usan habitualmente para prevenir, minimizar o reducir la adsorción en la superficie. Los tensioactivos útiles en la invención a este respecto incluyen polisorbato 20, polisorbato 80, otros ésteres de ácidos grasos de polietoxilatos de sorbitán y poloxámero 188.

Los tensioactivos también se usan comúnmente para controlar la estabilidad conformacional de las proteínas. El uso de tensioactivos a este respecto es específico de proteínas ya que, cualquier tensioactivo dado generalmente estabilizará algunas proteínas y desestabilizará otras.

Los polisorbatos son susceptibles a la degradación oxidativa y, con frecuencia, tal como se suministra, contienen cantidades suficientes de peróxidos para provocar la oxidación de las cadenas laterales de los restos de proteínas, especialmente la metionina. En consecuencia, los polisorbatos deben usarse con cuidado, y cuando se usan, deben emplearse a su concentración eficaz más baja. A este respecto, los polisorbatos ejemplifican la regla general de que los excipientes deben usarse en sus concentraciones eficaces más bajas.

v. Antioxidantes

Una variedad de procesos puede dar como resultado la oxidación nociva de las proteínas en formulaciones farmacéuticas. Hasta cierto punto, se puede prevenir la oxidación perjudicial de las proteínas en las formulaciones farmacéuticas manteniendo niveles adecuados de oxígeno y temperatura ambiente y evitando la exposición a la luz. Los excipientes antioxidantes pueden usarse también para prevenir la degradación oxidativa de las proteínas. Entre los antioxidantes útiles a este respecto se encuentran los agentes reductores, los eliminadores de oxígeno/radicales libres y los agentes quelantes. Los antioxidantes para su uso en formulaciones de proteínas terapéuticas de acuerdo con la invención son preferentemente solubles en agua y mantienen su actividad durante el periodo de validez de un producto. El EDTA es un antioxidante preferido de acuerdo con la invención a este respecto y puede usarse en la invención de la misma manera que se ha usado en formulaciones de factor de crecimiento ácido de fibroblastos y en productos tales como Kineret® y Ontak®.

Los antioxidantes pueden dañar las proteínas. Por ejemplo, los agentes reductores, tal como glutatión, en particular, puede romper los enlaces disulfuro intramoleculares. Por lo tanto, los antioxidantes para su uso en la invención se seleccionan para, entre otras cosas, eliminar o reducir suficientemente su posibilidad de dañar las proteínas en la formulación.

vi. Iones Metálicos

Las formulaciones de acuerdo con la invención pueden incluir iones metálicos que son cofactores de proteínas y que son necesarios para formar complejos de coordinación de proteínas, tal como el zinc necesario para formar determinadas suspensiones de insulina. Los iones metálicos también pueden inhibir algunos procesos que degradan las proteínas. Sin embargo, los iones metálicos también pueden catalizar procesos físicos y químicos que degradan proteínas.

Los iones de magnesio (10-120 mM) pueden usarse para inhibir la isomerización del ácido aspártico en ácido isoaspártico. Los iones Ca^{+2} (hasta 100 mM) pueden aumentar la estabilidad de la desoxirribonucleasa humana (rhDNasa, Pulmozyme®). Mg^{+2} , Mn^{+2} , y Zn^{+2} , sin embargo, pueden estabilizar la rhDNasa. De manera similar, Ca^{+2} y Sr^{+2} pueden estabilizar el Factor VIII, que se puede desestabilizar por Mg^{2+} , Mn^{+2} y Zn^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+2} , y su agregación se puede aumentar por iones Al^{+3} .

vii. Conservantes

Los conservantes son necesarios cuando se desarrollan formulaciones parenterales multidosis que implican más de una extracción del mismo envase. Su función principal es inhibir el crecimiento microbiano y garantizar la esterilidad del producto durante el periodo de validez o la duración de uso del producto farmacológico. Los conservantes utilizados comúnmente incluyen alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Aunque los conservantes tienen una larga historia de uso con parenterales de moléculas pequeñas, el desarrollo de formulaciones de proteínas que incluyen conservantes puede ser un desafío. Los conservantes casi siempre tienen un efecto desestabilizador (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha convertido en un factor importante para limitar su uso en formulaciones de proteínas multidosis. Hasta la fecha, la mayoría de los fármacos proteicos se han formulado para un solo uso. Sin embargo, cuando son posibles las formulaciones multidosis, tienen la ventaja adicional de permitir la conveniencia del paciente y una mayor capacidad de comercialización. Un buen ejemplo es el de la hormona del crecimiento humana (hGH, por sus siglas en inglés), donde el desarrollo de formulaciones conservadas ha llevado a la comercialización de presentaciones de plumas de inyección más convenientes y de usos múltiples. Al menos cuatro de estos dispositivos de pluma de inyección que contienen formulaciones conservadas de hGH están actualmente disponibles en el mercado. Norditropin® (líquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ® (líquido, Genentech) & Genotropin (liofilizado- cartucho de doble cámara, Pharmacia & Upjohn) contiene fenol mientras que Somatrop® (Eli Lilly) está formulado con m-cresol.

Se deben considerar varios aspectos durante la formulación y el desarrollo de formas de dosificación conservadas. Se debe optimizar la concentración eficaz de conservantes en el producto farmacológico. Esto requiere probar un conservante dado en la forma de dosificación con intervalos de concentración que confieren eficacia antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de las proteínas. Por ejemplo, se exploraron con éxito tres conservantes en el desarrollo de una formulación líquida para el receptor de interleucina-1 (Tipo I) utilizando calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés). Los conservantes se ordenaron basándose en su impacto en la estabilidad a concentraciones comúnmente utilizadas en productos comercializados.

Como cabría esperar, el desarrollo de formulaciones líquidas que contienen conservantes es más difícil que de formulaciones liofilizadas. Los productos liofilizados pueden liofilizarse sin el conservante y reconstituirse con un diluyente que contenga conservante en el momento de uso. Esto acorta el tiempo durante el cual un conservante está en contacto con la proteína, minimizando significativamente los riesgos de estabilidad asociados. Con formulaciones líquidas, la eficacia y la estabilidad del conservante deben mantenerse durante todo el periodo de validez del producto (~18 a 24 meses). Un punto importante a tener en cuenta es que la eficacia del conservante debe demostrarse en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes excipientes.

Las formulaciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con la invención, particularmente las formulaciones de proteínas biofarmacéuticas autotamponantes, generalmente se diseñarán para rutas y métodos de administración específicos, para dosis de administración específicas y frecuencias de administración, para tratamientos específicos de enfermedades específicas, con intervalos de biodisponibilidad y persistencia, entre otras cosas.

Por lo tanto, las formulaciones pueden diseñarse de acuerdo con la invención para el suministro por cualquier vía adecuada, incluyendo, pero sin limitación, oral, auditiva, oftálmica, rectal y vaginal, y por vía parenteral, incluyendo inyección intravenosa e intraarterial, inyección intramuscular e inyección subcutánea.

b. Formulaciones para Administración Parenteral

Las formulaciones para administración parenteral pueden estar en forma de soluciones o suspensiones para inyección estériles isotónicas acuosas o no acuosas. Estas soluciones y suspensiones pueden prepararse a partir de polvos o gránulos estériles usando uno o más de los transportadores o diluyentes mencionados para su uso en las formulaciones para administración oral o utilizando otros agentes dispersantes o humectantes y agentes de suspensión adecuados.

Cuando se contempla la administración parenteral, las composiciones terapéuticas para su uso en esta invención pueden estar en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable, sin pirógenos, que comprende la proteína deseada en un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo particularmente adecuado para la inyección parenteral es el agua pura estéril en la que la proteína se formula como una solución isotónica autotamponante estéril.

Dichas preparaciones también pueden implicar la formulación de la proteína deseada en forma de, entre otras cosas, microesferas inyectables, partículas bioerosionables, compuestos poliméricos (ácido poliláctico, ácido poliglicólico), perlas o liposomas, incluidos los que proporcionan un control o liberación sostenida. Dichas formulaciones pueden introducirse mediante dispositivos implantables de suministro de fármacos, entre otros.

Las formulaciones para administración parenteral también pueden contener sustancias que ajustan la viscosidad, tales como carboximetilcelulosa, sorbitol y dextrano. Las formulaciones también pueden contener ingredientes que aumentan la solubilidad de la proteína deseada u otros ingredientes y aquellos que estabilizan uno o más de dichos ingredientes, incluyendo en algunos casos, la proteína autotamponante.

c. Formulaciones para Administración Pulmonar

Una composición farmacéutica de acuerdo con determinadas realizaciones de la invención puede ser adecuada para inhalación. Para la administración pulmonar, la composición farmacéutica puede administrarse en forma de aerosol o con un inhalador que incluye aerosol de polvo seco. Por ejemplo, se puede formular un agente de unión como un polvo seco para inhalación. Las soluciones para inhalación también pueden formularse con un propelente para la administración de aerosoles. En otra realización más, las soluciones se pueden nebulizar. La administración pulmonar se describe adicionalmente en la Solicitud PCT N.º PCT/US94/001875, que describe el suministro pulmonar de proteínas modificadas químicamente.

c. Formulaciones para Administración Oral

Para administración oral, la composición farmacéutica puede estar en forma de, por ejemplo, un comprimido, cápsula, suspensión o líquido. La composición farmacéutica se prepara preferentemente en forma de una unidad de dosificación que contiene una cantidad particular del principio activo. Ejemplos de tales unidades de dosificación son comprimidos o cápsulas. Las formulaciones para administración oral de acuerdo con la invención a este respecto pueden prepararse convencionalmente en donde la proteína autotamponante proporciona el tamponamiento en la formulación como se describe en otra parte del presente documento.

e. Formulaciones de Liberación Controlada

Entre las formulaciones adicionales que pueden ser útiles en la invención como se describe en el presente documento están las formulaciones de suministro sostenido y controlado. Los expertos en la materia conocen bien las técnicas para preparar tales formulaciones de suministro sostenido y controlado que pueden usarse de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones preferidas de la invención. Entre estas se encuentran métodos de administración que usan transportadores de liposomas, micropartículas bioerosionables, perlas porosas y matrices de polímeros semipermeables, como las descritas en el documento PCT/US93/00829; el documento U.S. 3,773,919; el documento EP 58.481; Sidman et al., Biopolymers, 22:547-556 (1983); Langer et al., J. Biomed. Mater. Res., 15:167-277, (1981); Langer et al., Chem. Tech., 12:98-105(1982); el documento EP 133.988; Eppstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82:3688-3692 (1985); el documento EP 36.676; el documento EP 88.046; y el documento EP 143.949, particularmente en las partes relacionadas con las formulaciones de proteínas farmacéuticas de suministro controlado y sostenido de autotamponantes de acuerdo con la invención descrita en el presente documento.

f. Esterilización

La composición farmacéutica a utilizar para la administración *in vivo* generalmente debe ser estéril. Esto se puede lograr mediante filtración a través de membranas de filtración estériles. Cuando la composición está liofilizada, la esterilización usando este método puede realizarse bien antes o después de la liofilización y la reconstitución. La composición para administración parenteral puede almacenarse en forma liofilizada o en solución. Además, las composiciones parenterales generalmente se colocan en un envase que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

g. Almacenamiento

Una vez que se ha formulado la composición farmacéutica, se puede almacenar en viales estériles como una solución, suspensión, gel, emulsión, sólido o un polvo deshidratado o liofilizado. Tales formulaciones pueden almacenarse en una forma lista para su uso o en una forma (por ejemplo, liofilizada) que se reconstituye antes de la administración.

h. Agentes Farmacéuticos Adicionales

Las composiciones de proteínas autotamponantes de acuerdo con la invención, particularmente las composiciones de proteínas farmacéuticas autotamponantes, pueden comprender además de la proteína autotamponante de la composición, uno o más agentes farmacéuticos adicionales. Dichos agentes también pueden ser proteínas, o pueden ser otros tipos de agentes. Entre dichos agentes se incluyen aquellos para la prevención o el tratamiento de cualquier trastorno o enfermedad. Dichos agentes incluyen, por ejemplo, antibióticos y antimicóticos. También incluyen agentes para tratar trastornos humanos, incluyendo pero sin limitación, agentes para tratar una enfermedades inflamatorias, cánceres, trastornos metabólicos, trastornos neurológicos y renales, por nombrar solo algunos. Los agentes que pueden usarse en la invención a este respecto también incluyen agentes útiles para aumentar la acción de una composición autotamponante y/o prevenir, mejorar o tratar cualquier efecto secundario no deseable de la administración de la misma.

i. Métodos para Preparar Formulaciones de Proteínas Autotamponantes

Las composiciones de acuerdo con la invención pueden producirse usando métodos habituales bien conocidos para preparar, formular y usar proteínas, particularmente proteínas farmacéuticas. En algunas de las realizaciones preferidas de varios aspectos de la invención a este respecto, los métodos para preparar las composiciones comprenden el uso de contraiones para eliminar los agentes tamponantes residuales. A este respecto, el término contraión es cualquier constituyente polar o cargado que actúa para desplazar el tampón de la composición durante su preparación. Los contraiones útiles a este respecto incluyen, por ejemplo, glicina, cloruro, sulfato y fosfato. El término contraión a este respecto se usa para referirse a lo mismo que ión de desplazamiento.

Los agentes tamponantes residuales se pueden eliminar utilizando los contraiones a este respecto, utilizando una variedad de métodos bien conocidos, incluyendo pero sin limitación, métodos convencionales de diálisis y métodos basados en difusión de membrana de alto rendimiento, como la diafiltración por flujo tangencial. Los métodos para la eliminación del tampón residual que emplean un contraión a este respecto también pueden, en algunos casos, llevarse a cabo usando cromatografía de exclusión por tamaño.

En determinadas realizaciones preferidas relacionadas a este respecto, las composiciones de acuerdo con la invención se preparan mediante un proceso que implica diálisis contra una solución sin tampón a un pH inferior al de la preparación que contiene la proteína autotamponante. En realizaciones particularmente preferidas de la invención a este respecto, la solución sin tampón comprende contraiones, particularmente aquellos que facilitan la eliminación del tampón residual y no afectan negativamente a la proteína autotamponante o a la formulación de la misma. En realizaciones particularmente preferidas adicionales de la invención a este respecto, después de la diálisis, el pH de la preparación se ajusta al pH deseado utilizando ácido diluido o base diluida.

En determinadas realizaciones preferidas particularmente relacionadas a este respecto, las composiciones de acuerdo con la invención se preparan mediante un proceso que implica diafiltración contra una solución sin tampón a un pH inferior al de la preparación que contiene la proteína autotamponante. En realizaciones particularmente preferidas de la invención a este respecto, la solución sin tampón comprende contraiones, particularmente aquellos que facilitan la eliminación del tampón residual y no afectan negativamente a la proteína autotamponante o a la formulación de la misma. En realizaciones particularmente preferidas adicionales de la invención a este respecto, después de la diafiltración, el pH de la preparación se ajusta al pH deseado utilizando ácido diluido o base diluida.

5. Vías de administración

Las formulaciones de acuerdo con la invención, en diversas realizaciones, puede administrarse por una variedad de vías adecuadas, bien conocidas por los expertos en la materia de administrar agentes terapéuticos a un sujeto. En realizaciones de la invención a este respecto, una o más formulaciones, como se describen en otra parte en el presente documento, se administran a través del tubo digestivo. En otras realizaciones, una o más formulaciones como las

descritas en otra parte del presente documento se administran por vía parenteral. En diversas realizaciones, una o más formulaciones pueden administrarse a través del tubo digestivo junto con una o más de formulaciones diferentes administradas por vía parenteral.

5 Dichas rutas en una variedad de realizaciones incluyen, pero sin limitación, la administración de las composiciones por vía oral, ocular, mucosa, tópica, rectal, pulmonar, tal como por pulverización para inhalación y epicutánea. Las siguientes vías de administración parenteral también son útiles en diversas realizaciones de la invención: administración por inyección intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intraespinal, intratecal, intraósea, intraarticular, intrasinovial, intracutánea, intradérmica, subcutánea, peritoneal y/o intramuscular. En algunas realizaciones, se usan inyecciones intravenosa, intraarterial, intracutánea, intradérmica, subcutánea y/o intramuscular. En algunas realizaciones, se usan inyecciones intravenosa, intraarterial, intracutánea, subcutánea y/o intramuscular.

En determinadas realizaciones de la invención, las composiciones se administran localmente, por ejemplo mediante inyección intraocular para tratar la neovascularización ocular, la retinopatía o la degeneración macular relacionada con la edad.

6. Dosis

La cantidad de una formulación de proteínas autotamponantes administrada y el régimen de dosificación para tratar una patología con la formulación depende de una diversidad de factores, incluyendo la edad, el peso, el sexo y el estado médico del sujeto, el tipo de enfermedad, la gravedad de la enfermedad, la vía y la frecuencia de administración y la formulación particular empleada. En particular, la cantidad dependerá de la proteína terapéutica a administrar y de cualquier otro agente terapéutico a administrar junto con la misma. Las dosis se pueden determinar para formulaciones de acuerdo con la invención usando procedimientos farmacéuticos habituales bien establecidos para este fin.

7. Pautas Posológicas

Las formulaciones de la invención pueden administrarse en dosificaciones y mediante técnicas bien conocidas por los expertos en las materia médica y veterinaria teniendo en cuenta factores tales como la edad, el sexo, el peso y la afección del paciente particular, y la formulación que se administrará (p. ej., sólido frente a líquido). Las dosis para seres humanos u otros mamíferos pueden determinarse sin experimentación excesiva por el experto en la materia, a partir de esta divulgación, los documentos citados en el presente documento y el conocimiento en la técnica.

De acuerdo con diversas realizaciones, las dosis y los programas de dosificación adecuados dependerán de numerosos factores y pueden variar en diferentes circunstancias. Los parámetros que determinarán los programas de dosificación óptimos que se administrarán típicamente incluirán algunos o todos los siguientes: la enfermedad a tratar y su fase; la especie del sujeto, su salud, el género, edad, peso y tasa metabólica; otros tratamientos que se están administrando; y las posibles complicaciones esperadas por el historial o genotipo del sujeto.

El programa de dosificación óptima en una situación dada también tendrá en consideración la naturaleza de la formulación, la forma en que se administra, la vía de distribución después de la administración y la velocidad a la que se aclarará tanto de los sitios de acción como del cuerpo del sujeto. Por último, la determinación de la dosificación óptima proporcionará preferentemente una dosis eficaz que no esté ni por debajo del umbral del efecto beneficioso máximo ni por encima del umbral en el que los efectos perjudiciales asociados con la dosis de los principios activos superen las ventajas del aumento de la dosis.

Se apreciará que se puede suministrar una "dosis" de una vez, de forma fraccionada o de forma continua durante un período de tiempo. La dosis completa también puede suministrarse en un solo lugar o distribuirse de forma fraccionada en varios lugares. Asimismo, las dosis pueden permanecer iguales durante un tratamiento, o pueden variar.

En diversas realizaciones, las formulaciones de acuerdo con la invención, se administran en una dosis inicial y, después de ello, se mantienen mediante administraciones adicionales. Una formulación de la invención en algunas realizaciones se administra por un método inicialmente, y después se administra por el mismo método o por uno o más métodos diferentes. Las dosis de las administraciones en curso pueden ajustarse para mantener a determinados valores los niveles de los principios activos en el sujeto. En algunas realizaciones, las composiciones se administran inicialmente, y/o para mantener su nivel en el sujeto, mediante inyección intravenosa. En una variedad de realizaciones, se usan otras formas de administración.

Las formulaciones de la invención pueden administrarse en muchas frecuencias en un amplio intervalo de tiempos, incluyendo cualquier frecuencia e intervalo de tiempos adecuados que proporcione una dosis eficaz para el tratamiento. Las dosis pueden suministrarse de forma continua, administrarse cada pocas horas, una o más veces al día, cada día, cada dos días o varias veces a la semana, o con menos frecuencia. En algunas realizaciones, se administran durante períodos de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce, trece, catorce o más días. En algunas realizaciones, se administran durante períodos de uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez, once, doce o más meses. En una variedad de realizaciones, se administran durante períodos de uno,

dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, diez o más años. Las pautas adecuadas para la administración inicial y las dosis adicionales para administraciones secuenciales pueden ser todas iguales o pueden ser variables. Las pautas apropiadas pueden establecerse por el experto en la materia, a partir de esta divulgación, los documentos citados en el presente documento y el conocimiento en la técnica. En general, las duraciones de tratamiento serán proporcionales a la duración del proceso patológico, la eficacia de los tratamientos que se están aplicando y el estado y respuesta del sujeto que se está tratando.

8. Enfermedades y Tratamientos

Las composiciones de proteínas farmacéuticas autotamponantes de acuerdo con la invención, en realizaciones preferidas, son para su uso en el tratamiento de sujetos que padecen una amplia variedad de trastornos y enfermedades. Como se observa en otra parte en el presente documento, la invención proporciona, entre otros, composiciones autotamponantes de anticuerpos farmacéuticos, proteínas farmacéuticas derivadas de anticuerpos y proteínas farmacéuticas relacionadas con anticuerpos, que pueden comprender funciones efectoras de Fc y dominios de unión específicos para una amplia variedad de dianas relacionadas con la enfermedad y que son útiles para tratar la enfermedad. Estas proteínas y las composiciones autotamponantes de las mismas se describen en detalle en el presente documento anteriormente, así como su uso en el tratamiento de diversos trastornos y enfermedades asociadas con sus dianas. Los métodos para usar las composiciones, incluyendo métodos de formulación, métodos de administración, dosis y métodos de dosificación se describen en su totalidad de manera ilustrativa anteriormente. La formulación y administración de cualquier composición particular de la invención se puede adaptar al tratamiento de una enfermedad particular, utilizando técnicas conocidas y habituales en la técnica para hacerlo, a la luz de la guía proporcionada por la presente descripción de la invención. Entre las enfermedades tratadas de manera útil usando formulaciones de proteínas farmacéuticas autotamponantes de acuerdo con diversos aspectos y realizaciones preferidas de la invención están las enfermedades inflamatorias, cánceres, trastornos metabólicos, trastornos neurológicos y renales, por nombrar solo algunos.

9. Envasado y Kits

La invención también proporciona kits que comprenden formulaciones de proteínas autotamponantes, particularmente kits que comprenden en uno más envases, una formulación de proteínas farmacéuticas autotamponantes e instrucciones con respecto al uso de las mismas, particularmente tales kits en los que la formulación es una formulación farmacéuticamente aceptable para uso humano. Entre los kits preferidos están aquellos que comprenden uno o más envases de una formulación de proteínas autotamponantes de la invención y uno o más documentos por separado, información relacionada con el contenido del kit y/o el uso de su contenido, particularmente aquellos en los que la proteína es una proteína biofarmacéutica, especialmente aquellas en las que la proteína es una proteína biofarmacéutica formulada para el tratamiento de una enfermedad en seres humanos.

En determinados aspectos de la invención a este respecto, los kits preferidos incluyen kits como los anteriores que comprenden además una o más jeringas de una o más cámaras (por ejemplo, jeringas líquidas y liojeringas) para administrar una o más formulaciones de proteínas autotamponantes de la invención. En determinados aspectos de la invención a este respecto, algunos de los kits particularmente preferidos comprenden además jeringas precargadas. En realizaciones preferidas particularmente adicionales a este respecto, los kits comprenden una composición farmacéutica autotamponante para administración parenteral, sellada en un vial al vacío parcial en una forma lista para cargar en una jeringa y administrar a un sujeto. En realizaciones especialmente preferidas a este respecto, la composición está dispuesta en la misma al vacío parcial. En todos estos aspectos y en otros, en determinadas realizaciones particularmente preferidas adicionales, los kits contienen uno o más viales de acuerdo con cualquiera de los anteriores, en donde cada vial contiene una dosis unitaria única para la administración a un sujeto. En todos estos aspectos y otros, la invención se refiere además a kits que comprenden liofilizados, dispuestos como anteriormente, que después de la reconstitución proporcionan composiciones de acuerdo con la misma. A este respecto, la invención proporciona además, en algunas de sus realizaciones preferidas, kits que contienen un liofilizado de acuerdo con la invención y un diluyente estéril para reconstituir el liofilizado.

Ejemplos

La presente invención se describe adicionalmente por medio de los siguientes Ejemplos ilustrativos no limitantes.

Ejemplo 1: Titulaciones Ácido y Capacidades Tampón de los Tampones de Acetato de Sodio en el Intervalo de pH 5,0 a 4,0

Se preparó una solución de reserva de concentración conocida de ácido acético diluyendo ácido acético glacial ultra puro en agua de grado HPLC y después titulando el pH hasta el valor deseado con NaOH. Las reservas se equilibraron al aire y a 21 °C. Los patrones volumétricos se prepararon a una concentración de 1 N y se diluyeron según fuera necesario con agua de HPLC.

Se prepararon tampones de acetato de sodio uno mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM y 15 mM diluyendo la reserva en agua de HPLC. Las soluciones se titularon con HCl. Se usó HCl 0,2 N para las soluciones 1, 2,5 y 5 mM, se usó

HCl 0,4 N para la solución 7,5 mM y se usó HCl 0,8 N para las soluciones 10 y 15 mM. Las titulaciones se realizaron utilizando técnicas analíticas de laboratorio convencionales.

5 Figura 1, el panel A muestra los datos de titulación y las líneas de tendencia de mínimos cuadrados calculadas a partir de los datos para cada solución. La pendiente de la línea de tendencia calculada a partir de cada conjunto de datos se tomó como la capacidad tampón del tampón de acetato correspondiente. La dependencia lineal de la capacidad tampón con la concentración del tampón de acetato se muestra en la Figura 1, Panel B.

10 Ejemplo 2: Titulaciones Base y Capacidades Tampón de los Tampones de Acetato de Sodio en el Intervalo de pH 5,0 a 5,5

15 Se prepararon reservas de tampón de acetato y soluciones para titulación como se describe en el Ejemplo 1. Las soluciones se titularon como se describe en el Ejemplo 1, excepto que las soluciones se titularon de pH 5,0 a 5,5 y las titulaciones se realizaron usando NaOH en lugar de HCl. Se usó NaOH 0,2 N para titular las soluciones 1, 2,5 y 5 mM y se usó NaOH 0,4 N para las soluciones 7,5, 10 y 15 mM. Los resultados de las titulaciones se muestran en la Figura 2A. La dependencia lineal de la capacidad tampón con la concentración de tampón de acetato se muestra en la Figura 2B.

20 Ejemplo 3: Determinación de Acetato por HPLC

25 Se determinó el acetato en muestras de tampón de acetato usando SE-HPLC analítica. Se estableció una curva patrón para áreas máximas en función de la concentración de acetato mediante análisis de acetato en tampones de concentración de acetato conocida. La cantidad de acetato en las muestras de prueba se interpoló a partir de la curva patrón. Una curva patrón se muestra en la Figura 3. La cantidad nominal y medida de acetato en los tampones de prueba se tabula debajo de la curva patrón en la figura.

Ejemplo 4: Titulaciones ácido de Formulaciones de Ac-hOPGL en el Intervalo de pH 5,0 a pH 4,0

30 Se diafiltró Ac-hOPGL a granel en acetato 10 mM (valor nominal), sorbitol al 5 %, pH 5,0 contra sorbitol al 5,25 %, pH 3,2 (ajustado con HCl) en un sistema LABSCALE TFF® (Millipore) con un casete de multifiltro, usando membranas de ultrafiltración de celulosa regenerada 3 Millipore Pellicon XL 50. La solución de diafiltración se intercambió de 8 a 10 veces durante el transcurso de la diafiltración para cada formulación. Después de la diafiltración, se midió el pH de la solución sin tampón resultante y se ajustó a pH 5,0, usando HCl 0,05 N o NaOH 0,05 N.

35 Se prepararon soluciones de uno, 10, 30, 60, 90, y 110 mg/ml para la titulación por dilución. El pH de cada dilución se ajustó a pH 5,0 con NaOH o HCl según fuera necesario. Las titulaciones se llevaron a cabo como se describe en los Ejemplos anteriores. Se usó HCl 0,2 N para titular las soluciones de 1, 10, y 30 mg/ml. Se usó HCl 0,4 N para titular la solución de 60 mg/ml. Se usó HCl 0,8 N para titular las soluciones de 90 y 110 mg/ml.

40 Los resultados de las titulaciones se representan en la Figura 4. La línea de regresión de mínimos cuadrados se muestra para el conjunto de datos para cada concentración. La capacidad tampón se tomó como la pendiente de la línea de regresión para cada concentración.

45 Ejemplo 5: Titulaciones Base de Formulaciones de Ac-hOPGL en el Intervalo de pH 5,0 a pH 6,0

50 Se prepararon soluciones de uno, 10, 30, 60, 90, y 110 mg/ml de Ac.hOPGL para titulación como se describe en el Ejemplo 4. Las titulaciones base se llevaron a cabo usando NaOH como se describe en los Ejemplos anteriores. Se usó NaOH 0,2 N para las soluciones de 1, 10, 30 y 60 mg/ml y se usó NaOH 0,4 N para las soluciones de 90 y 110 mg/ml.

Los resultados de las titulaciones se representan en el gráfico en la Figura 5. Las líneas de regresión lineal se muestran para los datos para cada concentración. La capacidad tampón se tomó como la pendiente de la línea de regresión para cada concentración.

55 Ejemplo 6: Niveles Residuales de Acetato en Formulaciones de Ac-hOPGL autotamponantes

60 La cantidad de acetato residual se determinó en formulaciones de Ac-hOPGL usando los métodos descritos en el Ejemplo 3. Los resultados se representan gráficamente en la Figura 6, que muestra una curva patrón que relaciona las mediciones por HPLC con las concentraciones de acetato y, debajo del gráfico, una tabulación de los resultados de las determinaciones hechas en formulaciones de Ac-hOPGL a diferentes concentraciones. Las concentraciones de Ac-hOPGL se indican a la izquierda ("Nominal") y la concentración medida de acetato en cada una de las concentraciones de Ac-hOPGL se indica a la derecha.

65 Ejemplo 7: Capacidad tampón de las Formulaciones de Ac-hOPGL Más o Menos Acetato Residual en el Intervalo de pH 5,0 a 4,0

Se prepararon formulaciones de Ac-hOPGL autotamponadas y se titularon con HCl como se describe en los Ejemplos anteriores. Además, los datos se ajustaron restando la contribución del tampón de acetato residual basándose en la determinación del contenido de acetato por SE-HPLC como se describe en, por ejemplo, el Ejemplo 3. Las capacidades tampón se determinaron como se describe anteriormente. Se realizó el mismo análisis en ambos conjuntos de datos. Los resultados, representados en la Figura 7, muestran el efecto del acetato residual sobre la capacidad tampón de las preparaciones de Ac-hOPGL. Los resultados dejan en claro que la capacidad tampón del acetato residual es un factor menor en la capacidad tampón de las formulaciones de Ac-hOPGL autotamponantes que se analizaron.

10 Ejemplo 8: Capacidad tampón de Ac-hOPGL Más o Menos Acetato Residual en el Intervalo de pH 5,0 a 6,0

Se prepararon formulaciones de Ac-hOPGL autotamponadas y se titularon con NaOH como se describe en los Ejemplos anteriores. Además, los datos se ajustaron restando la contribución del tampón de acetato residual basándose en la determinación del contenido de acetato por SE-HPLC como se describe en, por ejemplo, el Ejemplo 3. Las capacidades tampón se determinaron como se describe anteriormente. Se realizó el mismo análisis en ambos conjuntos de datos. Los resultados, representados en la Figura 8, muestran el efecto del acetato residual sobre la capacidad tampón de las preparaciones de Ac-hOPGL. Los resultados dejan en claro que la capacidad tampón del acetato residual es un factor menor en la capacidad tampón de las formulaciones de Ac-hOPGL autotamponantes que se analizaron.

20 Ejemplo 9: pH y Estabilidad de Ac-hOPGL en Formulaciones Autotamponadas y Tamponadas Convencionalmente

Las formulaciones autotamponantes de Ac-hOPGL se prepararon como se describe en los Ejemplos anteriores. Además, se prepararon formulaciones que contenían un agente tamponante convencional, ya sea acetato o glutamato. Todas las formulaciones contenían 60 mg/ml de Ac-hOPGL. La estabilidad del pH y Ac-hOPGL en las formulaciones se controló durante seis meses de almacenamiento a 4 °C. La estabilidad se controló determinando Ac-hOPGL monomérico en las formulaciones durante el transcurso del tiempo de almacenamiento. La determinación se realizó usando SE-HPLC como se describe anteriormente. Los resultados para las tres formulaciones se muestran en la Figura 9. El panel A muestra la estabilidad de Ac-hOPGL en las tres formulaciones. La estabilidad en la formulación autotamponada es tan buena como en las formulaciones tamponadas convencionalmente. El panel B muestra la estabilidad del pH de las tres formulaciones. De nuevo, la estabilidad del pH en la formulación autotamponada es tan buena como en las formulaciones tamponadas convencionalmente.

35 Ejemplo de referencia 1: Titulación y Capacidades Tampón de Ac-hB7RP1 - pH 5,0 a 4,0

Se prepararon formulaciones autotamponantes de Ac-hB7RP1 en concentraciones de 1, 10, 30 y 60 mg/ml, como se describe para Ac-hOPGL en los Ejemplos anteriores. Las titulaciones se llevaron a cabo utilizando HCl como se describe anteriormente. Además, los datos se ajustaron restando la contribución del tampón de acetato residual basándose en la determinación del contenido de acetato por SE-HPLC como se describe en, por ejemplo, el Ejemplo 3. La Figura 10, panel A muestra los resultados de las titulaciones. La Figura 10, panel B muestra la dependencia de la capacidad tampón con la concentración de las formulaciones de Ac-hB7RP1 antes y después de restar la contribución del tampón de acetato residual. Los resultados muestran claramente la capacidad autotamponante de Ac-hB7RP1 en este intervalo de pH. A 40 mg/ml, proporciona aproximadamente la misma capacidad tampón en este intervalo de pH que el tampón de acetato de sodio 10 mM. A 60 mg/ml, proporciona aproximadamente la misma capacidad tampón que el tampón de acetato de sodio 15 mM.

Ejemplo de referencia 21: Titulación y Capacidades Tampón de Ac-hB7RP1 - pH 5,0 a 6,0

Se prepararon formulaciones autotamponantes de Ac-hB7RP1 en concentraciones de 1, 10, 30 y 60 mg/ml, como se describe para Ac-hOPGL en los Ejemplos anteriores. Las titulaciones se llevaron a cabo utilizando NaOH como se describe anteriormente. Además, los datos se ajustaron restando la contribución del tampón de acetato residual basándose en la determinación del contenido de acetato por SE-HPLC como se describe en, por ejemplo, el Ejemplo 3. La Figura 11, panel A muestra los resultados de las titulaciones. La Figura 11, panel B muestra la dependencia de la capacidad tampón con la concentración de las formulaciones de Ac-hB7RP1 antes y después de restar la contribución del tampón de acetato residual. Los resultados muestran claramente la capacidad autotamponante de Ac-hB7RP1 en este intervalo de pH. A 60 mg/ml, proporciona aproximadamente la misma capacidad tampón en este intervalo de pH que el tampón de acetato de sodio 10 mM.

60 Ejemplo de referencia 3: Estabilidad de Ac-hB7RP1 en Formulaciones Autotamponantes y Tamponadas Convencionalmente a 4 °C y 29 °C

Ac-hB7RP1 se preparó como se describe en los Ejemplos de Referencia anteriores y se formuló como se describe anteriormente, en formulaciones autotamponantes y en formulaciones que usan un agente tamponante convencional, ya sea acetato o glutamato. Todas las formulaciones contenían 60 mg/ml de Ac-hB7RP1. La estabilidad del pH de las soluciones y de Ac-hB7RP1 en la solución se controló durante veintiséis meses de almacenamiento a 4 °C o a 29 °C. La estabilidad se controló determinando Ac-hB7RP1 monomérico en las formulaciones durante el transcurso del

tiempo de almacenamiento. La determinación se realizó usando SE-HPLC como se describe anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 12. El panel A muestra los resultados para el almacenamiento a 4 °C. El panel B muestra los resultados para el almacenamiento a 29 °C. Ac-hB7RP1 fue al menos tan estable en la formulación autotamponada a 4 °C como las formulaciones tamponadas convencionalmente. A 29 °C, la formulación autotamponada era al menos tan estable como las formulaciones tamponadas convencionalmente, y puede haber sido ligeramente mejor desde las 10 semanas hasta el último momento.

Ejemplo de referencia 4: estabilidad del pH de Ac-hB7RP1 autotamponado a 4 °C y 29 °C

El Ac-hB7RP1 autotamponado a 60 mg/ml se preparó como se describe en el Ejemplo de referencia anterior. El pH se controló a lo largo del tiempo y a las mismas temperaturas que se describen en el mismo. Los resultados se muestran en la Figura 13.

Ejemplo de referencia 5: Capacidad tampón de Formulaciones de Ac-hCD22- pH 4,0 a 6,0

Las formulaciones autotamponantes de Ac-hCD22 se prepararon y titularon en el intervalo de pH 5,0 a 4,0 y en el intervalo de 5,0 a 6,0, como se describe para Ac-hOPGL y Ac-hB7RP1 en los Ejemplos y Ejemplos de Referencia anteriores. Las capacidades tampón se calcularon a partir de los datos de titulación, también como se describe anteriormente. La capacidad tampón en función de la concentración se muestra en la Figura 14 para ambos intervalos de pH. El panel A muestra la capacidad tampón de las formulaciones de Ac-hCD22 en el intervalo de pH 5,0 a 4,0. La capacidad tampón depende linealmente de la concentración, y una formulación de aproximadamente 21 mg/ml de Ac-hCD22 tiene una capacidad tampón igual a la del tampón de acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, medida de la misma manera. El panel B muestra la capacidad tampón en función de la concentración en el intervalo de pH 5,0 a 6,0. En este intervalo de pH, una formulación de aproximadamente 30 mg/ml de Ac-hCD22 tiene una capacidad tampón igual a la del tampón de acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, medida de la misma manera.

Ejemplo de referencia 6: Titulación y Capacidades Tampón de Formulaciones de Ac-hIL4R - pH 5,0 a 4,0

Se prepararon formulaciones autotamponantes de Ac-hIL4R en concentraciones de 1, 10, 25 y 90 mg/ml, como se describe para Ac-hOPGL en los Ejemplos anteriores. Las titulaciones se llevaron a cabo utilizando HCl como se describe anteriormente. La Figura 15, panel A muestra los resultados de las titulaciones. La Figura 15, El panel B muestra la dependencia de la capacidad tampón de la concentración de Ac-hIL4R. Los resultados muestran claramente la capacidad autotamponante de Ac-hIL4R en este intervalo de pH. A aproximadamente 75 mg/ml, proporciona la misma capacidad tampón en este intervalo de pH que el tampón de acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, medida de la misma manera.

Ejemplo de referencia 7: Titulación y Capacidades Tampón de Formulaciones de Ac-hIL4R - pH 5,0 a 6,0

Se prepararon formulaciones autotamponantes de Ac-hIL4R en concentraciones de 1, 10, 25 y 90 mg/ml, como se describe para Ac-hOPGL en los Ejemplos anteriores. Las titulaciones se llevaron a cabo utilizando NaOH como se describe anteriormente. La Figura 16, panel A muestra los resultados de las titulaciones. La Figura 16, El panel B muestra la dependencia de la capacidad tampón de la concentración de Ac-hIL4R en este intervalo de pH. Los resultados muestran claramente la capacidad autotamponante de Ac-hIL4R en este intervalo de pH. A aproximadamente 90 mg/ml, proporciona la misma capacidad tampón en este intervalo de pH que el tampón de acetato de sodio 10 mM, pH 5,0, medida de la misma manera.

Ejemplo de referencia 8: Estabilidad de Ac-hIL4R y del pH en Formulaciones de Acetato y de Ac-hIL4R Autotamponadas a 37 °C

Se prepararon formulaciones autotamponadas y tamponadas con acetato de Ac-hIL4R a pH 5,0 y 70 mg/ml como se describe anteriormente. La estabilidad del pH y de Ac-hIL4R se monitorizaron en las formulaciones durante 4 semanas a 37 °C. La estabilidad de Ac-hIL4R se controló mediante SE-HPLC como se describe anteriormente. Los resultados se muestran en la Figura 17. El panel A muestra que Ac-hIL4R es al menos tan estable en la formulación autotamponada como en la formulación con tampón de acetato de sodio. El panel B muestra que el pH en la formulación autotamponada es tan estable como en la formulación de tampón de acetato de sodio.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de un anticuerpo recombinante y uno o más polioles farmacéuticamente aceptables, en donde al pH de la composición, a 21 ° C, a una atmósfera y en equilibrio con la atmósfera ambiente, el anticuerpo tiene una capacidad tampón por unidad de volumen de al menos la de aproximadamente el tampón de acetato de sodio 4,0 mM en agua pura en el intervalo de pH 5,0 a 4,0 o pH 5,0 a 5,5 en las mismas condiciones, y en donde además, excluyendo la capacidad tampón de dicho anticuerpo, la capacidad tampón por unidad de volumen de la composición en las mismas condiciones no es más que la del tampón de acetato de sodio 2,0 mM en agua pura en el intervalo de pH 5,0 a 4,0 o pH 5,0 a 5,5 en las mismas condiciones, en donde el anticuerpo proporciona al menos el 80 % de la capacidad tampón de la composición, en donde la concentración del anticuerpo está entre aproximadamente 20 y 400 mg/ml, en donde el pH mantenido por la acción tamponante del anticuerpo está entre aproximadamente 3,5 y 8,0, y en donde el anticuerpo comprende:

una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de:

E VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS YAMSWVRQAP GKGLEWVSGI
 TGSGGSTYYA DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL QMNSLRAEDT AVYYCAKDPG
 TTVIMSWFDP WGQGTLVTVS SASTKGPSVF PLAPCSRSTS ESTAALGCLV
 KDYFPEPVTV SWNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSNFGTQ
 TYTCNVDPKPTV SNTKVDKTE RKCCVECPPC PAPPVAGPSV FLFPPKPKDT
 LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQFNSTF
 RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT
 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPMLDS
 DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVNHE ALHNHYTQKS LSLSPGK;

y
 una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de:

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVR GRYLAWYQQK PGQAPRLLIY
 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVFCYQ QYGSSPRTFG
 QGDKVEIKRT VAAPSVFI FP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK
 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KVVACEVTHQ
 GLSSPVTKSF NRGEC.

2. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el pH mantenido por la acción tamponante del anticuerpo está entre aproximadamente 4 y 6.

3. Una composición de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además una o más sales farmacéuticamente aceptables.

4. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la concentración de sal total es inferior a 150 mM.

5. Una composición de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la concentración de sal total es inferior a 100 mM.

6. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el poliol es uno o más de sorbitol, manitol, sacarosa, trehalosa o glicerol.

7. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende además uno o más tensioactivos farmacéuticamente aceptables.

8. Una composición de acuerdo con la reivindicación 7, en donde el tensioactivo es uno o más de polisorbato 20, polisorbato 80, otros ésteres de ácidos grasos de sorbitán, polietoxilatos y poloxámero 188.

9. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el anticuerpo comprende un primer resto de unión de un par de restos de unión afines.

10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el anticuerpo es específico para OPGL.
- 5 11. Un liofilizado que tras la reconstitución proporciona una composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
12. Un kit que comprende en uno o más envases, una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 e instrucciones con respecto al uso del mismo o un liofilizado de acuerdo con la reivindicación 11 e instrucciones con respecto al uso del mismo.
- 10 13. Una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 para su uso en medicina.
14. Un proceso para preparar una composición de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que comprende eliminar el tampón residual usando un contraíón o mediante diafiltración contra una solución sin tampón que tiene un pH por debajo del pH deseado.
- 15 15. Un proceso para preparar una composición de acuerdo con la reivindicación 14, que comprende eliminar el tampón residual usando uno cualquiera o más de los siguientes en presencia de un contraíón: cromatografía de exclusión por tamaño, diálisis y/o filtración de flujo tangencial y/o cromatografía de intercambio iónico.

Figura. 1 Capacidad tampón de Acetato en intervalo de pH de 4,0-5,0

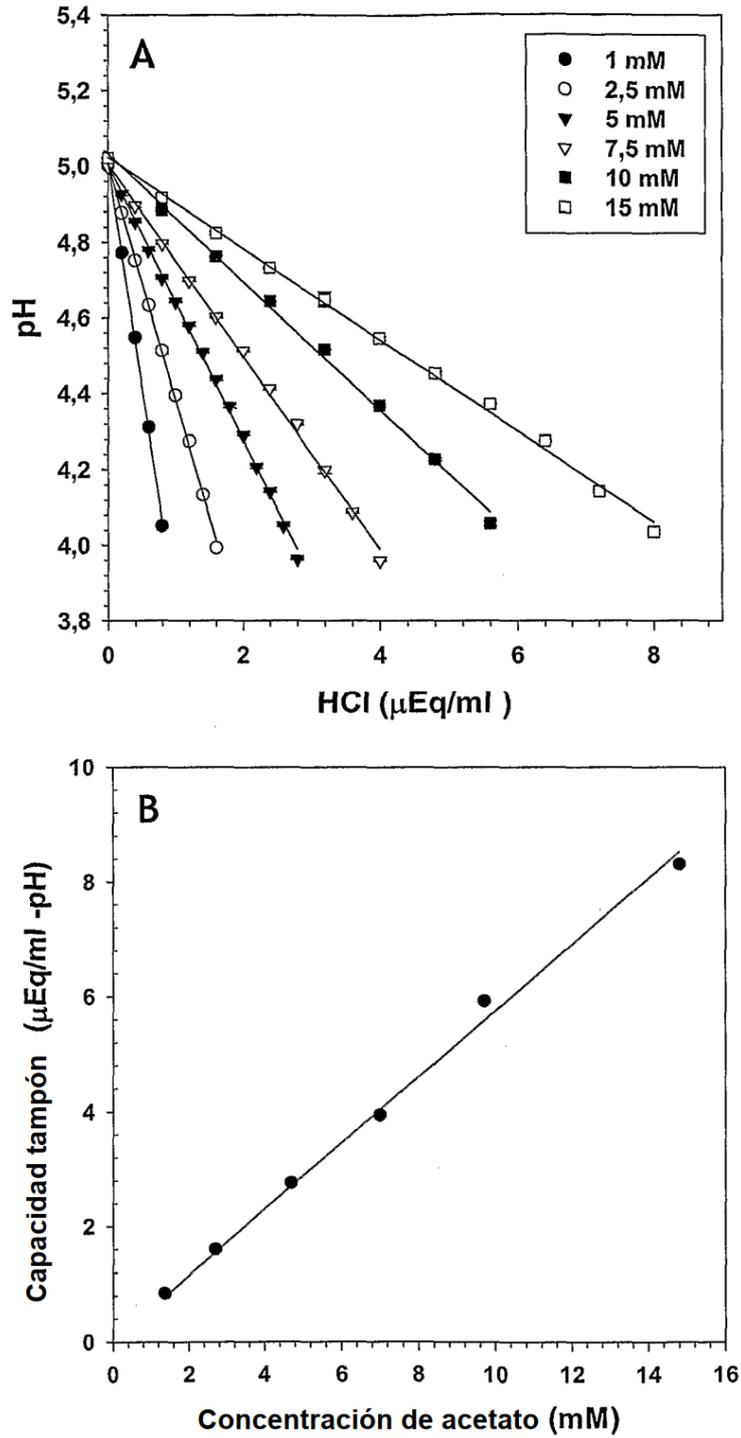


Figura 2. Capacidad tampón de Acetato en intervalo de pH de 5,0-5,5

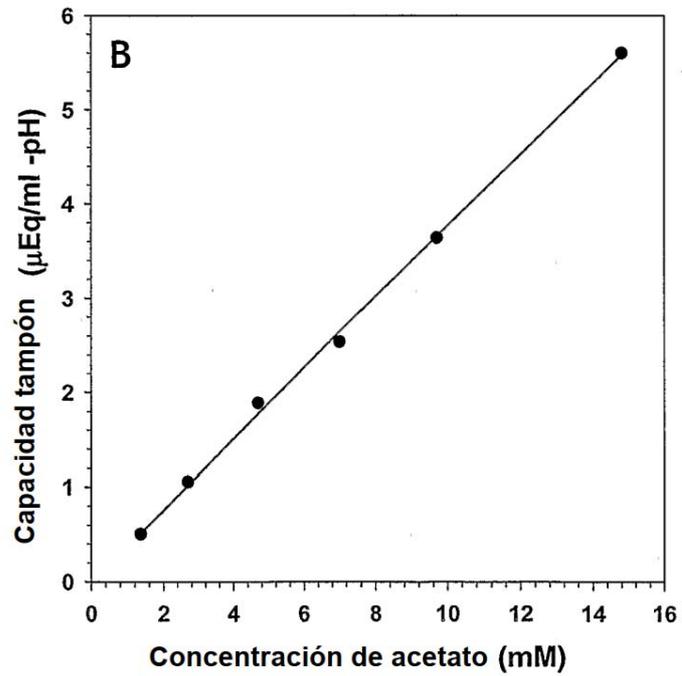
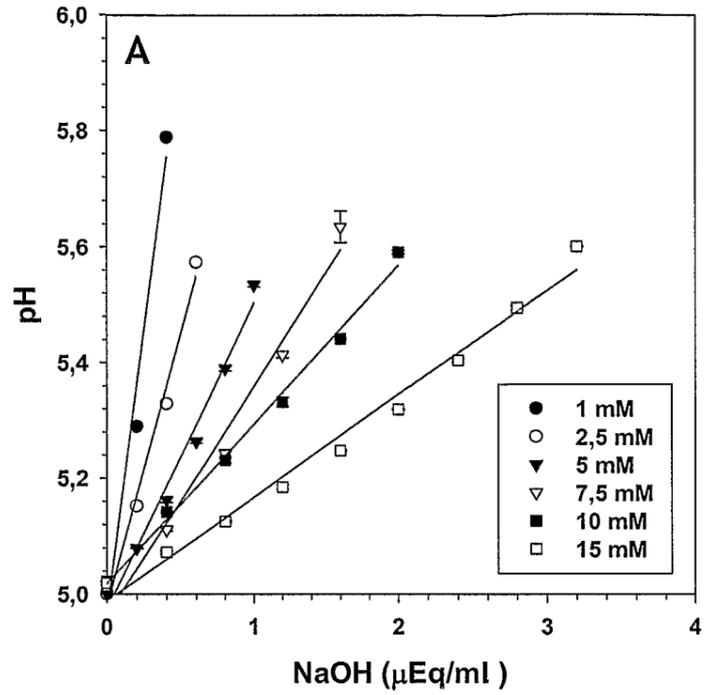
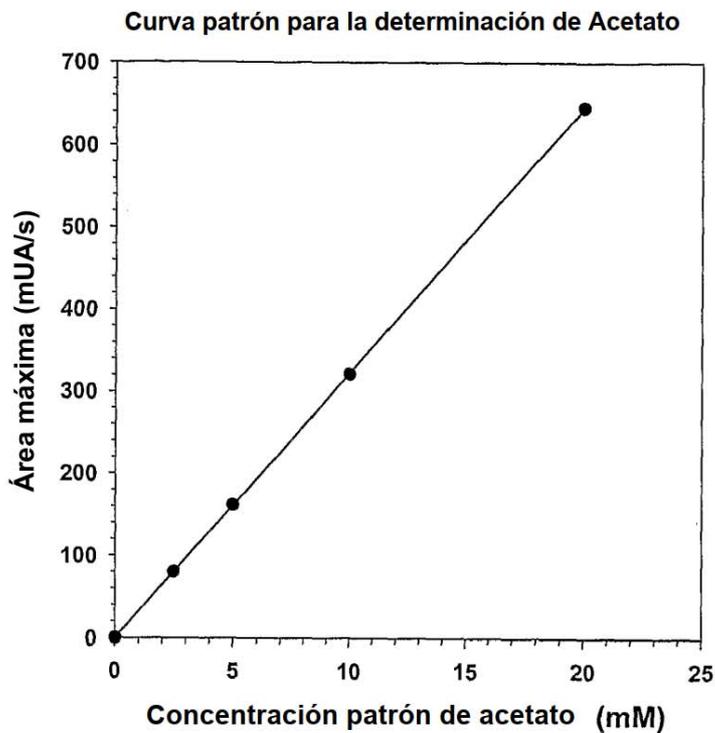


Figura 3. Determinación de la concentración de acetato en patrones de acetato usados para mediciones de la capacidad tampón



Valores de acetato determinados experimentalmente para soluciones usadas para determinar la capacidad tampón de acetato

Concentración de acetato (mM)	
Nominal	Experimental
1	1,37
2,5	2,7
5	4,7
7,5	7,0
10	9,7
15	14,8

Figura 4. Titulación ácido de soluciones de Ac-hOPGL

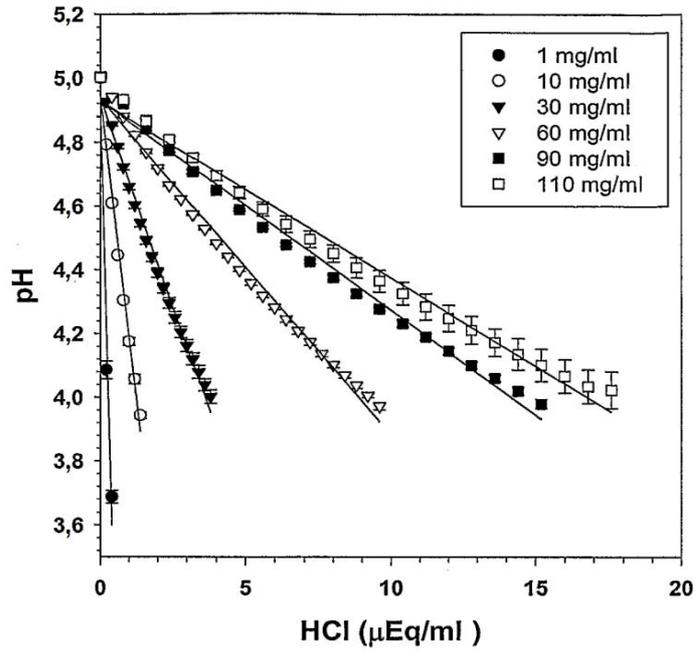


Figura 5. Titulación base de soluciones de Ac-hOPGL

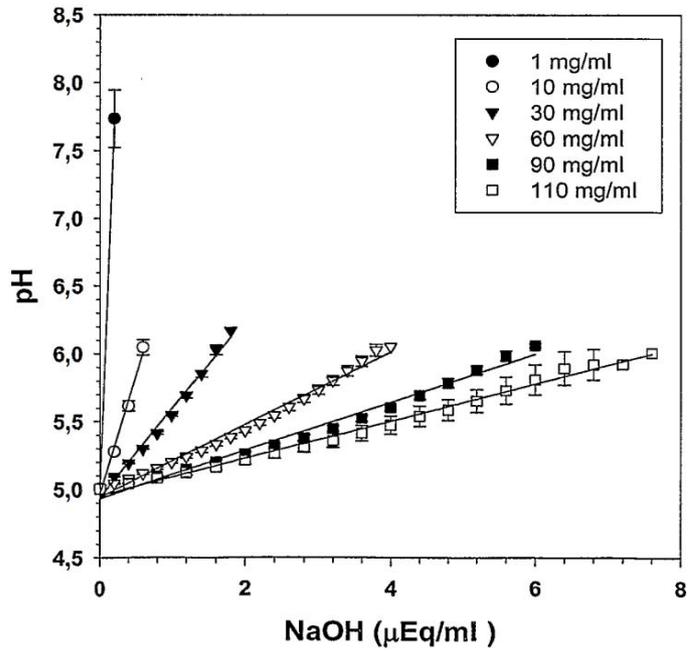
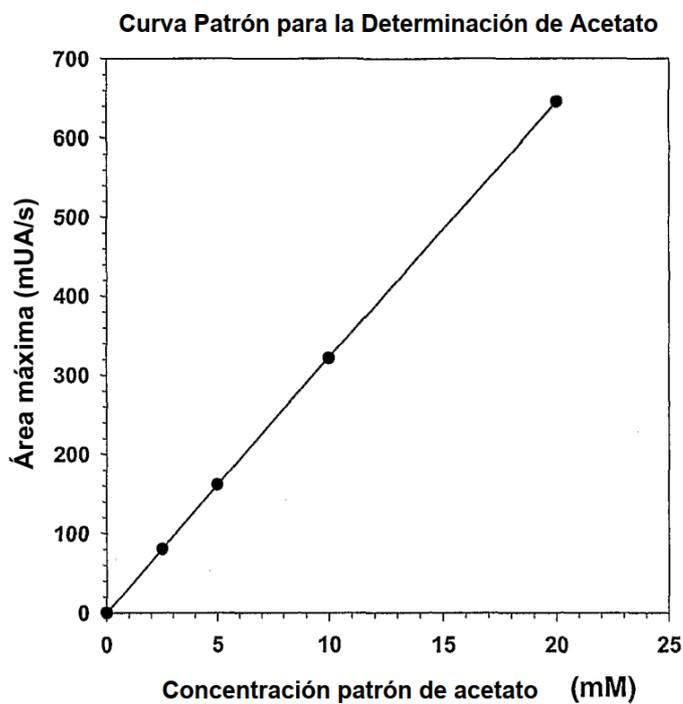


Figura 6. Determinación de los valores de acetato residual en soluciones de Ac-hOPGL para mediciones de Capacidad tampón



Valores de acetato residual en soluciones de Ac-hOPGL usadas para determinar la capacidad tampón

Concentración de acetato(mM)	
Nominal	Experimental
1	0,05
10	0,20
30	0,51
60	1,16
90	1,71
110	1,82

Figura 7. Capacidad tampón de Ac-hOPGL +/- acetato residual como una función de su concentración en el intervalo de pH de 4,0-5,0

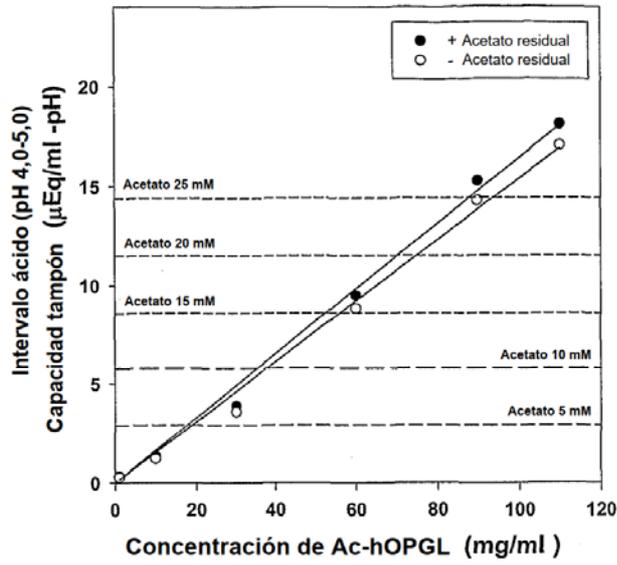


Figura 8. Capacidad tampón de Ac-hOPGL +/- acetato residual como una función de su concentración en el intervalo de pH de 5,0-6,0

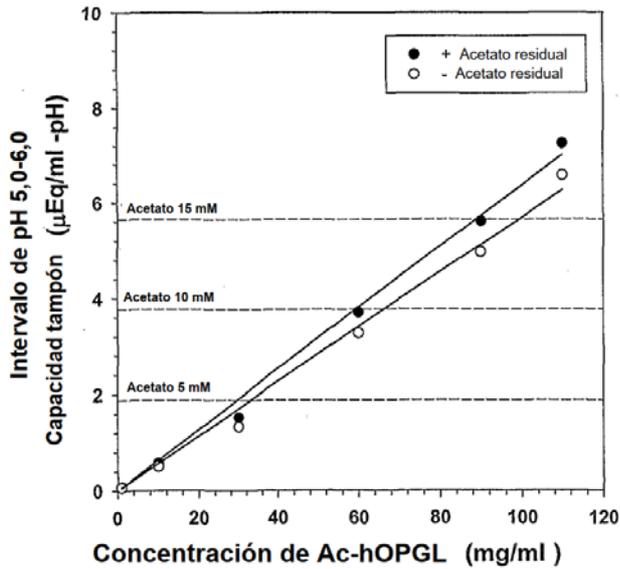


Figura 9. Estabilidad de la formulación de Ac-hOPGL Autotamponada, 60 mg/ml, en Comparación con las Formulaciones Tamponadas de Manera Convencional a 4 C

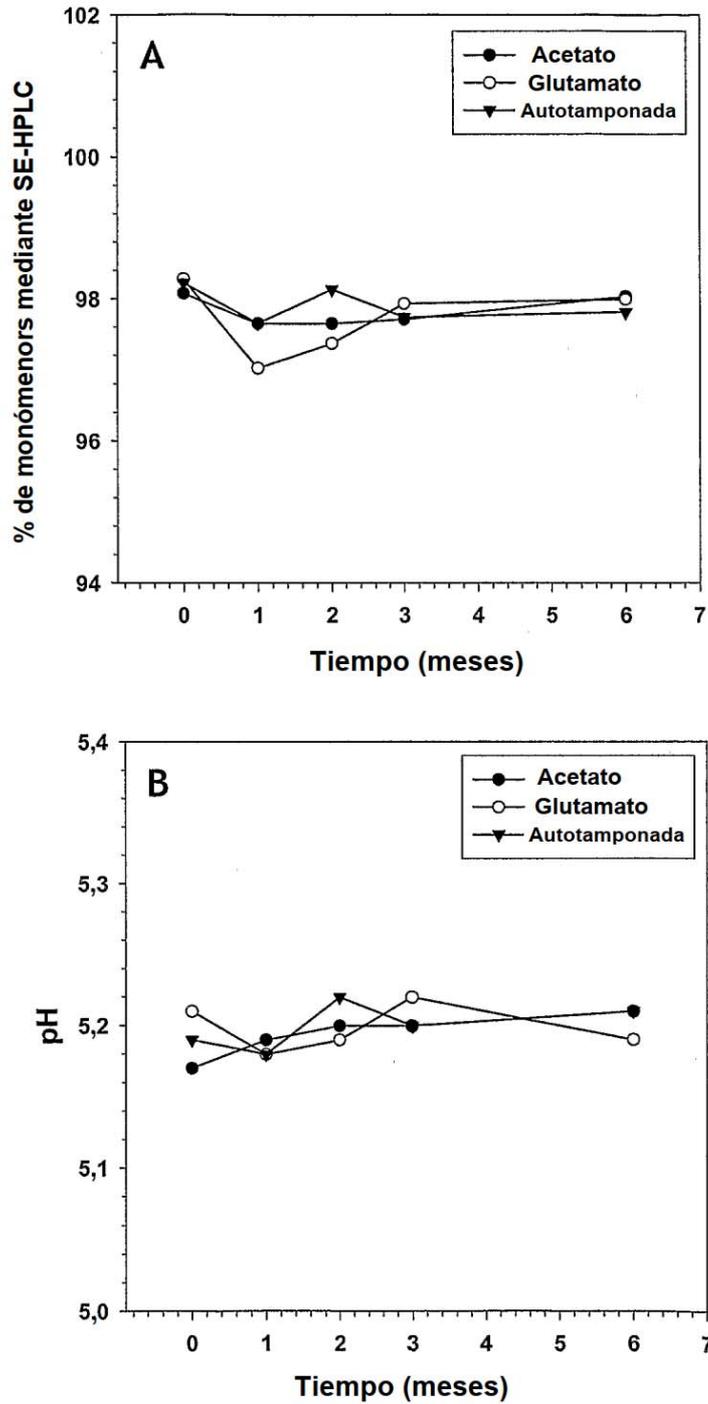


Figura 10. Capacidad tampón de Soluciones de Ac-hB7RP1 en el intervalo de pH de 4,0-5,0

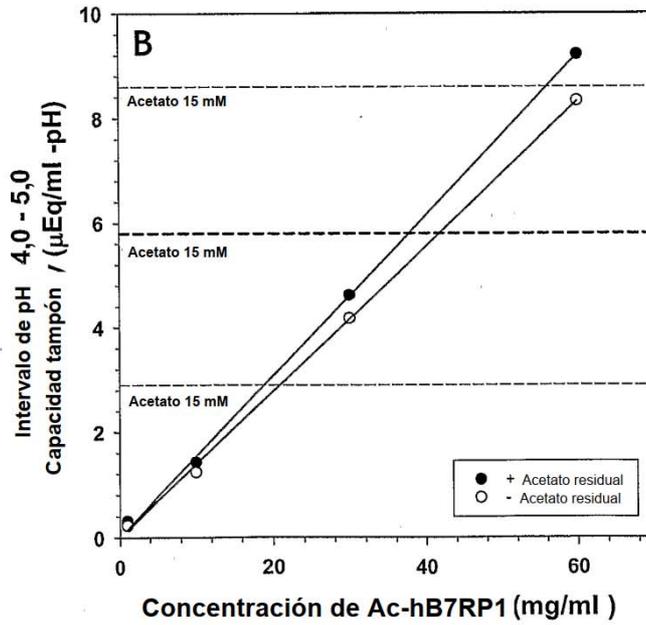
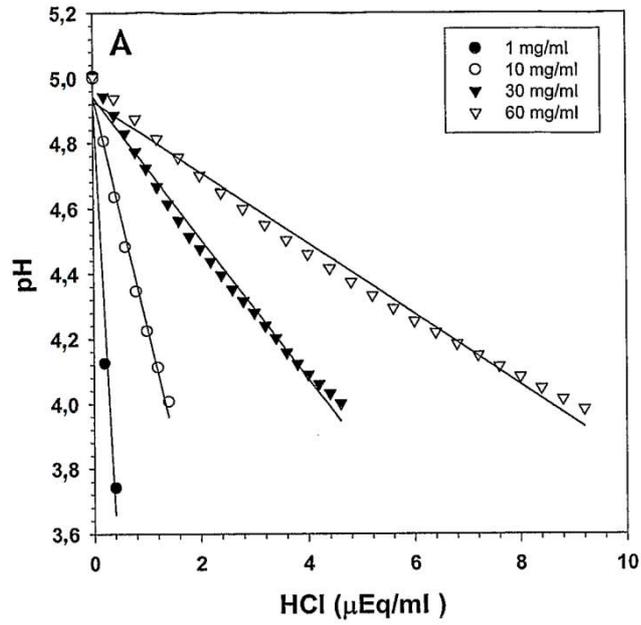


Figura 11. Capacidad tampón de Soluciones de Ac-hB7RP1 en el intervalo de pH de 5,0-6,0

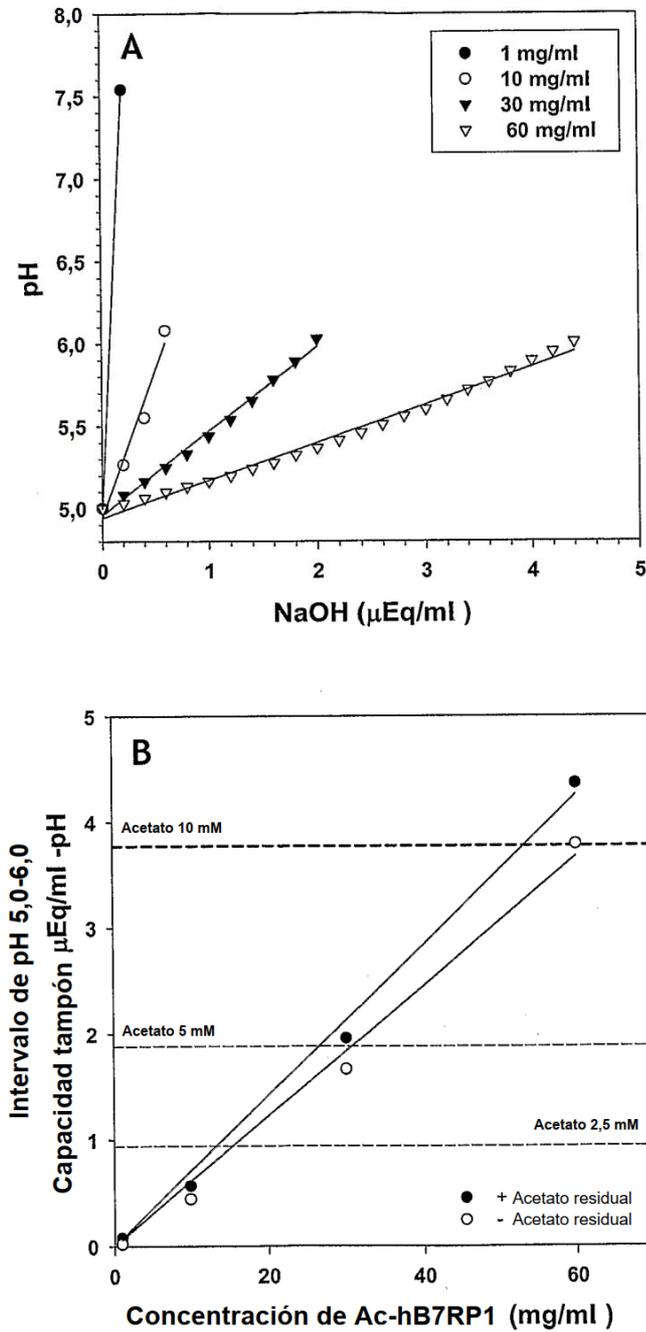


Figura 12. Estabilidad de la formulación de Ac-hB7RP1 Autotamponada, 60 mg/ml, en Comparación con las Formulaciones Tamponadas de Manera Convencional

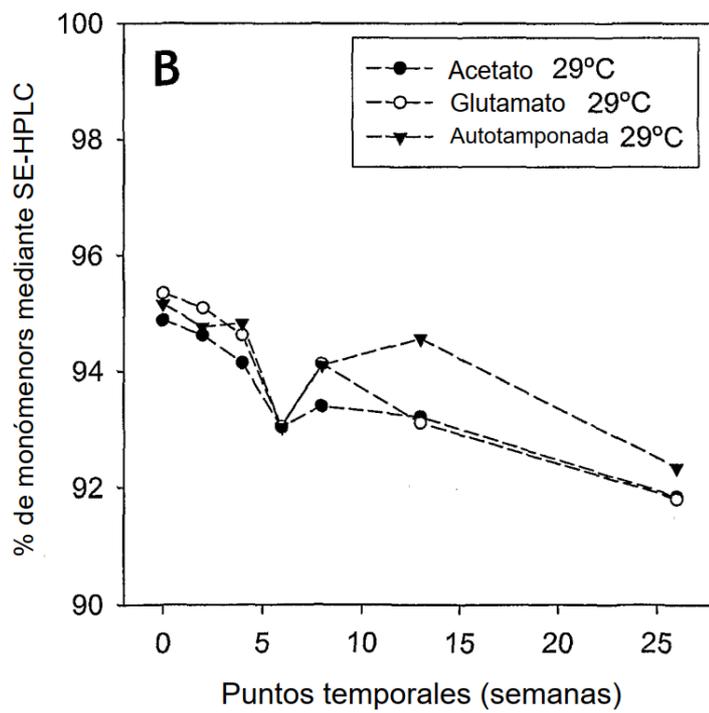
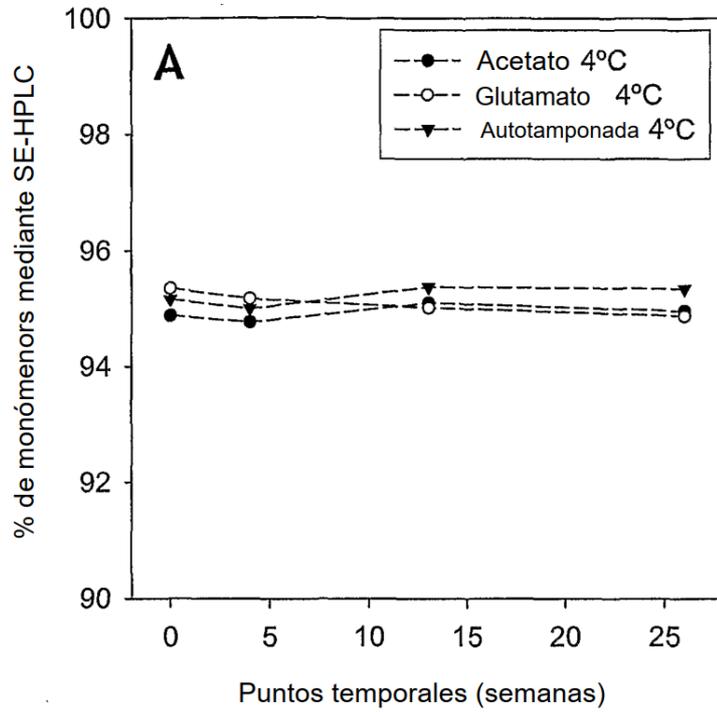


Figura 13. Control de pH de Formulaciones de Ac-hB7RP1 autotamponada, 60 mg/ml

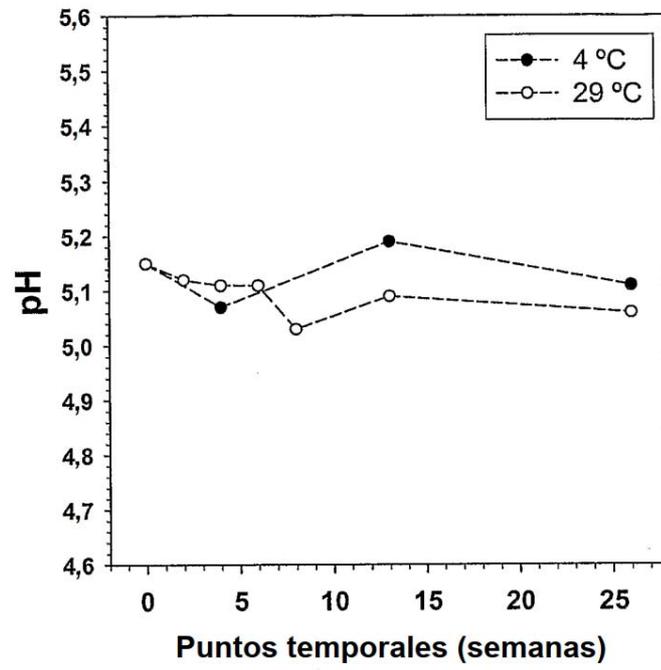


Figura 14. Capacidad tampón de Soluciones de Ac-hCD22 en el intervalo de pH de 4,0-6,0

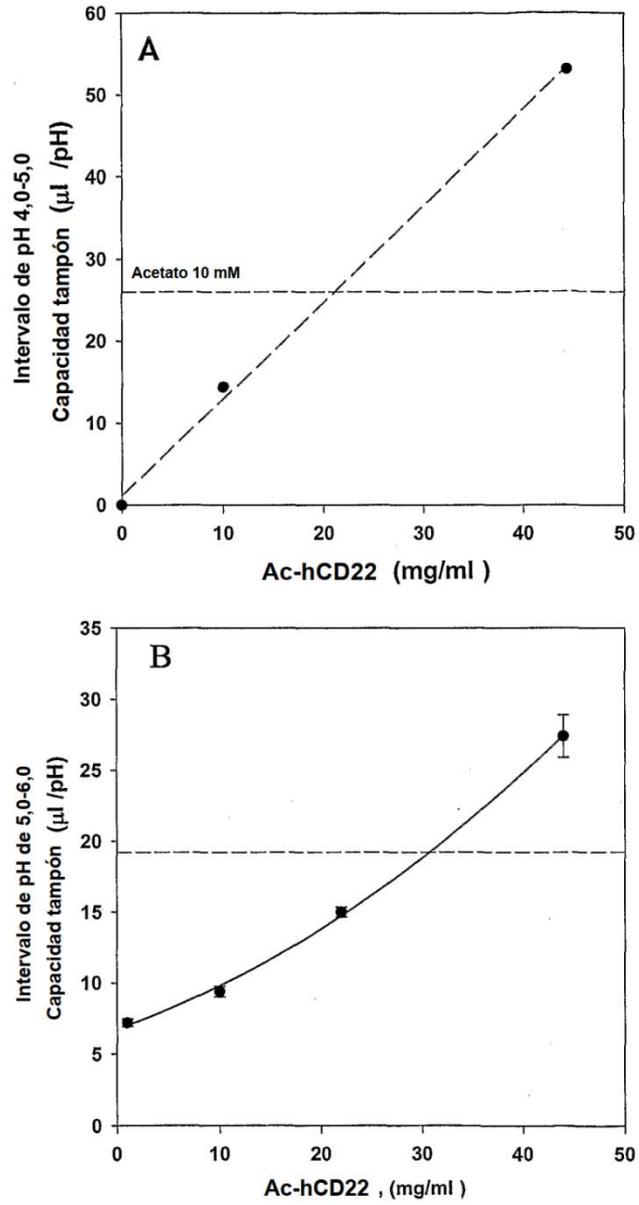


Figura 15. Capacidad tampón de Soluciones de Ac-hIL4R en el intervalo de pH de 4,0-5,0

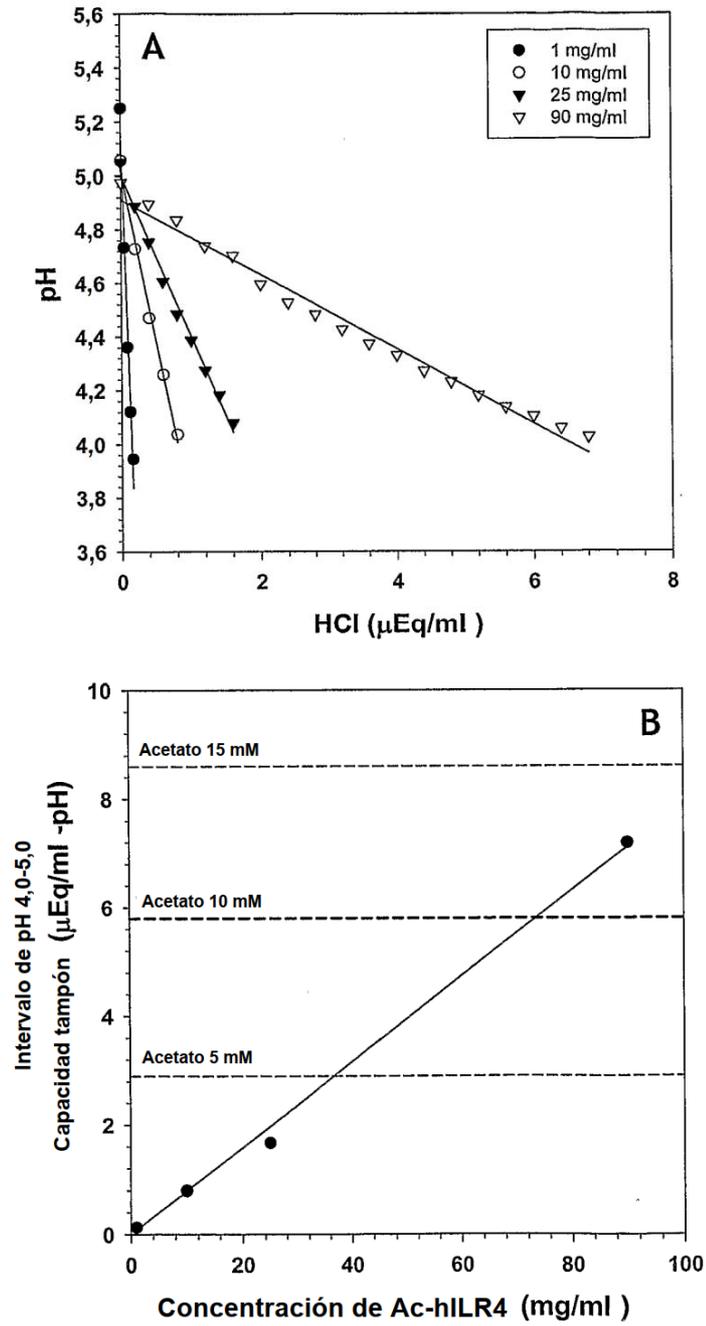


Figura 16. Capacidad tampón de Soluciones de Ac-hIL4R en el intervalo de pH de 5,0-6,0

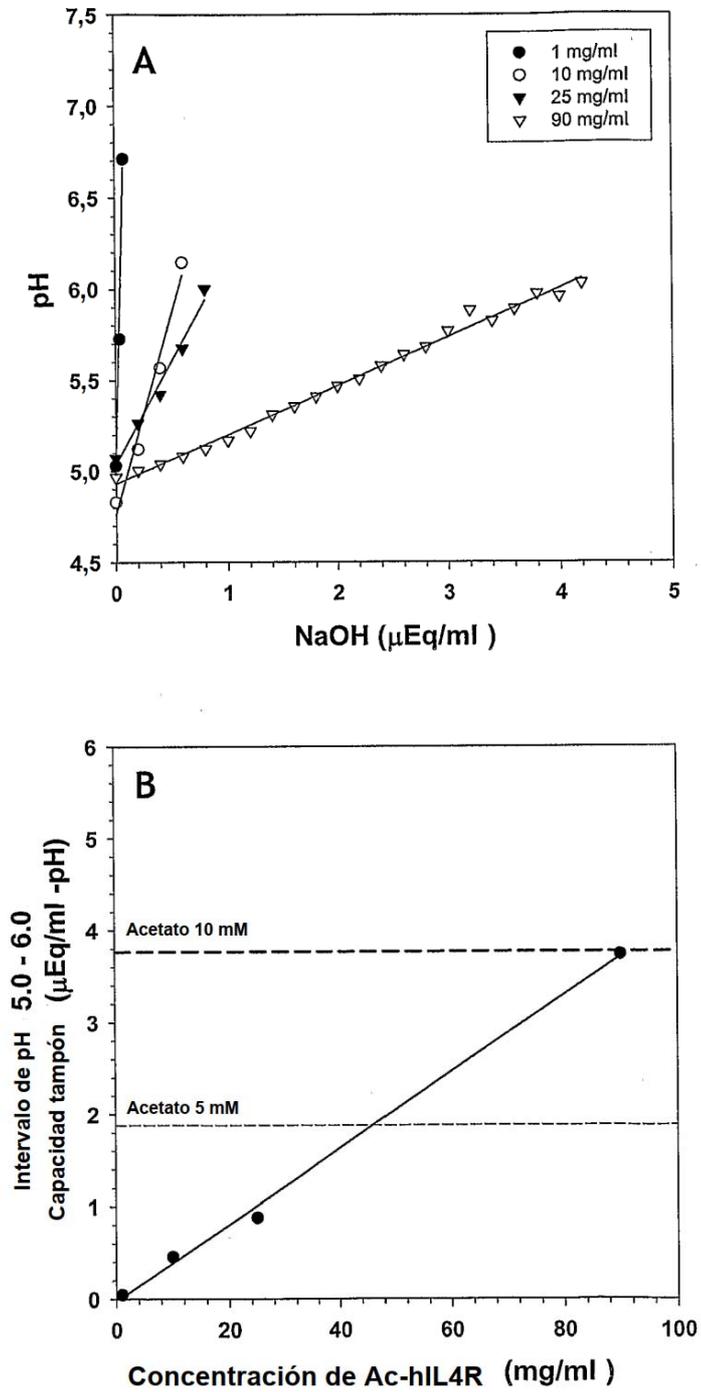


Figura 17. Estabilidad acelerada y control de pH de la Formulación de Ac-hIL4R Autotamponada, 70 mg/ml, en comparación con la Formulación Tamponada con Acetato a 37 C

