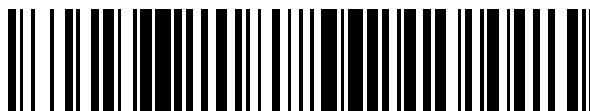


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 808 823**

51 Int. Cl.:

A61K 38/18 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014** **PCT/US2014/026850**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014** **WO14160497**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014** **E 14776479 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.06.2020** **EP 2968467**

54 Título: **Formulaciones con oxidación reducida**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361780852 P
27.11.2013 US 201361909850 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la
traducción de la patente:
02.03.2021

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

ALAVATTAM, SREEDHARA;
MALLANEY, MARY y
GREWAL, PARBIR

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 808 823 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones con oxidación reducida

5 CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a formulaciones que comprenden una proteína y que comprenden además un compuesto que previene la oxidación de dicha proteína.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La degradación oxidativa de los residuos de aminoácido es un fenómeno comúnmente observado en los productos farmacéuticos de proteínas. Una serie de residuos de aminoácido son susceptibles a la oxidación, en particular, metionina (Met), cisteína (Cys), histidina (His), triptófano (Trp) y tirosina (Tyr) (Li *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 48:490-500 (1995)). Típicamente se observa oxidación cuando la proteína se expone a peróxido de hidrógeno, luz, iones de metal o una combinación de estos durante diversas etapas de procesamiento (Li *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 48:490-500 (1995)). En particular, las proteínas expuestas a la luz (Wei, *et al.*, *Analytical Chemistry* 79(7):2797-2805 (2007)), AAPH o reactivos de Fenton (Ji *et al.*, *J Pharm Sci* 98(12):4485-500 (2009)) han mostrado niveles incrementados de oxidación en residuos de triptófano, mientras que las expuestas a peróxido de hidrógeno típicamente solo han mostrado oxidación de metionina (Ji *et al.*, *J Pharm Sci* 98(12):4485-500 (2009)). La exposición a la luz puede dar como resultado la oxidación de proteínas a través de la formación de especies reactivas del oxígeno (ERO) que incluyen oxígeno singlete, peróxido de hidrógeno y superóxido (Li *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 48:490-500 (1995); Wei, *et al.*, *Analytical Chemistry* 79(7):2797-2805 (2007); Ji *et al.*, *J Pharm Sci* 98(12):4485-500 (2009); Frokjaer *et al.*, *Nat Rev Drug Discov* 4(4):298-306 (2005)), mientras que la oxidación de proteínas típicamente se produce por medio de radicales hidroxilo en la reacción mediada de Fenton (Prousek *et al.*, *Pure and Applied Chemistry* 79(12):2325-2338 (2007)) y por medio de peróxidos de alcoxilo en la reacción mediada por AAPH (Werber *et al.*, *J Pharm Sci* 100(8):3307-15 (2011)). La oxidación de triptófano da lugar a una miríada de productos de oxidación, incluyendo hidroxitriptófano, quinurenina y N-formilquinurenina, y tiene el potencial de provocar un impacto en la seguridad y eficacia (Li *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 48:490-500 (1995); Ji *et al.*, *J Pharm Sci* 98(12):4485-500 (2009); Frokjaer *et al.*, *Nat Rev Drug Discov* 4(4):298-306 (2005)). Se ha informado de la oxidación de un residuo de triptófano particular en la región determinante de la complementariedad (CDR) de la cadena pesada de un anticuerpo monoclonal que se correlacionó con la pérdida de la función biológica (Wei, *et al.*, *Analytical Chemistry* 79(7):2797-2805 (2007)). Recientemente se ha informado de la oxidación de Trp mediada por un ion de metal coordinado con histidina para una molécula de Fab (Lam *et al.*, *Pharm Res* 28(10):2543-55 (2011)). La autooxidación de polisorbato 20 en la formulación de Fab, que da lugar a la generación de diversos peróxidos, también se ha mencionado en el mismo informe. La generación de estos peróxidos inducida por autooxidación también puede dar lugar a la oxidación de metionina en la proteína durante el almacenamiento a largo plazo de la especialidad farmacéutica, puesto que se ha sugerido que los residuos de Met en las proteínas actúan como antioxidantes internos (Levine *et al.*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(26):15036-15040 (1996)) y se oxidan fácilmente por peróxidos. La oxidación de los residuos de aminoácido tiene el potencial de provocar un impacto en la actividad biológica de la proteína. Esto puede ser especialmente cierto para los anticuerpos monoclonales (mAb). La oxidación de metionina en Met254 y Met430 en un mAb IgG1 provoca potencialmente un impacto en la semivida en suero en ratones transgénicos (Wang *et al.*, *Molecular Immunology* 48(6-7):860-866 (2011)) y también provoca un impacto en la unión de IgG1 humana a los receptores FcRn y Fc gamma (Bertolotti-Ciarlet *et al.*, *Molecular Immunology* 46(8-9):1878-82 (2009)). Estevao *et al.*, *Tetrahedron Letters* 52(1): 101-106, se refieren al análisis de la actividad antioxidante de una colección de indoles por voltametría cíclica y su actividad antioxidante frente a las ERO. La colección de indoles se basa en la estructura de triptófano y el requisito estructural establecido incluía que un grupo atractor de electrones, tal como una amina o una amida, tiene que estar presente en la posición 3 del indol.

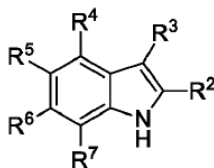
La estabilidad de las proteínas, especialmente en estado líquido, se necesita evaluar durante la fabricación y el almacenamiento de la especialidad farmacéutica. El desarrollo de formulaciones farmacéuticas a veces incluye la adición de antioxidantes para prevenir la oxidación del ingrediente activo.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

(2003)). De forma similar a la oxidación de proteínas inducida por autooxidación de polisorbato 20, es posible que la oxidación de proteínas se pueda producir tras la generación de ERO por otros excipientes en la formulación de proteínas (por ejemplo, L-Trp) en condiciones de manipulación normales.

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

BREVE SUMARIO DE LA INVENCION

En el presente documento se proporcionan formulaciones líquidas que comprenden un anticuerpo y un compuesto que previene la oxidación del anticuerpo en la formulación, en las que el compuesto es de fórmula:



y en la que R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno, hidroxilo, -COOH y -CH₂COOH; y

R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ se seleccionan independientemente de hidrógeno e hidroxilo;

siempre que uno de R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ sea hidroxilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunos modos de realización, R⁴, R⁵ o R⁷ es hidroxilo. En algunos modos de realización, el compuesto se selecciona de 5-hidroxiindol o de 7-hidroxiindol. En algunos modos de realización, R⁵ es hidroxilo. En algunos modos de realización, el compuesto anterior es un derivado 5-hidroxi, que incluye, sin limitación, 5-hidroxiindol.

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

En algunos modos de realización, la formulación es de 0,3 mM a 5 mM. En algunos modos de realización, el compuesto en la formulación es de 0,3 mM a 1 mM. En algunos modos de realización, el compuesto en la formulación es de 1 mM.

En algunos modos de realización, el anticuerpo (por ejemplo, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o fragmento de anticuerpo) es susceptible a la oxidación. En algunos modos de realización, la concentración de anticuerpos en la formulación es de 1 mg/ml a 250 mg/ml.

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

Estos y otros modos de realización de la invención se describen además por la descripción detallada que sigue.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La **figura 1** es una serie de gráficos que demuestran la oxidación de **A)** Fab en mAb1 y de **B)** Fc en mAb1 después de ocho horas de exposición a la luz a 250 W/m². mAb1 estaba presente a 5 mg/ml en acetato de histidina 20 mM, trehalosa 250 mM, polisorbato 20 al 0,02 %. Todos los viales se dispusieron en la caja de luz, excepto el Mat. de ref. mAb1. Los viales de CTRL con papel metalizado se cubrieron con papel metalizado antes de su disposición en la caja de luz. Se promediaron tres viales experimentales separados para cada muestra, excepto "Met 10 mM, Trp 1 mM" (*), que fue el promedio de dos viales experimentales, y Mat. de ref. mAb1, que fue un vial experimental con tres inyecciones independientes en la HPLC. Las barras de error representan una desviación estándar.

La **figura 2** es un gráfico que muestra la producción de H₂O₂ dependiente de la dosis por L-Trp. Los rombos indican solo L-Trp; los triángulos indican L-Trp + SOD; los círculos y los cuadrados indican L-Trp + NaN₃ ± SOD. Todos los estudios se realizaron en L-His HCl 20 mM, pH 5,5.

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

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

La **figura 5** es un gráfico que muestra el efecto de NaN_3 sobre la producción de H_2O_2 por diversos derivados de Trp tras la exposición a la luz. Los datos se muestran como una proporción con respecto al peróxido generado por L-Trp.

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

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

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

La **figura 9** es una serie de gráficos que muestran la oxidación de **A)** Fab en 3 mg/ml de mAb1 y de **B)** Fc en 3 mg/ml de mAb1 después de la reacción de Fenton usando 10 ppm de H_2O_2 y Fe(III) 0,2 mM. La reacción se incubó a 40 °C durante 3 horas, se desactivó con L-Met 100 mM y se analizó usando RP-HPLC después de digestión con papaína. Todas las muestras son el promedio de tres viales separados y el control mAb1 (Mat. de ref.) fue un vial con cinco inyecciones independientes en la HPLC. Las barras de error representan una desviación estándar.

La **figura 10** es una serie de diagramas que muestran el supuesto mecanismo de excitación de **A)** L-Trp y de **B)** 5-hidroxi-L-triptófano y en la generación y desactivación de 1O_2 . k_{25C} representa la constante de velocidad de segundo orden para la desactivación de 1O_2 (Dad *et al.*, *J Photochem Photobiol B*, 78(3):245-51 (2005)) mientras que E_{ox} es el potencial de oxidación de la molécula frente a Ag/AgCl.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

I. Definiciones

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

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

Una formulación "estéril" es aséptica o está libre o esencialmente libre de todos los microorganismos vivos y sus esporas.

Una formulación "estable" es una en la que la proteína en la misma retiene esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o estabilidad biológica tras su almacenamiento. Preferentemente, la formulación retiene esencialmente su estabilidad física y química, así como su actividad biológica, tras su almacenamiento. El periodo de almacenamiento se selecciona, en general, en base al tiempo de conservación pretendido de la formulación. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, ed. Vincent Lee, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad se puede medir a una cantidad seleccionada de exposición a la luz y/o temperatura durante un periodo de tiempo seleccionado. La estabilidad se puede evaluar cualitativa y/o cuantitativamente de una variedad de maneras diferentes, incluyendo evaluación de la formación de

agregados (por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño, midiendo la turbidez y/o por inspección visual); evaluación de la formación de ERO (por ejemplo, usando un ensayo de agresión lumínica o un ensayo de agresión con diclorhidrato de 2,2'-azobis(2-amidinopropano) (AAPH)); oxidación de residuos de aminoácido específicos de la proteína (por ejemplo, un residuo de Trp y/o un residuo de Met de un anticuerpo monoclonal);
 5 evaluando la heterogeneidad de carga usando cromatografía de intercambio catiónico, isoelectroenfoque capilar por formación de imágenes (icIEF) o electroforesis capilar en zona; análisis de secuencias aminoterminales o carboxiterminales; análisis por espectrometría de masas; análisis por SDS-PAGE para comparar anticuerpos reducidos e intactos; análisis por cartografiado de péptidos (por ejemplo, obtenidos por proteólisis con tripsina o LYS-C); evaluando la actividad biológica o función de unión a diana de la proteína (por ejemplo, la función de unión a
 10 antígeno de un anticuerpo); etc. La inestabilidad puede implicar uno cualquiera o más de: agregación, desamidación (por ejemplo, desamidación de Asn), oxidación (por ejemplo, oxidación de Met y/u oxidación de Trp), isomerización (por ejemplo, isomerización de Asp), reticulación con inmunoprecipitación/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo, fragmentación de la región bisagra), formación de succinimida, cisteína(s) no emparejada(s), extensión N terminal, procesamiento C terminal, diferencias de glucosilación, etc.

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

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

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

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

Una proteína que es "susceptible a la oxidación" es una que comprende uno o más residuos que se ha descubierto que son propensos a la oxidación, tales como, pero sin limitarse a, metionina (Met), cisteína (Cys), histidina (His),
 40 triptófano (Trp) y tirosina (Tyr). Por ejemplo, un aminoácido triptófano en la porción Fab de un anticuerpo monoclonal o un aminoácido metionina en la porción Fc de un anticuerpo monoclonal puede ser susceptible a la oxidación.

Por "isotónico" se entiende que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán, en general, una presión osmótica de aproximadamente 250 a
 45 350 mOsm. La isotonicidad se puede medir usando un osmómetro de tipo presión de vapor o de congelación de hielo, por ejemplo.

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

Un "conservante" es un compuesto que se puede incluir opcionalmente en la formulación para reducir esencialmente la acción bacteriana en la misma, facilitando así la producción de una formulación de múltiples usos, por ejemplo. Los
 55 ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametONIO, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos, tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos, tales como metil- o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. En un modo de realización, el conservante en el presente documento es alcohol bencílico.
 60

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

palmidopropil o isoestearamidopropilbetaína (por ejemplo, lauroamidopropil); miristamidopropil, palmidopropil o isoestearamidopropildimetilamina; metilcooiltaurato de sodio o metiloleiltaurato disódico; y la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.); polietilglicol, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, Pluronic, PF68, etc.); etc. En un modo de realización, el tensioactivo en el presente documento es polisorbato 20.

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

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

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

tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; una citocina, tal como interleucinas (IL), por ejemplo, de IL-1 a IL-10; midquina; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración del decaimiento; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del sida; proteínas de transporte; receptores de migración dirigida; adhesinas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; efrinas; Bv8; ligando similar a delta 4 (DLL4); Del-1; BMP9; BMP10; folistatina; factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)/factor de dispersión (SF); Alk1; Robo4; ESM1; perlecano; dominio similar a EGF, múltiple 7 (EGFL7); CTGF y miembros de su familia; tromboespondinas, tales como tromboespondina 1 y tromboespondina 2; colágenos, tales como colágeno IV y colágeno XVIII; neuropilinas, tales como NRP1 y NRP2; pleiotrofina (PTN); progranulina; proliferina; proteínas Notch, tales como Notch 1 y Notch 4; semaforinas, tales como Sema 3A, Sema 3C y Sema 3F; un antígeno asociado a tumor, tal como CA125 (antígeno de cáncer de ovario); inmuno adhesinas; y fragmentos y/o variantes de cualquiera de las proteínas enumeradas anteriormente, así como anticuerpos, incluyendo fragmentos de anticuerpo, que se unen a una o más proteínas, incluyendo, por ejemplo, cualquiera de las proteínas enumeradas anteriormente.

El término "anticuerpo" en el presente documento se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (incluyendo anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos) y fragmentos de anticuerpo, siempre que presenten la actividad biológica deseada.

Una proteína "aislada" (por ejemplo, un anticuerpo aislado) es una que se ha identificado y separado y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían en usos de investigación, diagnóstico o terapéuticos para la proteína, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. La proteína aislada incluye la proteína *in situ* dentro de las células recombinantes, puesto que al menos un componente del entorno natural de la proteína no estará presente. De forma habitual, sin embargo, la proteína aislada se preparará por al menos una etapa de purificación.

Los "anticuerpos naturales" normalmente son glucoproteínas heterotetrámeras de aproximadamente 150.000 daltons, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Cada cadena ligera se enlaza a una cadena pesada por un enlace disulfuro covalente, aunque el número de enlaces disulfuro varía entre las cadenas pesadas de diferentes isotipos de inmunoglobulina. Cada cadena pesada y ligera también tiene puentes disulfuro intracatenarios espaciados regularmente. Cada cadena pesada tiene en un extremo un dominio variable (V_H) seguido de una serie de dominios constantes. Cada cadena ligera tiene un dominio variable (V_L) en un extremo y un dominio constante en su otro extremo; el dominio constante de la cadena ligera se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada, y el dominio variable de la cadena ligera se alinea con el dominio variable de la cadena pesada. Se cree que residuos de aminoácido particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada.

El término "dominio constante" se refiere a la porción de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada con respecto a la otra porción de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión a antígeno. El dominio constante contiene los dominios C_H1 , C_H2 y C_H3 (conjuntamente, CH) de la cadena pesada y el dominio CHL (o CL) de la cadena ligera.

La "región variable" o "dominio variable" de un anticuerpo se refiere a los dominios aminoterminales de la cadena pesada o ligera del anticuerpo. El dominio variable de la cadena pesada se puede denominar " V_H ". El dominio variable de la cadena ligera se puede denominar " V_L ". Estos dominios son, en general, las partes más variables de un anticuerpo y contienen los sitios de unión a antígeno.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinadas porciones de los dominios variables difieren extensamente en secuencia entre anticuerpos y se usan en la unión y especificidad de cada anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente por todos los dominios variables de los anticuerpos. Se concentra en tres segmentos llamados regiones hipervariables (HVR), en los dominios variables tanto de la cadena ligera como de la cadena pesada. Las porciones más altamente conservadas de los dominios variables se llaman regiones estructurales (FR). Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro regiones FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas por tres HVR, que forman bucles que conectan, y, en algunos casos, forman parte de la estructura de lámina beta. Las HVR en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por las regiones FR y, con las HVR de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación del anticuerpo en la toxicidad celular dependiente de anticuerpos.

Las "cadenas ligeras" de los anticuerpos (inmunoglobulinas) de cualquier especie de mamífero se pueden asignar a uno de dos tipos claramente distintos, llamados kappa (" κ ") y lambda (" λ "), en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes.

El término "isotipo" o "subclase" de IgG como se usa en el presente documento se entiende como cualquiera de las

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

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

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

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

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

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

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

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en el presente documento se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, por ejemplo, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos, excepto por posibles mutaciones, por ejemplo, mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades sin importancia. Por tanto, el modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que no es una mezcla de anticuerpos discretos. En determinados modos de realización, dicho anticuerpo monoclonal típicamente incluye un anticuerpo que comprende una secuencia polipeptídica que se une a una diana, en los que la secuencia polipeptídica de unión a diana se obtuvo por un procedimiento que incluye la selección de una única

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

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

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

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

Un "anticuerpo humano" es uno que posee una secuencia de aminoácidos que corresponde a la de un anticuerpo producido por un ser humano y/o se ha preparado usando cualquiera de las técnicas para preparar anticuerpos humanos como se divulga en el presente documento. Esta definición de un anticuerpo humano excluye específicamente a un anticuerpo humanizado que comprende residuos de unión a antígeno no humanos. Se pueden producir anticuerpos humanos usando diversas técnicas conocidas en la técnica, incluyendo colecciones de presentación en fagos. Hoogenboom y Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991).

También están disponibles para la preparación de anticuerpos monoclonales humanos los procedimientos descritos en Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Véase también van Dijk y van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Se pueden preparar anticuerpos humanos administrando el antígeno a un animal transgénico que se haya modificado para producir dichos anticuerpos en respuesta a la exposición antigénica, pero en los que sus locus endógenos se han desactivado, por ejemplo, xenorratones inmunizados (véanse, por ejemplo, las pat. de EE. UU. n.ºs 6.075.181 y 6.150.584 con respecto a la tecnología XENOMOUSE™). Véase también, por ejemplo, Li *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) con respecto a los anticuerpos humanos generados por medio de una tecnología de hibridoma de linfocitos B humanos.

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

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

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

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

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

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

El sistema de numeración de Kabat se usa, en general, cuando se hace referencia a un residuo en el dominio variable (aproximadamente los residuos 1-107 de la cadena ligera y los residuos 1-113 de la cadena pesada) (por ejemplo, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*, 5.ª ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). El "sistema de numeración EU" o "índice EU" se usa, en general, cuando se hace referencia a un residuo en una región constante de la cadena pesada de inmunoglobulina (por ejemplo, el índice EU que se informa en Kabat *et al.*, *supra*). El "índice EU como en Kabat" se refiere a la numeración de residuos del anticuerpo EU IgG1 humano.

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

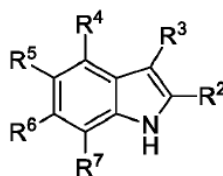
El término "aproximadamente" como se usa en el presente documento se refiere a un intervalo de error aceptable para el valor respectivo como se determina por un experto en la técnica, lo que dependerá, en parte, de cómo se mide o determina el valor, es decir, las limitaciones del sistema de medición.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

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

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

II. Formulaciones y preparación de proteínas

La invención en el presente documento se refiere a formulaciones líquidas que comprenden un anticuerpo y un compuesto que previene la oxidación del anticuerpo en la formulación, en las que el compuesto es de fórmula:



y en la que R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno, hidroxilo, -COOH y -CH₂COOH; y

R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ se seleccionan independientemente de hidrógeno e hidroxilo;

siempre que uno de R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ sea hidroxilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunos modos de realización, R⁴, R⁵ o R⁷ es hidroxilo. En algunos modos de realización, el compuesto se selecciona de 5-hidroxiindol o de 7-hidroxiindol. En algunos modos de realización, R⁵ es hidroxilo. En algunos modos de realización, el compuesto anterior es un derivado 5-hidroxi, que incluye, sin limitación, 5-hidroxiindol.

En algunos modos de realización, el anticuerpo es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o un fragmento de anticuerpo. En otro modo de realización, el compuesto previene la oxidación de uno o más aminoácidos en la porción Fab de un anticuerpo. En otro modo de realización adicional, el compuesto previene la oxidación de uno o más aminoácidos en la porción Fc de un anticuerpo. En algunos modos de realización, la formulación proporcionada en el presente documento es una formulación farmacéutica adecuada para su administración a un sujeto. Como se usa en el presente documento, un "sujeto" o un "individuo" para propósitos de tratamiento o administración se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para deportes o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferentemente, el mamífero es humano. En algunos modos de realización, la formulación es acuosa. En algunos modos de realización en el presente documento, la concentración de anticuerpos en la formulación es de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. En algunos modos de realización, la formulación comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en un estabilizante, un tampón, un tensioactivo y un agente de tonicidad. Por ejemplo, una formulación de la invención puede comprender un anticuerpo monoclonal, un compuesto como se proporciona en el presente documento que previene la oxidación de la proteína (por ejemplo, 5-hidroxiindol) y un tampón que mantiene el pH de la formulación a un nivel deseable. En algunos modos de realización, una formulación proporcionada en el presente documento tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0.

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

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

A. Preparación de anticuerpos

El anticuerpo en las formulaciones proporcionadas en el presente documento está dirigido frente a un antígeno de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece un trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos dirigidos frente a antígenos distintos a polipéptido.

Si el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembranaria (por ejemplo, receptor) o ligando, tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen moléculas tales como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); CD20; ox-LDL; ox-ApoB100; renina; una hormona del crecimiento, incluyendo la hormona del crecimiento humana y la hormona del crecimiento bovina; hormona liberadora de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimulante del tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona foliculoestimulante; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como el factor VIIIc, factor IX, tromboplastina tisular y factor de Von Willebrand; factores de anticoagulación, tales como proteína C; péptido natriurético auricular; tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa u orina humana, o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombesina; trombina; factor de crecimiento hematopoyético; un receptor del factor de necrosis tumoral, tal como el receptor de muerte 5 y CD120; factor de necrosis tumoral alfa y beta; encefalinasa; RANTES (regulada por activación, expresada y secretada por linfocitos T normales); proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1-alfa) humana; una seroalbúmina, tal como seroalbúmina humana; hormona antimülleriana; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; prorrelaxina; péptido asociado a gonadotropinas de ratón; una proteína microbiana, tal como beta lactamasa; DNasa; IgE; un antígeno asociado a linfocitos T citotóxicos (CTLA), tal como CTLA-4; inhibina; activina; receptores para hormonas o factores de crecimiento; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurótrofo, tal como factor neurótrofo derivado del hueso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF-β; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento y transformación (TGF), tal como TGF-alfa y TGF-beta, incluyendo TGF-β1, TGF-β2, TGF-β3, TGF-β4 o TGF-β5; factor de crecimiento similar a la insulina I y II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de unión al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina; factores osteoinductores; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón alfa, beta y gamma; factores estimulantes de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, de IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de linfocitos T; proteínas de membrana de superficie; factor de aceleración del decaimiento; antígeno vírico, tal como, por ejemplo, una porción de la envoltura del sida; proteínas de transporte; receptores de migración dirigida; adreínas; proteínas reguladoras; integrinas, tales como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, una ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a tumor, tal como el receptor HER2, HER3 o HER4; y fragmentos de cualquiera de los polipéptidos enumerados anteriormente.

(i) Preparación de antígenos

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

(ii) Determinados procedimientos basados en anticuerpos

Se producen preferentemente anticuerpos policlonales en animales por múltiples inyecciones subcutáneas (s.c.) o intraperitoneales (i.p.) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente a una proteína que sea inmunógena en la especie que se va a inmunizar, por ejemplo, hemocianina de lapa californiana, seroalbúmina, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de la soja, usando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoilsuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico, SOCl_2 o $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$, donde R y R^1 son diferentes

grupos alquilo.

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

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

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

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

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

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

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

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

(iii) Determinados procedimientos de cribado de colecciones

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

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

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

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

En determinados modos de realización, se usa el fago filamentosos para presentar fragmentos de anticuerpo por fusión a la proteína minoritaria de la cápside pIII. Los fragmentos de anticuerpo se pueden presentar como fragmentos Fv monocatenarios, en los que los dominios VH y VL estén conectados en la misma cadena polipeptídica por un espaciador polipeptídico flexible, por ejemplo, como se describe por Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), o

como fragmentos Fab, en los que una cadena se fusiona a pIII y la otra se secreta en el periplasma de células huésped bacterianas donde se produce el ensamblaje de una estructura Fab-proteína de la cápside que se presenta en la superficie del fago desplazando algunas de las proteínas de la cápside naturales, por ejemplo, como se describe en Hoogenboom *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 19: 4133-4137 (1991).

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

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

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

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

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

Se pueden construir repertorios de fragmentos de anticuerpo combinando repertorios de genes de VH y VL entre sí

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

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

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

El cribado de las colecciones se puede lograr por diversas técnicas conocidas en la técnica. Por ejemplo, se puede usar el antígeno para recubrir los pocillos de las placas de adsorción, expresar en células huésped fijadas a placas de adsorción o usar en la separación de células, o conjugar a biotina para su captura con microesferas recubiertas con estreptavidina o usar en cualquier otro procedimiento para examinar colecciones de presentación en fagos.

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

La eficacia de la selección depende de muchos factores, incluyendo la cinética de disociación durante el lavado y de si los múltiples fragmentos de anticuerpo en un único fago se pueden acoplar simultáneamente con el antígeno. Los anticuerpos con cinética de disociación rápida (y afinidades de unión débiles) se pueden retener por el uso de lavados cortos, presentación en fagos multivalente y alta densidad de recubrimiento del antígeno en fase sólida. La alta densidad no solo estabiliza el fago a través de interacciones multivalentes, sino que favorece la reunión del fago que se ha disociado. La selección de anticuerpos con cinética de disociación lenta (y afinidades de unión buenas) se puede promover por el uso de lavados largos y presentación en fagos monovalente como se describe en Bass *et al.*, *Proteins*, 8: 309-314 (1990) y en el documento WO 92/09690, y una baja densidad de recubrimiento del antígeno como se describe en Marks *et al.*, *Biotechnol.*, 10: 779-783 (1992).

Es posible seleccionar entre anticuerpos en fagos de diferentes afinidades, incluso con afinidades que difieran ligeramente, por el antígeno. Sin embargo, es probable que la mutación aleatoria de un anticuerpo seleccionado (por ejemplo, como se realiza en algunas técnicas de maduración en afinidad) dé lugar a muchos mutantes, uniéndose la mayoría al antígeno, y unos pocos con mayor afinidad. Con antígeno limitante, el fago de alta afinidad infrecuente

podría quedar fuera. Para retener todos los mutantes de mayor afinidad, los fagos se pueden incubar con antígeno biotinilado en exceso, pero con el antígeno biotinilado a una concentración de menor molaridad que la constante de afinidad molar diana para el antígeno. A continuación, los fagos de unión de alta afinidad se pueden capturar por microesferas paramagnéticas recubiertas con estreptavidina. Dicha "captura en equilibrio" permite que se seleccionen los anticuerpos de acuerdo con sus afinidades de unión, con una sensibilidad que permita el aislamiento de clones mutantes con una afinidad tan solo dos veces mayor de un gran exceso de fagos con menor afinidad. También se pueden manipular las condiciones usadas en el lavado de fagos unidos a una fase sólida para discriminar basándose en su cinética de disociación.

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

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

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

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

(iv) Anticuerpos humanizados y humanos

Diversos procedimientos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácido introducidos en él de una fuente que no es humana. Estos residuos de aminoácido no humanos se denominan a menudo residuos de "importación", que típicamente se toman de un dominio variable de "importación". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el procedimiento de Winter y sus colaboradores (Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeyen *et al.*, *Science*, 239:1534-1536 (1988)), sustituyendo las CDR o secuencias de CDR de roedor con las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. En consecuencia, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (pat. de EE. UU. n.º 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido con la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados típicamente son anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y

posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen con residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedor.

La elección de los dominios variables humanos, tanto ligeros como pesados, que se van a usar en la preparación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. De acuerdo con el llamado procedimiento de "mejor ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la colección de secuencias del dominio variable humanas conocidas. A continuación, se acepta la secuencia humana que es la más próxima a la del roedor como la región estructural (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2296 (1993); Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 196:901 (1987)). Otro procedimiento usa una región estructural particular derivada de la secuencia consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo particular de las cadenas ligera o pesada. Se puede usar la misma región estructural para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); Presta *et al.*, *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)).

Es importante además que los anticuerpos se humanicen con retención de alta afinidad por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para lograr este objetivo, de acuerdo con un modo de realización del procedimiento, se preparan anticuerpos humanizados por un procedimiento de análisis de las secuencias originales y diversos productos humanizados conceptuales usando modelos tridimensionales de las secuencias originales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulina están disponibles comúnmente y son consabidos por los expertos en la técnica. Están disponibles programas informáticos que ilustran y presentan estructuras conformacionales tridimensionales probables de secuencias de inmunoglobulina candidatas seleccionadas. La inspección de estas presentaciones permite el análisis del probable papel de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata de unirse a su antígeno. De esta manera, se pueden seleccionar y combinar residuos de FR de las secuencias receptoras y de importación de modo que se logre la característica de anticuerpo deseada, tal como afinidad incrementada por el/los antígeno(s) diana. En general, los residuos de la región hipervariable están directa y más sustancialmente implicados en la influencia en la unión a antígeno.

Se pueden construir los anticuerpos humanos en las formulaciones y composiciones descritas en el presente documento combinando secuencia(s) del dominio variable de clones para Fv seleccionada(s) de colecciones de presentación en fagos derivadas de seres humanos con secuencia(s) del dominio constante humanas conocidas como se describe anteriormente. De forma alternativa, se pueden preparar anticuerpos monoclonales humanos por el procedimiento de hibridoma. Se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos, por ejemplo, por Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001 (1984); Brodeur *et al.*, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); y Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147: 86 (1991).

Es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que, tras su inmunización, pueden producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la delección homocigótica del gen de la región de unión a la cadena pesada (J_H) de anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de la estirpe germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de la micromatriz genética de inmunoglobulina de la estirpe germinal humana en dichos ratones mutantes de la estirpe germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición a antígeno. Véanse, por ejemplo, Jakobovits *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits *et al.*, *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann *et al.*, *Year in Immuno.*, 7:33 (1993); y Duchosal *et al.*, *Nature* 355:258 (1992).

También se puede usar el barajado de genes para derivar anticuerpos humanos de anticuerpos no humanos, por ejemplo, de roedor, donde el anticuerpo humano tiene afinidades y especificidades similares al anticuerpo no humano inicial. De acuerdo con este procedimiento, que también se llama "sellado de epítomos", la región variable de la cadena pesada o bien ligera de un fragmento de anticuerpo no humano obtenido por técnicas de presentación en fagos como se describe en el presente documento se reemplaza por un repertorio de genes de dominio V humanos, creando una población de quimeras de scFv o Fab de cadena no humana/cadena humana. La selección con antígeno da como resultado el aislamiento de un scFv o Fab quimérico de cadena no humana/cadena humana, en el que la cadena humana restablece el sitio de unión a antígeno destruido tras la retirada de la cadena no humana correspondiente en el clon de presentación en fagos principal, es decir, el epítomo regula (sella) la elección de la pareja de cadena humana. Cuando se repite el procedimiento para reemplazar la cadena no humana restante, se obtiene un anticuerpo humano (véase el documento PCT WO 93/06213 publicado el 1 de abril de 1993). A diferencia de la humanización tradicional de anticuerpos no humanos por injerto de CDR, esta técnica proporciona anticuerpos completamente humanos, que no tienen ningún residuo de FR o CDR de origen no humano.

(v) Fragmentos de anticuerpo

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

Se han desarrollado diversas técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo. Tradicionalmente, estos fragmentos se derivaban por medio de digestión proteolítica de anticuerpos intactos (véanse, por ejemplo, Morimoto *et al.*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) y Brennan *et al.*, *Science*, 229:81 (1985)). Sin embargo, estos fragmentos se pueden producir ahora directamente por células huésped recombinantes. Todos los fragmentos de anticuerpo Fab, Fv y scFv se pueden expresar en y secretar de *E. coli*, permitiendo así una fácil producción de grandes cantidades de estos fragmentos. Se pueden aislar fragmentos de anticuerpo de las colecciones de fagos con anticuerpos analizadas anteriormente. De forma alternativa, se pueden recuperar directamente fragmentos Fab'-SH de *E. coli* y acoplar químicamente para formar fragmentos F(ab')₂ (Carter *et al.*, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992)). De acuerdo con otro enfoque, se pueden aislar directamente fragmentos F(ab')₂ del cultivo de células huésped recombinantes. Se describen los fragmentos Fab y F(ab')₂ con semivida *in vivo* incrementada que comprenden residuos de epítipo de unión al receptor de rescate en la pat. de EE. UU. n.º 5.869.046. Otras técnicas para la producción de fragmentos de anticuerpo serán evidentes para el médico experto. En determinados modos de realización, un anticuerpo es un fragmento Fv monocatenario (scFv). Véanse el documento WO 93/16185; las pat. de EE. UU. n.ºs 5.571.894 y 5.587.458. Fv y scFv son las únicas especies con sitios de combinación intactos que carecen de regiones constantes; por tanto, pueden ser adecuados para la unión no específica reducida durante el uso *in vivo*. Se pueden construir proteínas de fusión a scFv para proporcionar la fusión de una proteína efectora en el extremo amino o bien el carboxi de un scFv. Véase *Antibody Engineering*, ed. Borrebaeck, *supra*. El fragmento de anticuerpo también puede ser un "anticuerpo lineal", por ejemplo, como se describe en la pat. de EE. UU. 5.641.870, por ejemplo. Dichos anticuerpos lineales pueden ser monoespecíficos o biespecíficos.

(vi) Anticuerpos multiespecíficos

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

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

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

En un modo de realización de este enfoque, los anticuerpos biespecíficos se componen de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y un par cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (proporcionando una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se descubrió que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado de combinaciones de cadenas de inmunoglobulina no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en solo una mitad de la molécula biespecífica proporciona una manera de separación fácil. Este enfoque se divulga en el documento WO 94/04690. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh *et al.*, *Methods in Enzymology*, 121:210 (1986).

De acuerdo con otro enfoque descrito en el documento WO96/27011, se puede genomanipular la interfase entre un par de moléculas de anticuerpo para maximizar el porcentaje de heterodímeros que se recuperan del cultivo de células recombinantes. Una interfase comprende al menos una parte del dominio C_H3 de un dominio constante de anticuerpo. En este procedimiento, se reemplaza una o más cadenas laterales de aminoácidos pequeñas de la interfase de la

primera molécula de anticuerpo por cadenas laterales más grandes (por ejemplo, tirosina o triptófano). Se crean "cavidades" compensatorias de tamaño idéntico o similar a la(s) cadena(s) lateral(es) grande(s) en la interfase de la segunda molécula de anticuerpo reemplazando las cadenas laterales de aminoácidos grandes por otras más pequeñas (por ejemplo, alanina o treonina). Esto proporciona un mecanismo para incrementar el rendimiento del heterodímero frente a otros productos finales no deseados, tales como homodímeros.

Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o "heteroconjugados". Por ejemplo, se puede acoplar uno de los anticuerpos en el heteroconjugado a avidina, el otro a biotina. Por ejemplo, se han propuesto dichos anticuerpos para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (pat. de EE. UU. n.º 4.676.980) y para el tratamiento de la infección por VIH (documentos WO 91/00360, WO 92/200373 y EP 03089). Se pueden preparar anticuerpos heteroconjugados usando cualquier procedimiento de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son bien conocidos en la técnica y se divulgan en la pat. de EE. UU. n.º 4.676.980, junto con una serie de técnicas de reticulación.

En la literatura también se han descrito técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpo. Por ejemplo, se pueden preparar anticuerpos biespecíficos usando un enlace químico. Brennan *et al.*, *Science*, 229: 81 (1985) describen un procedimiento en el que se escinden proteolíticamente anticuerpos intactos para generar fragmentos $F(ab')_2$. Estos fragmentos se reducen en presencia del agente que forma complejos con ditiol arsenito de sodio para estabilizar los ditiolos vecinos y prevenir la formación de disulfuro intermolecular. Los fragmentos Fab' generados se convierten, a continuación, en derivados de tionitrobenzoato (TNB). A continuación, uno de los derivados Fab' -TNB se reconvierte en Fab' -tiol por reducción con mercaptoetilamina y se mezcla con una cantidad equimolar del otro derivado Fab' -TNB para formar el anticuerpo biespecífico. Se pueden usar los anticuerpos biespecíficos producidos como agentes para la inmovilización selectiva de enzimas.

El reciente progreso ha facilitado la recuperación directa de fragmentos Fab' -SH de *E. coli*, que se pueden acoplar químicamente para formar anticuerpos biespecíficos. Shalaby *et al.*, *J. Exp. Med.*, 175: 217-225 (1992) describen la producción de una molécula de $F(ab')_2$ de anticuerpo biespecífico completamente humanizado. Cada fragmento Fab' se secretó por separado de *E. coli* y se sometió a acoplamiento químico dirigido *in vitro* para formar el anticuerpo biespecífico.

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

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

(vii) Anticuerpos de dominio único

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

(viii) Variantes de anticuerpo

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

deseadas. Las alteraciones de aminoácidos se pueden introducir en la secuencia de aminoácidos del anticuerpo objeto en el momento en el que se prepara la secuencia.

(ix) Derivados de anticuerpo

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

(x) Vectores, células huésped y procedimientos recombinantes

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

(a) Componente de secuencia señal

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

(b) Origen de replicación

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

(c) Componente de gen de selección

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

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

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

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

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

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

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

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

(d) Componente de promotor

Los vectores de expresión y de clonación contienen, en general, un promotor que se reconoce por el organismo huésped y se enlaza de forma funcional al ácido nucleico que codifica un anticuerpo. Los promotores adecuados para su uso con huéspedes procariotas incluyen el promotor de *phoA*, los sistemas de promotores de β-lactamasa y lactosa, el promotor de fosfatasa alcalina, un sistema de promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos, tales como el promotor *tac*. Sin embargo, son adecuados otros promotores bacterianos conocidos. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia Shine-Dalgarno (S.D.) enlazada de forma funcional al ADN que codifica un anticuerpo.

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

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

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de cultivo, son las regiones de promotor de alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C,

fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de maltosa y galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión en levaduras se describen además en el documento EP 73.657. También se usan de forma ventajosa potenciadores de levadura con promotores de levadura.

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

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

(e) Componente de elemento potenciador

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

(f) Componente de finalización de la transcripción

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

(g) Selección y transformación de células huésped

Las células huésped adecuadas para clonar o expresar el ADN en los vectores en el presente documento son las células procariotas, de levadura o de eucariotas superiores descritas anteriormente. Los procariotas adecuados para este propósito incluyen eubacterias, tales como organismos gramnegativos o grampositivos, por ejemplo, enterobacterias, tales como *Escherichia*, por ejemplo, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, por ejemplo, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, por ejemplo, *Serratia marcescans* y *Shigella*, así como bacilos, tales como *B. subtilis* y *B. licheniformis* (por ejemplo, 41P de *B. licheniformis* divulgada en el documento DD 266.710 publicado el 12 de abril de 1989), *Pseudomonas*, tales como *P. aeruginosa* y *Streptomyces*. Un huésped de clonación de *E. coli* preferente es 294 de *E. coli* (ATCC 31.446), aunque son adecuadas otras cepas, tales como B de *E. coli*, X1776 de *E. coli* (ATCC 31.537) y W3110 de *E. coli* (ATCC 27.325). Estos ejemplos son ilustrativos en lugar de limitantes.

Se pueden producir anticuerpos de longitud completa, proteínas de fusión a anticuerpos y fragmentos de anticuerpo en bacterias, en particular, cuando no se necesitan la glucosilación y la función efectora de Fc, tal como cuando el anticuerpo terapéutico se conjuga con un agente citotóxico (por ejemplo, una toxina) que por sí mismo muestra eficacia en la destrucción de células tumorales. Los anticuerpos de longitud completa tienen una mayor semivida en circulación. La producción en *E. coli* es más rápida y más rentable. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véanse, por ejemplo, la pat. de EE. UU. n.º 5.648.237 (Carter *et al.*), la pat. de EE. UU. n.º 5.789.199 (Joly *et al.*), la pat. de EE. UU. n.º 5.840.523 (Simmons *et al.*), que describe la región de iniciación de la traducción (TIR) y las secuencias señal para optimizar la expresión y secreción. Véase también Charlton *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de

fragmentos de anticuerpo en *E. coli*. Después de su expresión, se puede aislar el anticuerpo de la pasta de células de *E. coli* en una fracción soluble y se puede purificar a través de, por ejemplo, una columna con proteína A o G, dependiendo del isotipo. La purificación final se puede llevar a cabo de forma similar al procedimiento para purificar el anticuerpo expresado, por ejemplo, en células CHO.

Además de los microbios procariotas, los eucariotas, tales como hongos filamentosos o levaduras, son huéspedes de clonación o de expresión adecuados para vectores que codifican anticuerpos. *Saccharomyces cerevisiae*, o levadura de panadería común, es la más comúnmente usada entre los microorganismos huéspedes eucariotas inferiores. Sin embargo, una serie a de otros géneros, especies y cepas están disponibles comúnmente y son útiles en el presente documento, tales como *Schizosaccharomyces pombe*; huéspedes de *Kluyveromyces*, tales como, por ejemplo, *K. lactis*, *K. fragilis* (ATCC 12.424), *K. bulgaricus* (ATCC 16.045), *K. wickerhamii* (ATCC 24.178), *K. waltii* (ATCC 56.500), *K. drosophilum* (ATCC 36.906), *K. thermotolerans* y *K. marxianus*; *Yarrowia* (documento EP 402.226); *Pichia pastoris* (documento EP 183.070); *Candida*, *Trichoderma reesia* (documento EP 244.234); *Neurospora crassa*; *Schwanniomyces*, tal como *Schwanniomyces occidentalis*; y hongos filamentosos, tales como, por ejemplo, *Neurospora*, *Penicillium*, *Tolypocladium* y huéspedes de *Aspergillus*, tales como *A. nidulans* y *A. niger*. Para una revisión que analiza el uso de levaduras y hongos filamentosos para la producción de proteínas terapéuticas, véase, por ejemplo, Gemgross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414 (2004).

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

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

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

Se pueden usar células de vertebrado como huéspedes y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo tisular) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Los ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (293 o células 293 subclonadas para su cultivo en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen Virol.* 36:59 (1977)); células de riñón de cría de hámster (BHK, ATCC CCL 10); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1 587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea de hepatoma humano (Hep G2). Otras líneas de células huésped de mamífero útiles incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), incluyendo células CHO DHFR⁻ (Urlaub *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216 (1980)); y líneas de células de mieloma, tales como NS0 y Sp2/0. Para una revisión de determinadas líneas de células huésped de mamífero adecuadas para la producción de anticuerpos véase, por ejemplo, Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B. K. C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, N.J., 2003), pp. 255-268.

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

(h) Cultivo de las células huésped

Las células huésped usadas para producir un anticuerpo se pueden cultivar en una variedad de medios. Los medios disponibles comercialmente, tales como F10 de Ham (Sigma), medio mínimo esencial (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado de Dulbecco ((DMEM), Sigma) son adecuados para cultivar las células huésped. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), las pat. de EE. UU. n.ºs 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; los documentos WO 90/03430; WO 87/00195; o la pat. de EE. UU. Re. 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células huésped. Cualquiera de estos medios se puede complementar según sea necesario con hormonas y/u otros factores

de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes normalmente en concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro complemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la técnica. Las condiciones de cultivo, tales como temperatura, pH y similares, son las usadas previamente con la célula huésped seleccionada para su expresión, y serán evidentes para el experto en la técnica.

(xi) Purificación del anticuerpo

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

La composición de anticuerpo preparada a partir de células se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía con hidroxilapatita, cromatografía de interacción hidrófoba, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, estando la cromatografía de afinidad entre una de las etapas de purificación típicamente preferentes. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y del isotipo de cualquier dominio Fc de inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. Se puede usar la proteína A para purificar anticuerpos que se basan en las cadenas pesadas $\gamma 1$, $\gamma 2$ o $\gamma 4$ humanas (Lindmark *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para $\gamma 3$ humana (Guss *et al.*, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la que se une el ligando de afinidad es muy a menudo agarosa, pero están disponibles otras matrices. Las matrices mecánicamente estables, tales como vidrio de poro controlado o poli(estirendivinil)benceno, permiten caudales más rápidos y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Si el anticuerpo comprende un dominio C_H3 , la resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para su purificación. Otras técnicas para la purificación de proteínas, tales como fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina-SEPHAROSE™, cromatografía en una resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poli(ácido aspártico)), cromatografía de exclusión, SDS-PAGE y precipitación con sulfato de amonio también están disponibles dependiendo del anticuerpo que se va a recuperar.

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

B. Selección de anticuerpos biológicamente activos

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

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

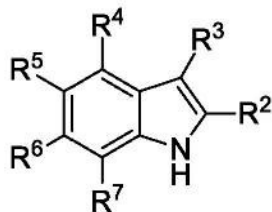
Además, se puede someter el anticuerpo a otros ensayos de actividad biológica, por ejemplo, para evaluar su eficacia como agente terapéutico. Dichos ensayos son conocidos en la técnica y dependen del antígeno diana y del uso pretendido para el anticuerpo.

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

C. Preparación de las formulaciones

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

Las formulaciones líquidas proporcionadas en el presente documento comprenden un anticuerpo y un compuesto que previene la oxidación del anticuerpo en la formulación líquida, en las que el compuesto es de fórmula:



en la que R^2 y R^3 se seleccionan independientemente de hidrógeno, hidroxilo, $-COOH$ y $-CH_2COOH$; y

R^4 , R^5 , R^6 y R^7 se seleccionan independientemente de hidrógeno e hidroxilo;

siempre que uno de R^2 , R^3 , R^4 , R^5 , R^6 y R^7 sea hidroxilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

En algunos modos de realización, R^4 , R^5 o R^7 es hidroxilo. En algunos modos de realización, el compuesto se selecciona de 5-hidroxiindol o de 7-hidroxiindol. En algunos modos de realización, R^5 es hidroxilo. En algunos modos de realización, el compuesto anterior es un derivado 5-hidroxi, que incluye, sin limitación, 5-hidroxi-indol. En algunos modos de realización, el compuesto en la formulación está a una concentración de 0,3 mM a 5 mM. En determinados modos de realización, el compuesto en la formulación está a una concentración de 0,3 mM a 5 mM, de 0,3 mM a 4 mM, de 0,3 mM a 3 mM, de 0,3 mM a 2 mM, de 0,5 mM a 2 mM, de aproximadamente 0,6 mM a aproximadamente 1,5 mM o de aproximadamente 0,8 mM a aproximadamente 1,25 mM. En algunos modos de realización, el compuesto en la formulación es aproximadamente 1 mM. En otro modo de realización, el compuesto previene la oxidación de uno o más aminoácidos en la porción Fab de un anticuerpo. En otro modo de realización adicional, el compuesto previene la oxidación de uno o más aminoácidos en la porción Fc de un anticuerpo.

En algunos modos de realización, la formulación (tal como una formulación líquida) comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en un estabilizante, un tampón, un tensioactivo y un agente de tonicidad. En algunos modos de realización, la formulación se prepara en una solución tamponada a pH. El tampón

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

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

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

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

La formulación puede comprender además quelantes de iones de metal. Los quelantes de iones de metal son bien

conocidos por los expertos en la técnica e incluyen, pero necesariamente no se limitan a aminopolicarboxilatos, EDTA (ácido etilendiaminotetraacético), EGTA (ácido etilenglicol-bis(éter beta-aminoetílico)-N,N,N',N'-tetraacético), NTA (ácido nitrilotriacético), EDDS (disuccinato de etilendiamina), PDTA (ácido 1,3-propilendiaminotetraacético), DTPA (ácido dietilentriaminopentaacético), ADA (ácido beta-alanindiácético), MGCA (ácido metilglicindiácético), etc.

5 Adicionalmente, algunos modos de realización en el presente documento comprenden quelantes de fosfonatos/ácido fosfónico.

Los agentes de tonicidad están presentes para ajustar o mantener la tonicidad del líquido en una composición. Cuando se usan con biomoléculas grandes, cargadas, tales como proteínas y anticuerpos, también pueden servir como

10 "estabilizantes" debido a que pueden interactuar con los grupos cargados de las cadenas laterales de aminoácidos, disminuyendo de este modo la posibilidad de interacciones inter e intramoleculares. Los agentes de tonicidad pueden estar presentes en cualquier cantidad entre un 0,1 % a un 25 % en peso, o más preferentemente entre un 1 % a un 5 % en peso, teniendo en cuenta las cantidades relativas de los demás ingredientes. Los agentes de tonicidad

15 preferentes incluyen alditoles polihídricos, preferentemente alditoles trihídricos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

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

20 ejemplo, drozitumab), se puede combinar con otro agente (por ejemplo, un agente quimioterápico y un agente antineoplásico).

En algunos modos de realización, la formulación es para su administración *in vivo*. En algunos modos de realización, la formulación es estéril. La formulación se puede convertir en estéril por filtración a través de membranas de filtración

25 estériles. Las formulaciones terapéuticas en el presente documento se disponen, en general, en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa o vial de solución intravenosa que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica. La vía de administración está de acuerdo con procedimientos conocidos y aceptados, tales como por inyección intravenosa rápida o infusión única o múltiple durante un periodo de tiempo largo

30 de una manera adecuada, por ejemplo, inyección o infusión por vías subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intralesional o intraarticular, administración tópica, inhalación o por medios de liberación mantenida o de liberación prolongada.

La formulación de la invención se puede almacenar en una formulación líquida o no líquida (por ejemplo, liofilizada). La formulación liofilizada se puede reconstituir antes de su administración. En algunos modos de realización, las

35 concentraciones de proteínas, compuestos y otros excipientes descritos en el presente documento se refieren a concentraciones en formulaciones reconstituidas. En algunos modos de realización, la formulación es estable tras su almacenamiento. En algunos modos de realización, la proteína en la formulación líquida es estable tras su almacenamiento a de aproximadamente de 0 a 5 °C durante al menos aproximadamente 12 meses, al menos

40 aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 21 meses o al menos aproximadamente 24 meses (o al menos aproximadamente 52 semanas). En algunos modos de realización, la proteína en la formulación líquida es estable tras su almacenamiento a aproximadamente -20 °C durante al menos aproximadamente 12 meses, al menos

45 aproximadamente 18 meses, al menos aproximadamente 21 meses o al menos aproximadamente 24 meses (o al menos aproximadamente 52 semanas). En algunos modos de realización, la proteína en la formulación líquida es estable durante la fabricación de la formulación. En algunos modos de realización, la proteína en la formulación líquida es estable cuando se almacena en un recipiente de aleación de metales (por ejemplo, un recipiente de acero

50 inoxidable). En algunos modos de realización, la proteína en la formulación líquida es estable cuando se almacena en un vial de vidrio. En algunos modos de realización, la proteína en la formulación líquida es estable cuando se almacena en un recipiente de plástico. En algunos modos de realización, se evalúa o mide la estabilidad física, la estabilidad química o la actividad biológica de la proteína en la formulación. Se puede usar cualquier procedimiento conocido en la técnica para evaluar la estabilidad y la actividad biológica. En algunos modos de realización, la estabilidad se mide

55 por oxidación de la proteína en la formulación (tal como una formulación líquida) después del almacenamiento. Se puede someter a prueba la estabilidad evaluando la estabilidad física, la estabilidad química y/o la actividad biológica del anticuerpo en la formulación alrededor del momento de formulación, así como después del almacenamiento. La estabilidad física y/o química se puede evaluar cualitativa y/o cuantitativamente de una variedad de maneras

60 diferentes, incluyendo evaluación de la formación de agregados (por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño, midiendo la turbidez y/o por inspección visual); evaluando la heterogeneidad de carga usando cromatografía de intercambio catiónico o electroforesis capilar en zona; análisis de secuencias aminoterminales o carboxiterminales; análisis por espectrometría de masas; análisis por SDS-PAGE para comparar anticuerpos reducidos e intactos; análisis por cartografiado de péptidos (por ejemplo, obtenidos por proteólisis con tripsina o LYS-C); evaluando la

65 actividad biológica o función de unión a antígeno del anticuerpo, etc. La inestabilidad puede dar como resultado la agregación, desamidación (por ejemplo, desamidación de Asn), oxidación (por ejemplo, oxidación de Trp), isomerización (por ejemplo, isomerización de Asp), reticulación con inmunoprecipitación/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo, fragmentación de la región bisagra), formación de succinimida, cisteína(s) no emparejada(s), extensión N terminal, procesamiento C terminal, diferencias de glucosilación, etc. En algunos modos de realización, la oxidación en una proteína se determina usando una o más de RP-HPLC, CL/EM o cartografía de péptidos obtenidos por proteólisis con tripsina. En algunos modos de realización, la oxidación en un anticuerpo se determina como un

porcentaje usando una o más de RP-HPLC, CL/EM o cartografía de péptidos obtenidos por proteólisis con tripsina, y la fórmula de:

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

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

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se logra fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de o después de la preparación de la formulación.

III. Administración de formulaciones de proteínas

La formulación (tal como una formulación líquida) se administra a un mamífero que necesita tratamiento con la proteína (por ejemplo, un anticuerpo), preferentemente un ser humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como administración intravenosa como una inyección intravenosa rápida o por infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasínovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. En un modo de realización, la formulación líquida se administra al mamífero por administración intravenosa. Para dichos propósitos, la formulación se puede inyectar usando una jeringuilla o por medio de una vía i.v., por ejemplo. En un modo de realización, la formulación líquida se administra al mamífero por administración subcutánea.

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

En un sentido farmacológico, en el contexto de la invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" de una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) se refiere a una cantidad eficaz en la prevención o tratamiento de un trastorno para el tratamiento del que el anticuerpo es eficaz. Como proposición general, la cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína administrada estará en el intervalo de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 50 mg/kg de peso corporal del paciente, ya sea por una o más administraciones, siendo el intervalo típico de proteína usada de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 20 mg/kg, preferentemente de aproximadamente 0,3 a aproximadamente 15 mg/kg, administrada diariamente, por ejemplo. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas posológicas. Por ejemplo, se puede administrar una proteína a una dosis de aproximadamente 100 o 400 mg cada 1, 2, 3 o 4 semanas o se administra una dosis de aproximadamente 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0, 9,5, 10,0, 15,0 o 20,0 mg/kg cada 1, 2, 3 o 4 semanas. La dosis se puede administrar como una única dosis o como múltiples dosis (por ejemplo, 2 o 3 dosis), tal como infusiones. La evolución de este tratamiento se supervisa fácilmente por técnicas convencionales.

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

En el presente documento se proporcionan procedimientos de cribado de un compuesto que previene la oxidación de una proteína en una composición de proteínas. En el presente documento también se proporciona un procedimiento que comprende seleccionar un compuesto que tiene un menor potencial de oxidación y menos fotosensibilidad en comparación con L-triptófano y someter a prueba el efecto del compuesto seleccionado sobre la prevención de la oxidación de la proteína. En algunos modos de realización, la fotosensibilidad se mide en base a la cantidad de H₂O₂ producido por el compuesto tras la exposición a la luz. Por ejemplo, se puede exponer una composición líquida que comprenda el compuesto a luz a 250 W/m² durante una determinada cantidad de tiempo y se cuantifica la formación de H₂O₂ resultante. Un compuesto con menos fotosensibilidad produce menos H₂O₂ tras la exposición a una determinada cantidad de luz que un compuesto que tiene una mayor fotosensibilidad tras la exposición a la misma cantidad de luz. En algunos modos de realización, se selecciona el compuesto que produce menos de aproximadamente un 10 %, menos de aproximadamente un 15 %, menos de aproximadamente un 20 %, menos de aproximadamente un 25 % de la cantidad de H₂O₂. Se puede producir H₂O₂ por oxidación de residuos de aminoácido en una proteína que sean susceptibles a la oxidación. En algunos modos de realización, el potencial de oxidación se mide por voltametría cíclica.

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

V. Artículos de fabricación

En el presente documento se proporciona un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene la formulación de la invención y opcionalmente proporciona instrucciones para su uso. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales y jeringuillas. El recipiente se puede formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio, aleación de metales (tal como acero inoxidable) o plástico. Un recipiente ejemplar es un recipiente de aleación de metales de 300 cm³ (por ejemplo, para su almacenamiento a -20 °C). Un recipiente ejemplar es un vial de vidrio de único uso de 3-20 cm³. De forma alternativa, para una formulación de múltiples dosis, el recipiente puede ser un vial de vidrio de 3-100 cm³. El recipiente contiene la formulación y la etiqueta en o asociada al recipiente puede indicar el modo de empleo. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas y prospectos del envase con instrucciones para su uso.

Se considera que la memoria descriptiva es suficiente para posibilitar que un experto en la técnica ponga en práctica la invención. Diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y se encontrarán dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

EJEMPLOS

La invención se entenderá más completamente por referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, no se deben interpretar como limitantes del alcance de la invención. Se entiende que los ejemplos y modos de realización descritos en el presente documento son solo para propósitos ilustrativos y que diversas modificaciones o cambios a la luz de los mismos se sugerirán a los expertos en la técnica y se han de incluir dentro del espíritu y ámbito de esta solicitud y alcance de las reivindicaciones adjuntas.

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

Se ha demostrado que los anticuerpos monoclonales producen ERO a través de la vía de oxidación del agua catalizada por anticuerpos (ACWOP), en la que los anticuerpos catalizan potencialmente una reacción entre agua y oxígeno singlete que genera peróxido de hidrógeno (Wentworth *et al.*, *Science* 293(5536): 1806-11 (2001); Wentworth *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(20): 10930-5 (2000)). En la ACWOP, se genera una variedad de ERO, incluyendo anión superóxido, trióxido de dihidrógeno, ozono, e incluso radicales hidrotroxio, en la vía hacia la producción de peróxido de hidrógeno (Zhu *et al.*, *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(8):2247-52 (2004)). Se ha demostrado que los triptófanos expuestos a la superficie en un anticuerpo anti-DR5 monoclonal, drozitumab (número CAS 912628-39-8), también denominado en el presente documento mAb1, actúan como generadores de sustrato (¹O₂ y O₂^{•-}) que facilitan la ACWOP incluso en condiciones de luz moderadas de una manera dependiente del tiempo y de la concentración (Sreedhara *et al.*, *Mol. Pharmaceutics* (2013)). Se demostró que mAb1 era susceptible a la oxidación, en particular, durante su almacenamiento en condiciones farmacéuticamente pertinentes (Sreedhara *et al.*, *Mol. Pharmaceutics* (2013)). Se demostró que la oxidación era específica de sitio y se localizaba en Trp53 (W53) en la CDR de la cadena pesada (Fab) como se evalúa por cartografía de péptidos obtenidos por proteólisis con tripsina. Adicionalmente, se usó un ensayo de HPLC de fase inversa para medir la oxidación total en las regiones Fab y Fc de HC de mAb1 por medio de una digestión con papaína, reducción con DTT y separación de fase inversa. Se identificaron los picos de RP-HPLC usando CL/EM y mostraron una fuerte correlación con los resultados del cartografiado de péptidos obtenidos por proteólisis con tripsina, lo que indica que el procedimiento de RP se podría usar como sustituto para la detección de la oxidación (es decir, % de Fab) en W53 (Sreedhara *et al.*, *Mol. Pharmaceutics* (2013)). En el procedimiento de digestión con papaína de RP, los picos de oxidación de Fab y Fc se eluyeron antes que sus respectivos picos principales, lo que permitió la cuantificación del % de oxidación de Fab y el % de oxidación de Fc en relación con sus áreas de pico totales. El estudio demostró además que el peróxido de hidrógeno podría servir como sustituto para una serie de ERO, incluyendo superóxido y oxígeno singlete.

Para determinar si se puede usar la exposición a la luz limitada (es decir, controlada) como un modelo de agresión acelerado para estudiar la oxidación de proteínas, se usó el mismo anticuerpo IgG1 monoclonal humano (mAb1) para cribar y evaluar antioxidantes potenciales. Recientemente se ha demostrado que el L-triptófano (L-Trp), un antioxidante usado en formulaciones de proteínas, es fotosensible (Igarashi *et al.*, *Anal Sci* 23(8):943-8 (2007)) y que tiene la capacidad de producir H₂O₂ tras la exposición a la luz. La sensibilidad de mAb1 a L-Trp bajo agresión lumínica se evaluó, con y sin la adición de L-metionina (L-Met), como antioxidante potencial. Se expresó mAb1 en células de ovario de hámster chino (CHO) y se purificó por una serie de procedimientos de cromatografía, incluyendo purificación por

afinidad por cromatografía con proteína A y cromatografía de intercambio iónico. Se preparó mAb1 a 5 mg/ml en una formulación de acetato de histidina 20 mM, trehalosa 250 mM y polisorbato 20 al 0,02 % en un vial de vidrio y con L-Trp 1 mM y diversas concentraciones de L-Met, que variaban desde 10 mM a 100 mM y se expuso a ocho horas de luz a 250 W/m² en un instrumento de prueba Atlas SunTest CPS+ Xenon (Chicago, IL). Los viales de control se envolvieron con papel de aluminio y se trataron de forma similar. Después de la exposición a la luz, se prepararon soluciones para su análisis por HPLC de fase inversa. Para RP-HPLC, se preparó una solución de mAb1 del estudio de agresión a 1,1 mg/ml en Tris 0,1 M, EDTA 4,4 mM y cisteína 1,1 mM. Se añadieron 150 µl de papaína 0,1 mg/ml a 1,35 ml de la solución de mAb1 antes de su incubación a 37 °C durante dos horas. Después de la incubación, se combinaron 900 µl de la solución con 100 µl de ditioneitol 1 M (DTT) y se incubaron durante otros treinta minutos a 37 °C. A continuación, las muestras se sometieron a un sistema de HPLC Agilent, Inc. 1100/1200 (Santa Clara, CA) equipado con detección UV a 280 nm junto con una columna de difenilo Varian, Inc. Pursuit 3 µm, 2 mm de DI x 250 mm (Palo Alto, CA). La fase A móvil fue TFA al 0,1 % en agua. La fase B móvil fue TFA al 0,1 % en acetonitrilo. El gradiente de la fase móvil se incrementó linealmente de un 34 % de B a los 0 minutos a un 43 % de B a los 50,0 minutos, a continuación, a un 95 % de B a los 50,1 minutos. El gradiente permaneció en un 95 % de B hasta los 60,1 minutos, y, a continuación, disminuyó linealmente de un 95 % de B a un 34 % de B entre los 60,1 y 60,2 minutos. El gradiente permaneció en un 34 % de B hasta el final del ciclo a los 80,2 minutos. La temperatura de la columna fue de 65 °C, el caudal total fue de 0,2 ml/min y el volumen de inyección de cada muestra fue de 6 µl. A continuación, los cromatogramas se integraron para la cuantificación de la oxidación.

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

Se ha demostrado que la oxidación en la región Fc de mAb1 es predominantemente de los residuos de Met Met 254 y Met 430 (Sreedhara *et al.*, *Mol. Pharmaceutics* (2013)). El análisis de los efectos de exposición a la luz de L-Trp y L-Met sobre la oxidación de Fc en mAb1 demostró que el material de referencia mAb1 y el control con papel metalizado tenían aproximadamente un 8 % de oxidación de Fc incluso antes de la exposición a la luz (fig. 1B). La exposición a la luz dio como resultado solo un incremento sin importancia de la oxidación de Fc ("Sin excipiente") para mAb1 en el tampón de formulación. Sin embargo, la incubación con L-Trp 1 mM dio como resultado más de un 20 % de oxidación en estos sitios de Met en la región Fc como se observa por el ensayo de RP-HPLC. La adición de diversas concentraciones de L-Met (10, 25, 50 y 100 mM) a formulaciones que contenían L-Trp 1 mM redujo la cantidad de oxidación de Fc, aunque incluso L-Met 100 mM no redujo la oxidación de Fc al nivel de los controles (fig. 1B).

Se informó previamente de que L-Trp producía H₂O₂ por medio de ion superóxido y de manera subestequiométrica, mientras que los anticuerpos, en condiciones similares, estaban produciendo cantidades catalíticas (Wentworth *et al.*, *Science* 293(5536): 1806-11 (2001); McCormick *et al.*, *Journal of the American Chemical Society* 100:312-313 (1978)). Para someter a prueba la sensibilidad del L-Trp libre en condiciones farmacéuticamente pertinentes, tales como tanto en condiciones de ICH como de luz ambiental, se expusieron formulaciones que comprendían L-Trp de 0,32 mM a 7,5 mM (el L-Trp se disolvió en tampón fosfato de sodio a pH 7,1) durante 3 horas a luz UV a 250 W/m² y aproximadamente 150 k lux de luz visible. Se tomaron muestras y se analizaron de inmediato por medio de del ensayo con Amplex para detectar la cantidad de H₂O₂ generado en estas condiciones. Se generó una gran cantidad de H₂O₂ por el L-Trp libre tras la exposición a la luz de una manera dependiente de la concentración (fig. 2). Esta generación de H₂O₂ se redujo en gran medida en presencia de ácido de sodio 50 mM, un desactivador de oxígeno singlete conocido (fig. 2). Cuando se incubó L-Trp con una combinación de NaN₃ 50 mM y 150 U de superóxido dismutasa (SOD) o SOD sola, todavía se detectaron cantidades significativas de H₂O₂ en las muestras que no contenían NaN₃. Esto indicó que, además de oxígeno singlete, también se generó ion superóxido tras la fotoirradiación, que se convirtió en H₂O₂ por SOD.

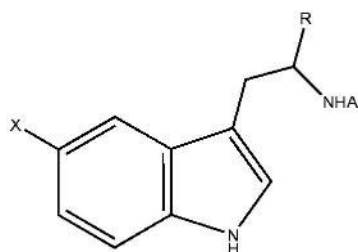
Mientras se confirmaba la fotosensibilidad del L-Trp libre en condiciones de luz de ICH, se estudió el efecto de la luz ambiental que típicamente se observaba en los laboratorios. Las mediciones usando un fotómetro digital DLM1 en diversos laboratorios indicaron un promedio de 300 lux en una sobremesa de laboratorio (con iluminación fluorescente blanca), un promedio de 3000 lux en una campana de flujo laminar (con iluminación fluorescente blanca) y aproximadamente 10000 lux para un alféizar de una ventana expuesto a la luz solar sureste. En estas condiciones, L-Trp en tampones de formulación que contenían 50 mg/ml de mAb1 produjo peróxido de hidrógeno en el intervalo micromolar como se detectó usando el ensayo con Amplex UltraRed (fig. 3A). La producción de peróxido se incrementó tanto con la luminosidad (300, 3000 y 10000 lux) como el tiempo (1, 3 y 7 días). Se analizaron además las muestras de proteínas usando el ensayo de RP-HPLC específico de mAb1 y mostraron una oxidación de Fab de la cadena pesada incrementada correspondiente a la oxidación en W53 con luminosidad incrementada (fig. 3B). Al mismo tiempo, el % de oxidación de Fc en mAb1 en estas condiciones se incrementó de un 5 a un 40 % entre 300 y 10000 lux,

respectivamente. Se determinó que estos niveles de exposición a la luz y tiempo eran farmacéuticamente pertinentes para la manipulación de las sustancias farmacéuticas bajo luz y temperatura ambientales y antes de las operaciones de llenado/acabado y potencialmente mientras se inspeccionaban los viales con especialidad farmacéutica. Estos resultados respaldaron que L-Trp es fotosensible y que produce varias especies reactivas del oxígeno, incluyendo oxígeno singlete, superóxido y H_2O_2 , que pueden ser perjudiciales para la calidad del producto de mAb, y que se debe tener cuidado al manipular y almacenar los tampones que contienen L-Trp.

Ejemplo 2: cribado de compuestos antioxidantes candidatos.

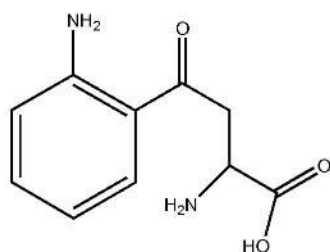
El triptófano (Trp) es un aminoácido rico en electrones que se somete a reacciones de adición oxidativa y electrófila en presencia de ERO, tal como radicales hidroxilo y oxígeno singlete. Cualquier antioxidante potencial para proteger de la oxidación de Trp en proteínas debe tener una reactividad similar,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

(A) Derivados de triptófano

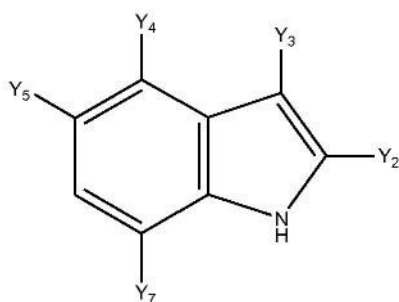


Denominación	R	X	A
L-triptófano	COOH	H	H
5-hidroxitriptófano	COOH	OH	H
5-metoxitriptófano	COOH	OCH ₃	H
5-aminotriptófano	COOH	NH ₂	H
5-fluorotriptófano	COOH	F	H
N-acetilriptófano	COOH	H	CH ₃ C(O)
Triptamina	H	H	H
Triptofanamida	CONH ₂	H	H
Serotonina	H	OH	H
Melatonina	H	OCH ₃	CH ₃ C(O)

(B) Quinurenina



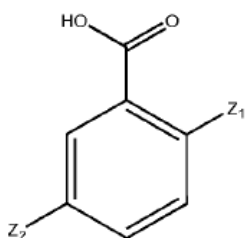
(C) Derivados de indol



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

(D) Derivados de ácido aromático

5



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

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

10

15

20

25

Aunque L-Trp puede haber sido un antioxidante eficaz en determinadas circunstancias, su fotosensibilidad puede limitar su utilidad durante el procesamiento normal sin precauciones especiales. De ahí que se investigara la fotosensibilidad de las moléculas anteriores y las moléculas se clasificaran en cuanto a su capacidad de generación de H₂O₂ con respecto a L-Trp. Como herramienta de cribado, los candidatos antioxidantes se expusieron a la luz durante cuatro horas a 250 W/m² y la formación de H₂O₂ resultante se cuantificó por el ensayo con Amplex UltraRed. Específicamente, se prepararon antioxidantes a 1 mM en tampón acetato de histidina 20 mM a pH 5,5. Las soluciones antioxidantes 1 mM se dividieron en alícuotas en viales de vidrio (2 ml/vial de vidrio) y se expusieron a cuatro horas de luz a 250 W/m² en un instrumento de prueba Atlas SunTest CPS+ Xenon (Chicago, IL). La dosis UV total fue de 90 vatios-hora/metro cuadrado y la dosis de luz visible total fue de 0,22 millones de lux horas durante el periodo de 4 horas. Los viales de control se envolvieron con papel de aluminio y se trataron de forma similar. La cantidad de peróxido de hidrógeno generado después de la exposición a la luz se midió usando el ensayo con Amplex® UltraRed (Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. Tras la adición de peroxidasa de rábano picante (HRP), el tinte reaccionó estequiométricamente 1:1 con H₂O₂, dando como resultado la producción del producto de oxidación fluorescente resorufina. En este estudio, se obtuvieron lecturas de fluorescencia usando un lector de microplacas Spectra Max M2 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA), fijándose la excitación y la emisión a 560 nm y 590 nm, respectivamente. Se determinaron las concentraciones de H₂O₂ finales usando una curva estándar que variaba de 0 µM a 20 µM.

30

El análisis de generación de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) por derivados de triptófano tras la exposición a la luz demostró que en condiciones similares de luz (correspondientes a 0,22 millones de lux horas durante un periodo de 4 horas) y tampón (acetato de L-His 20 mM, pH 5,5), 5-hidroxi-L-triptófano (5-HT) producía aproximadamente una

décima parte del H_2O_2 , mientras que quinurenina producía aproximadamente una quinta parte del H_2O_2 , en comparación con L-Trp (fig. 4A). Otros derivados de triptófano produjeron entre un 30 % y un 105 % del H_2O_2 producido por L-Trp. En comparación con L-Trp, Trolox (un derivado de vitamina E soluble en agua) produjo 123 veces más H_2O_2 , y la piridoxina (vitamina B6) produjo 5 veces más H_2O_2 (tabla 1). El indol, que tiene una estructura básica similar a L-Trp, se comportó de forma similar a L-Trp, pero el ácido indol-3-acético produjo el doble de H_2O_2 (fig. 4B). Los derivados hidroxil de indol se comportaron como 5-HT en tanto que produjeron cantidades insignificantes de H_2O_2 tras la exposición a la luz. También se sometieron a prueba varios derivados bioquímicamente pertinentes de L-Trp, a saber, triptamina, serotonina y melatonina. La triptamina produjo aproximadamente la mitad de H_2O_2 que L-Trp (tabla 1). Curiosamente, la serotonina (5-hidroxitriptamina) se comportó de forma muy parecida a los derivados 5-OH de indol y triptófano, produciendo muy poco H_2O_2 tras la exposición a la luz, mientras que la melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina) produjo menos de un tercio del H_2O_2 producido por L-Trp (tabla 1).

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

Compuesto	(H_2O_2 producido por el compuesto)/(H_2O_2 producido por L-Trp)
L-Trp	1
L-trpamida	0,43
N-acetil-L-Trp	0,31
N-acetil-L-trpamida	0,34
5-fluoro-L-Trp	0,71
5-hidroxil-L-Trp	0,09
5-metoxi-DL-Trp	1,05
5-amino-DL-Trp	0,29
L-quinurenina	0,20
Trolox	122,75
Piridoxina	5,16
Indol	0,95
Ácido indol-3-acético	2,40
4-hidroxilindol	0,00
5-hidroxilindol	-0,08
Ácido 5-hidroxilindol-3-acético	0,11
7-hidroxilindol	-0,03
Ácido 7-hidroxilindol-2-carboxílico	0,15
Triptamina	0,53
Serotonina (5-hidroxitriptamina)	0,03
Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina)	0,28
Ácido salicílico	0,03
Ácido 5-hidroxisalicílico	0,84
Ácido antranílico	2,50
Ácido 5-hidroxiantranílico	0,44

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

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

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

En base a los resultados del ensayo de cribado por fotosensibilidad, los compuestos con sustituciones en el anillo aromático parecían provocar un impacto en la cantidad de peróxido de hidrógeno generado. Puesto que el objetivo

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

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

Tabla 2: Potenciales de oxidación de los excipientes

Compuesto	Potencial de oxidación (V frente a Ag/AgCl)
5-amino-DL-triptófano	0,410
Ácido 5-hidroxiindol-3-acético	0,535
5-hidroxi-L-triptófano	0,565
5-hidroxiindol	0,580
Serotonina HCl (5-hidroxitriptamina HCl)	0,600
Melatonina (N-acetil-5-metoxitriptamina)	0,730
N-acetil-L-triptófano	0,875
N-acetil-L-triptofanamida	0,880
5-metoxi-DL-triptófano	0,890
L-triptófano	0,938
Ácido indol-3-acético	0,948
5-fluoro-L-triptófano	0,965
Triptamina HCl	1,010
L-triptofanamida	1,015
L-quinurenina	1,040
5-nitro-DL-triptófano	1,055
Ácido salicílico	1,080

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

Se determinó una correlación entre el potencial de oxidación y la generación de H₂O₂ inducida por la luz para 16 compuestos que tenían potenciales de oxidación por encima y por debajo del potencial de oxidación de L-Trp y niveles de producción de H₂O₂ por encima y por debajo de los de L-Trp (fig. 6). Puesto que el indol y triptófano se comportaron de forma similar en la producción de H₂O₂ bajo exposición a la luz, fue posible que las sustituciones en la posición C₃ del anillo de 5 miembros no afectaran a esta propiedad. Sin embargo, la triptamina, con una sustitución -CH₂CH₂NH₂, y el ácido indol-3-acético, con una sustitución CH₂COOH en la posición C₃, produjeron dos veces menos y dos veces

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

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

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

Tabla 3: Modelos de agresión oxidativa

Modelo de agresión	Mecanismo	Propósito
AAPH	Peróxidos de alquilo, catalizado por radical alquilo	Imitar a los peróxidos de alquilo de polisorbato degradado
Luz	Oxígeno singlete (¹ O ₂), anión superóxido (O ₂ ⁻), H ₂ O ₂	Imitar a la exposición a la luz ambiental durante el procesamiento y almacenamiento
Fenton (H ₂ O ₂ + Fe)	Radical hidroxilo, metal catalizado	Imitar al residuo de metal de superficies de acero inoxidable

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

la oxidación de Fc de HC.

Se calcularon el % de oxidación de Fab y el % de oxidación de Fc como sigue (cabe señalar que cada molécula de anticuerpo tiene dos Fab, por lo tanto, el % de oxidación de Fab obtenido no reflejaba el % de anticuerpo intacto oxidado que contenía la oxidación de Fab):

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

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

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

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

Para el estudio de agresión con Fenton de mAb1, se preparó mAb1 a 3 mg/ml en una formulación de clorhidrato de histidina 20 mM, pH 6,0. Se añadieron antioxidantes a una concentración final de 1 mM a partir de soluciones madre 10 mM preparadas en clorhidrato de histidina 20 mM. Se añadió una concentración final de FeCl₃ 0,2 mM y 10 ppm de H₂O₂ a cada solución de mAb1 y, a continuación, se incubó a 40 °C durante 3 horas. Después de su incubación, se desactivó cada reacción por adición de L-Met 100 mM (preparada a partir de una solución madre de L-Met 200 mM en clorhidrato de histidina 20 mM) y, a continuación, se preparó para su análisis por HPLC de fase inversa como se describe anteriormente.

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

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

lumínico y los resultados del estudio con NaN_3 en el ejemplo 2 mostraron una buena correlación entre la cantidad de H_2O_2 generado por un excipiente y la oxidación de Met en Fc de mAb1.

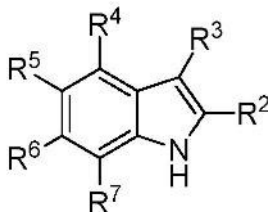
La reacción de Fenton, usando una mezcla de H_2O_2 e iones de Fe, genera oxidación a través de una reacción con radicales hidroxilo catalizada por metal (Prousek *et al.*, *Pure and Applied Chemistry* 79(12):2325-2338 (2007)). Esta reacción generó la oxidación de Fab, es decir, triptófano, en mAb1. La reacción también se llevó a cabo en presencia de antioxidantes seleccionados que fueron útiles frente a la oxidación inducida por tanto AAPH como luz como se informa anteriormente. Se analizaron los datos relacionados con las propiedades antioxidantes frente a la reacción mediada de Fenton usando el ensayo de RP-HPLC como se describe anteriormente (fig. 9). En las condiciones sometidas a prueba, la reacción de Fenton produjo aproximadamente cuatro veces la oxidación en la región Fab de mAb1 frente al control. La mayoría de los antioxidantes sometidos a prueba, excepto el ácido salicílico, mostraron propiedades de desactivación de radicales hidroxilo similares a L-Trp, lo que protegía de la oxidación de Fab en aproximadamente un 25 % con respecto al caso sin excipiente (figura 9A). Con respecto a la protección frente a la oxidación de Fc, los excipientes sometidos a prueba (distintos del ácido salicílico) se comportaron ligeramente mejor que L-Trp (fig. 9B).

Las sustituciones por donación de electrones en el anillo aromático pueden facilitar la formación del catión radical indolilo y una reactividad potencialmente más rápida con los radicales. Los grupos hidroxilo unidos a los anillos aromáticos son donantes de electrones, ya que el átomo de oxígeno tiene un par de electrones solitarios que pueden estar implicados en la estructura resonante que da lugar a menores potenciales de oxidación y a potencialmente más sensibilidad al ataque electrófilo. Como se observa en la tabla 2, las sustituciones con hidroxilo dieron lugar a potenciales de oxidación sustancialmente menores, lo que indica que estos compuestos podrían producir mejores antioxidantes que L-Trp y/o indol. Los derivados de indol sustituido con hidroxilo y de Trp también produjeron la menor cantidad de peróxido de hidrógeno tras la irradiación con luz (tabla 1). Esto se pudo haber debido a la baja eficacia cuántica de estas moléculas en la transferencia de energía lumínica al oxígeno molecular, junto con sus altas constantes de desactivación como se demuestra para 5-hidroxi-L-triptófano (Dad *et al.*, *J Photochem Photobiol B*, 78(3):245-51 (2005)). Como se muestra en las fig. 7 y fig. 8, los derivados de indol sustituido con hidroxilo y de triptófano proporcionaron una protección considerable frente a la oxidación inducida por AAPH, luz y Fenton con respecto a W53 en la región Fab de mAb1. Sin embargo, ninguno de estos compuestos proporcionó una protección antioxidante sustancial con respecto a la oxidación de Met en la región Fc de mAb1 en la degradación inducida por AAPH. Por el contrario, los derivados de indol y de triptófano se comportaron como se esperaba bajo la oxidación mediada por la luz. Las moléculas que produjeron mayores cantidades de peróxido tras la fotoactivación (por ejemplo, L-Trp y Trp-amida) también produjeron mayor oxidación de Met en la región Fc de mAb1, mientras que los derivados -OH produjeron menor H_2O_2 y también la cantidad más baja de oxidación de Met en la región Fc en condiciones de fotooxidación. La metionina se oxidó fácilmente a sulfóxido de metionina por H_2O_2 y peróxidos de alquilo a través de una reacción de sustitución nucleófila (Li *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 48:490-500 (1995)). La fotooxidación de metionina a sulfóxido de metionina se produce por medio de oxígeno singlete, aunque esta reacción se produce por medio de un intermedio diferente (Li *et al.*, *Biotechnology and Bioengineering* 48:490-500 (1995)). AAPH se degrada bajo estrés térmico para dar tanto peróxidos de alquilo como radicales alcóxido que tienen diferente reactividad hacia Met y Trp, respectivamente (Werber *et al.*, *J Pharm Sci* 100(8):3307-15 (2011)). Los estudios previos han demostrado que L-Trp pudo prevenir la oxidación de Trp en PTH inducida por AAPH y que L-Trp no previno la oxidación de Met en PTH en las mismas condiciones (Ji *et al.*, *J Pharm Sci* 98(12):4485-500 (2009)). De forma similar, L-Met pudo proteger a PTH frente a la oxidación inducida por AAPH, pero no protegió de la oxidación de Trp. Estas observaciones estaban en línea con los mecanismos de reacción en los que la oxidación de Met es predominantemente por medio de reacciones de sustitución nucleófila, mientras que la oxidación de Trp es principalmente por medio de mecanismos con radicales libres.

Un supuesto mecanismo de fotoactivación de L-Trp que da lugar a oxígeno singlete y, en definitiva, a H_2O_2 y a la formación y desactivación de oxígeno singlete por 5-HT se muestra en la fig. 10.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación líquida que comprende un anticuerpo y un compuesto que previene la oxidación del anticuerpo en la formulación líquida, en la que el compuesto es de fórmula:



en la que R² y R³ se seleccionan independientemente de hidrógeno, hidroxilo, -COOH y -CH₂COOH; y

R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ se seleccionan independientemente de hidrógeno e hidroxilo;

siempre que uno de R², R³, R⁴, R⁵, R⁶ y R⁷ sea hidroxilo;

o una sal farmacéuticamente aceptable del mismo.

2. La formulación de la reivindicación 1, en la que R⁴, R⁵ o R⁷ es hidroxilo.

3. La formulación de la reivindicación 1, en la que R⁵ es hidroxilo.

4. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que es una formulación farmacéutica adecuada para su administración a un sujeto.

5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que es acuosa.

6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el compuesto en la formulación es de 0,3 mM a 5 mM.

7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el compuesto en la formulación es de 0,3 mM a 1 mM.

8. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que el anticuerpo es susceptible a la oxidación.

9. La formulación de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo es un anticuerpo policlonal, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo humano, un anticuerpo quimérico o fragmento de anticuerpo.

10. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en la que la concentración de anticuerpos en la formulación es de 1 mg/ml a 250 mg/ml.

11. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende además uno o más excipientes seleccionados del grupo que consiste en un estabilizante, un tampón, un tensioactivo y un agente de tonicidad.

12. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 4-11, en la que la formulación tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7,0.

Figura 1

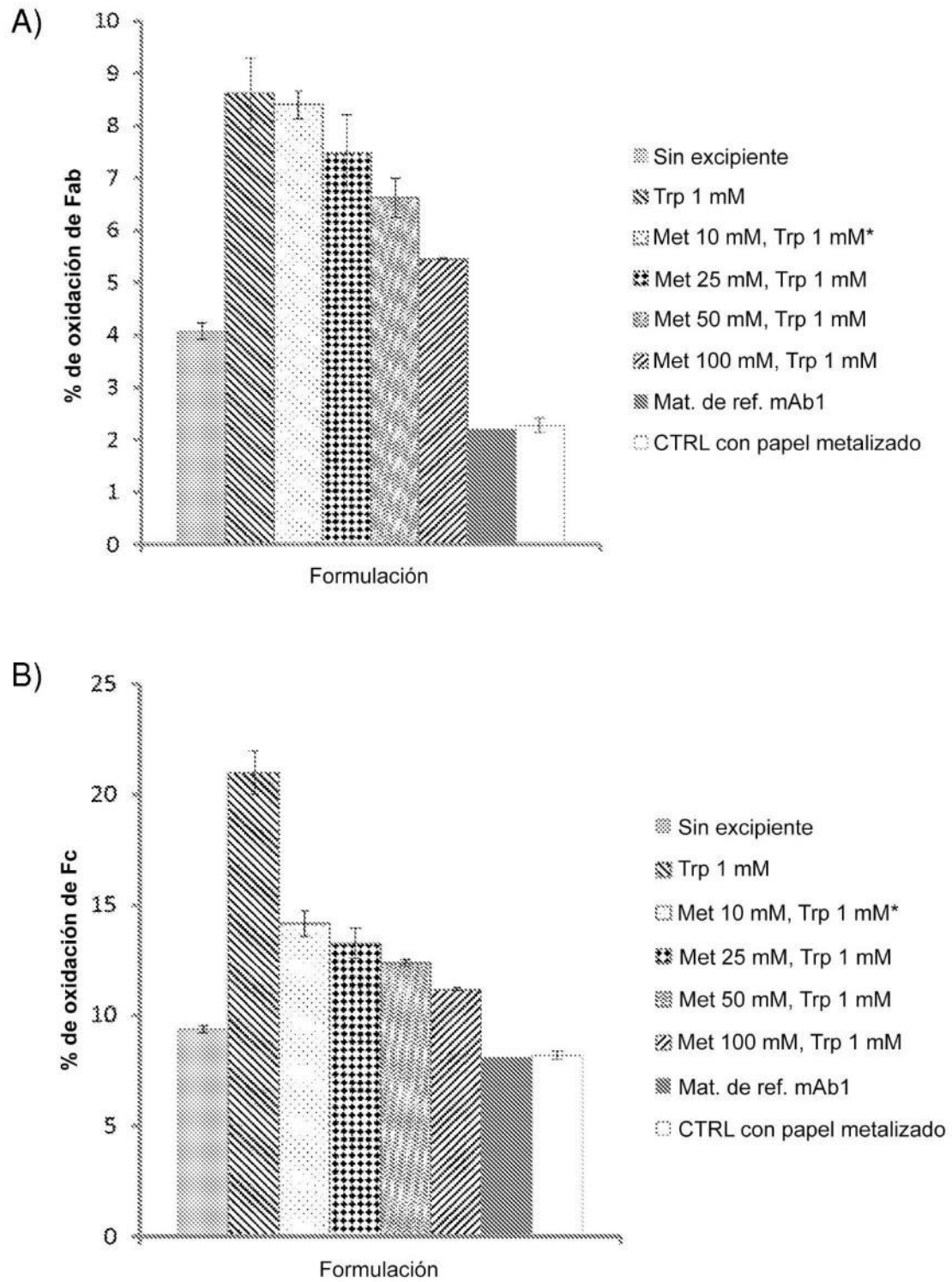


Figura 2

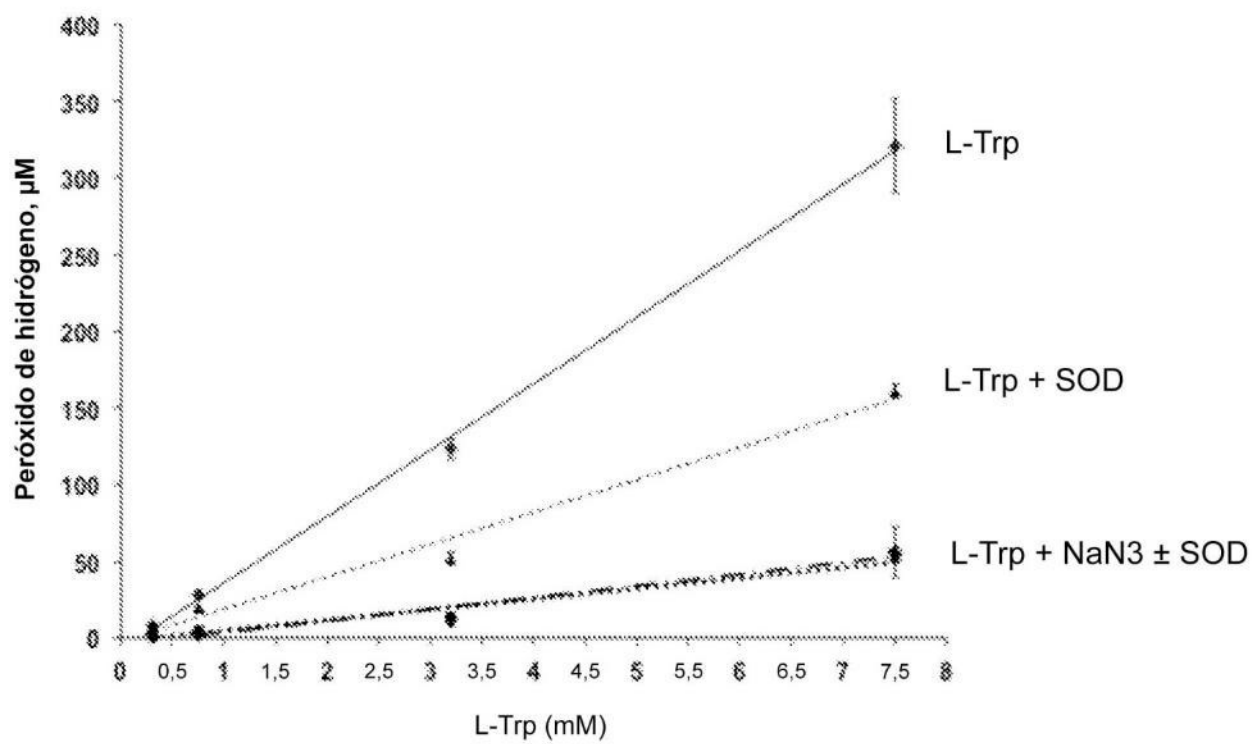


Figura 3

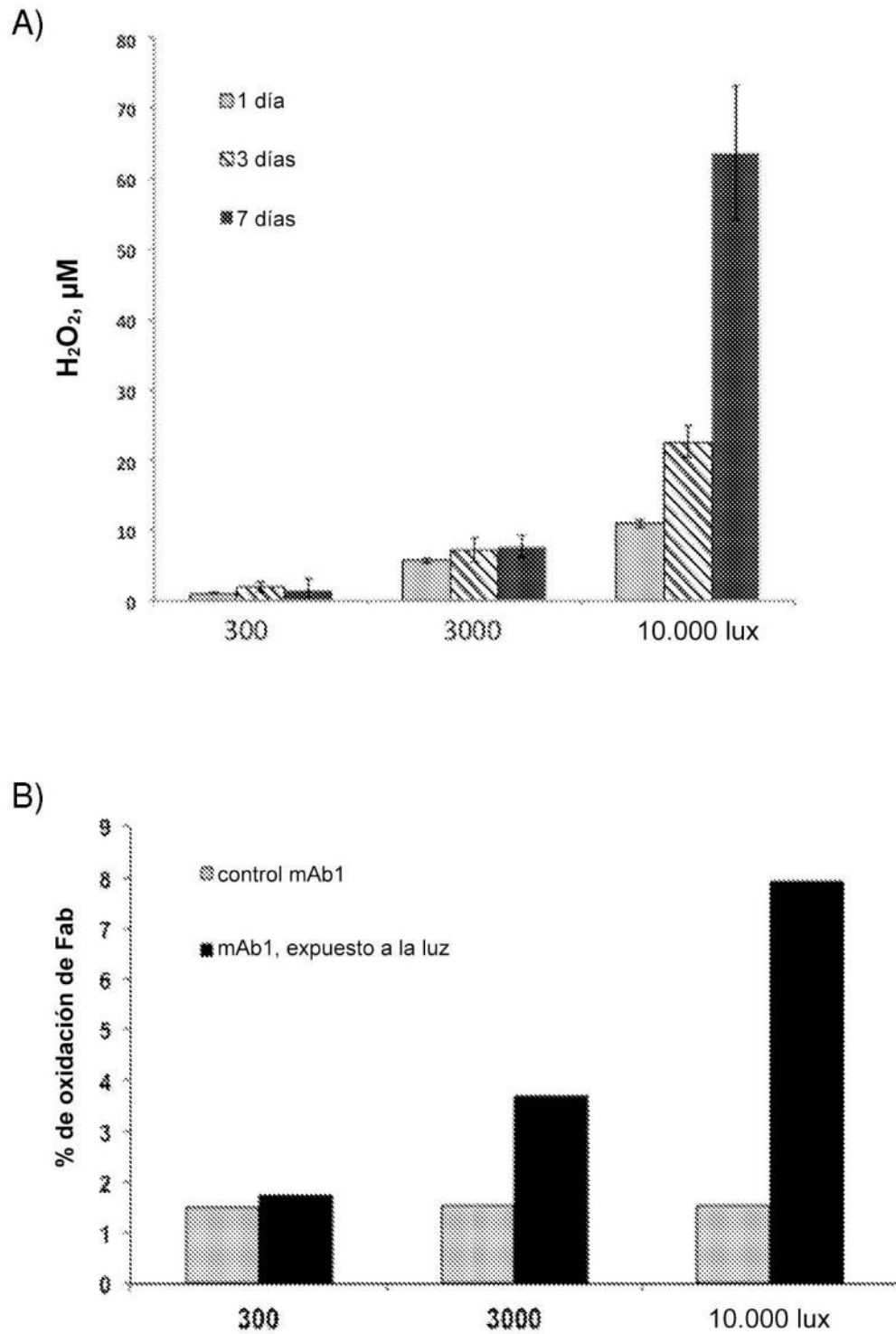


Figura 4

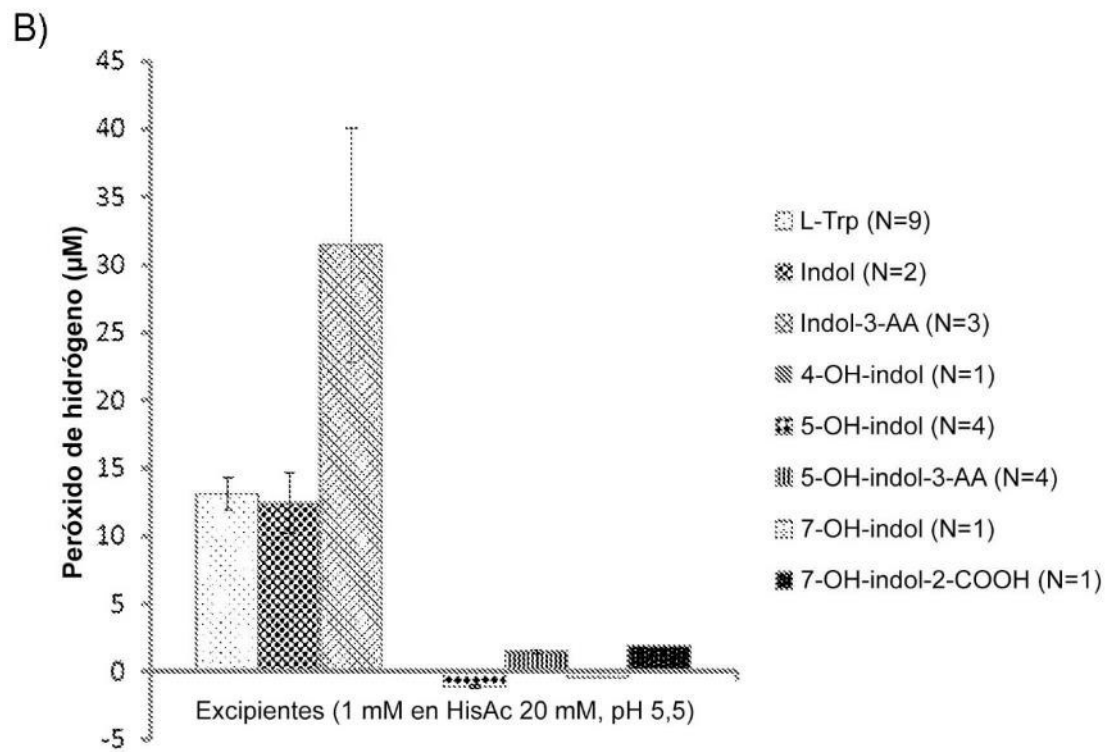
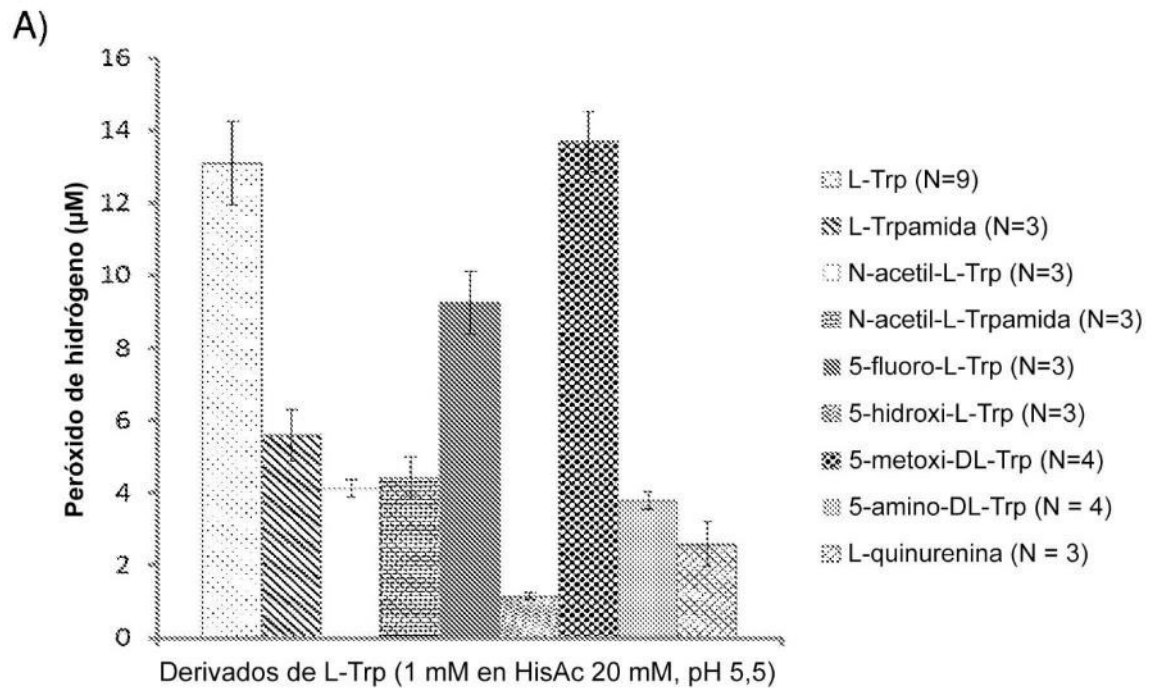


Figura 5

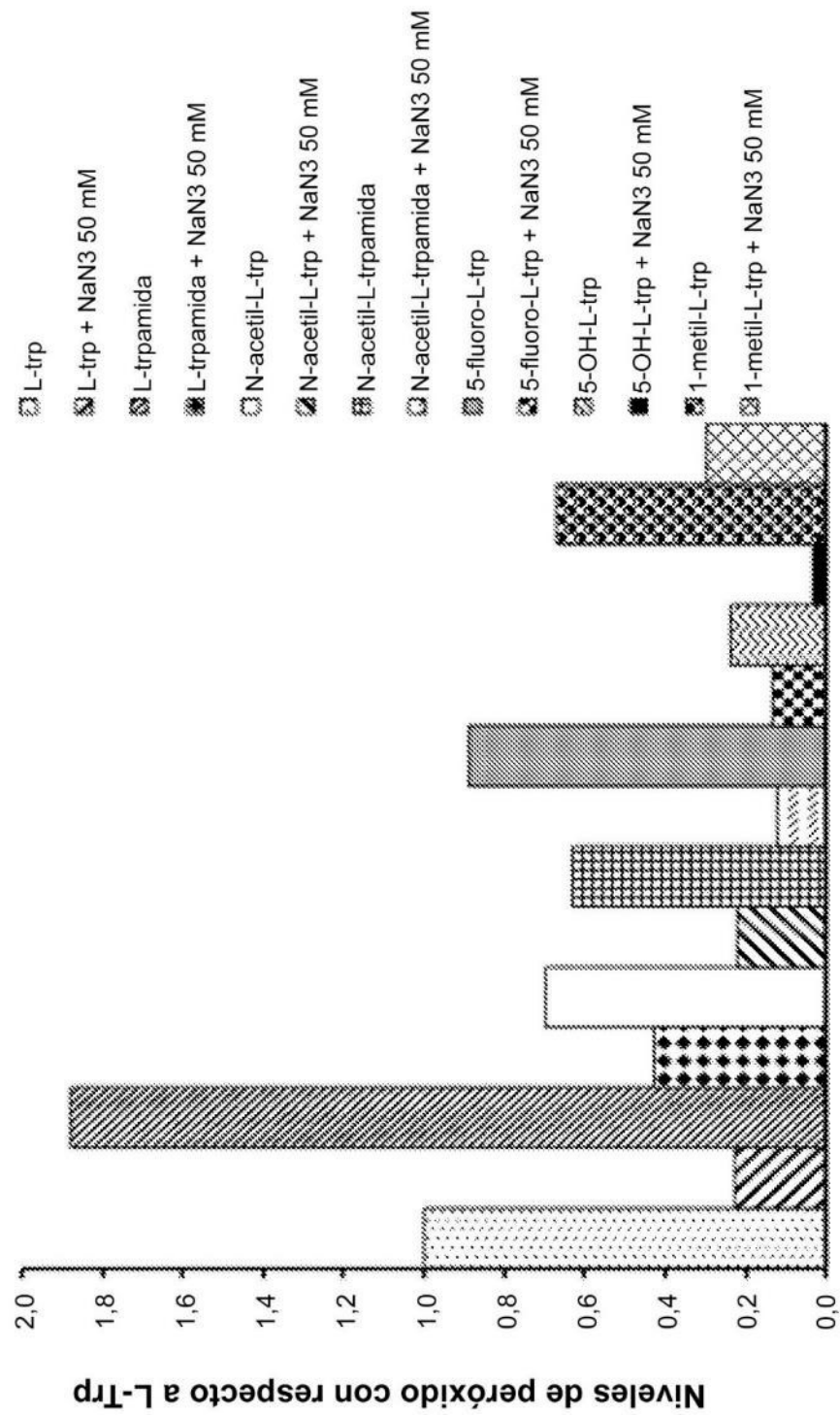


Figura 6

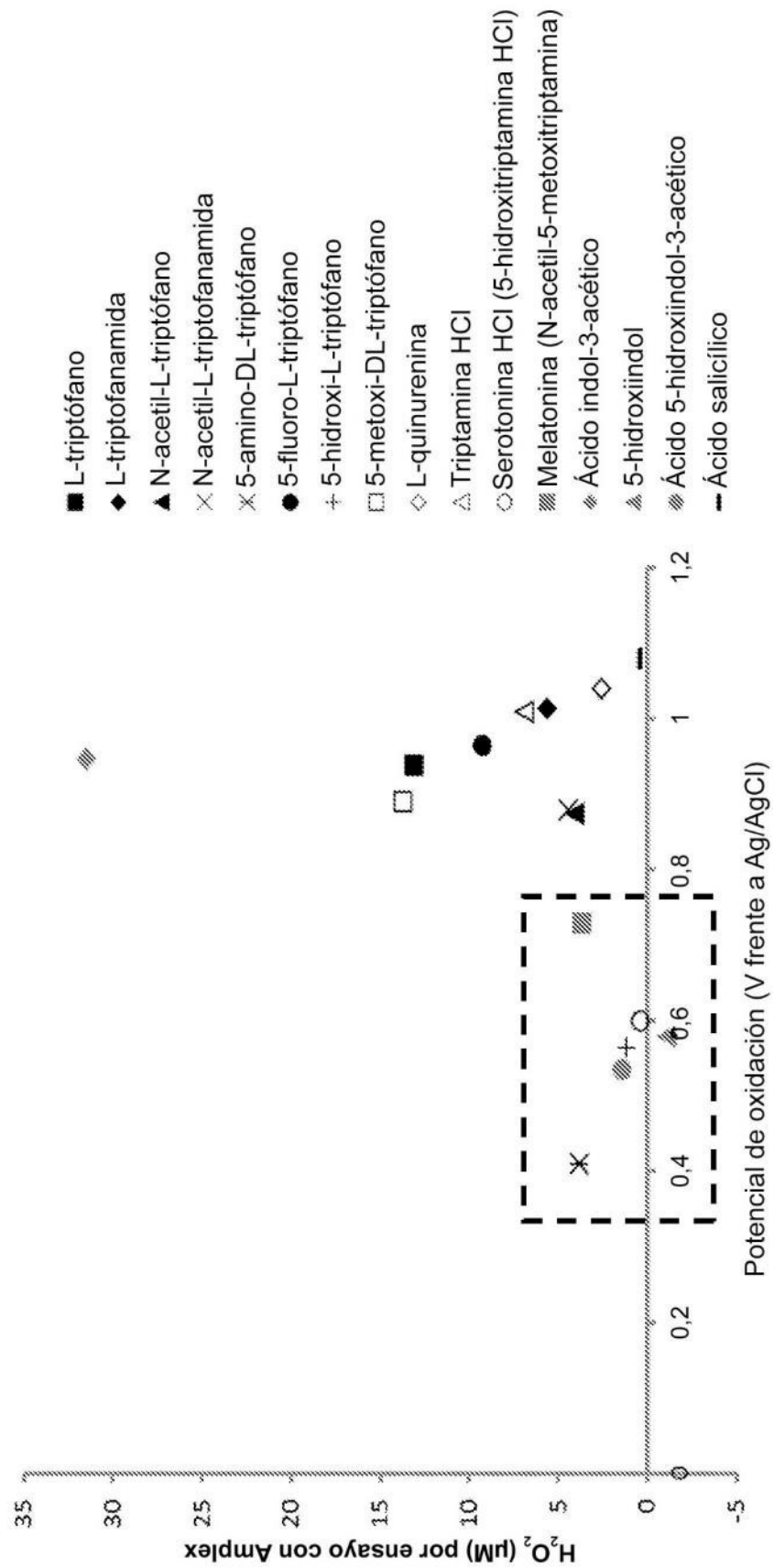


Figura 7

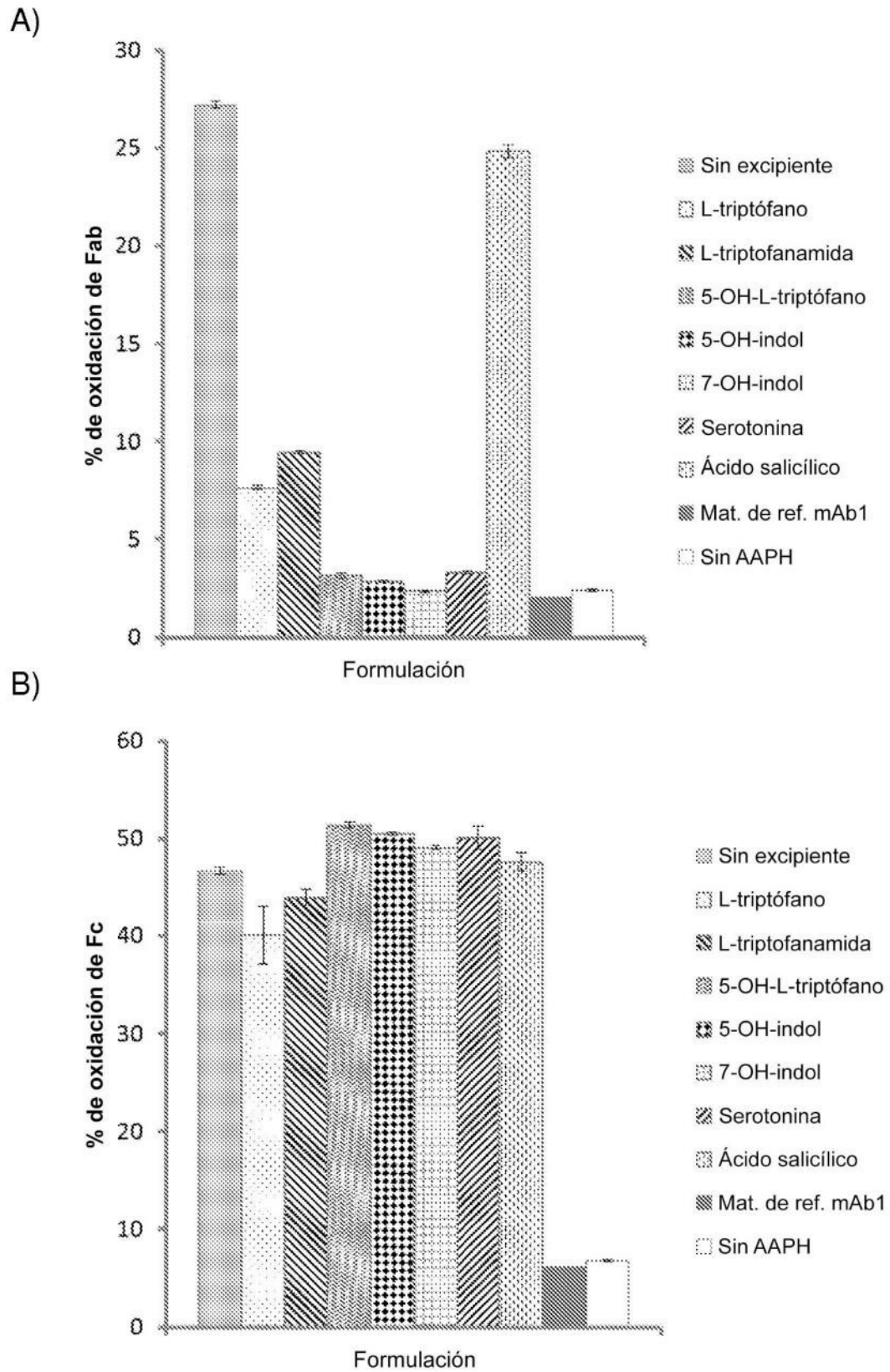


Figura 8

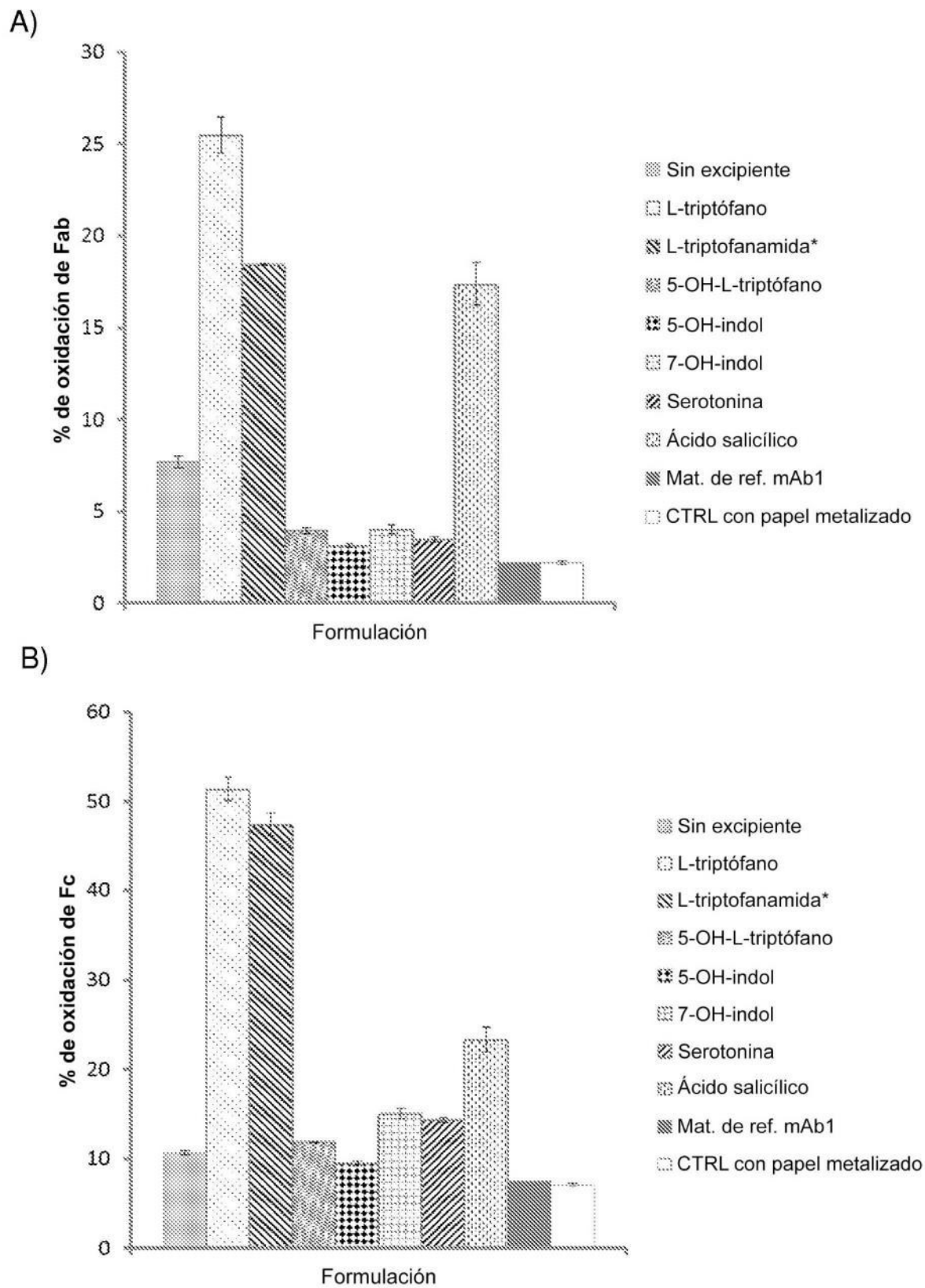
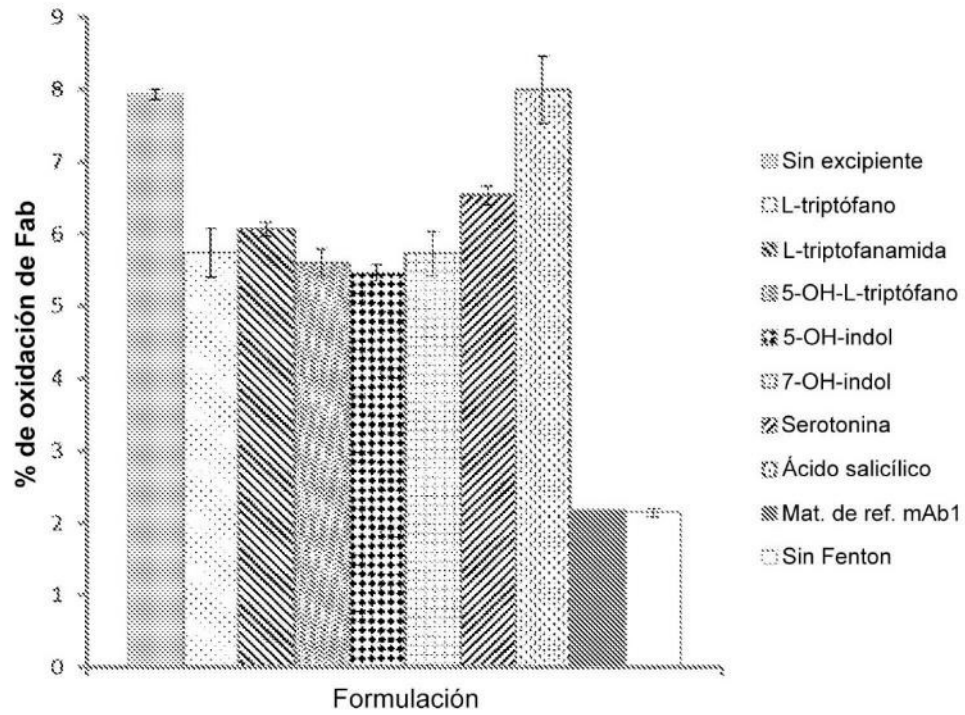


Figura 9

A)



B)

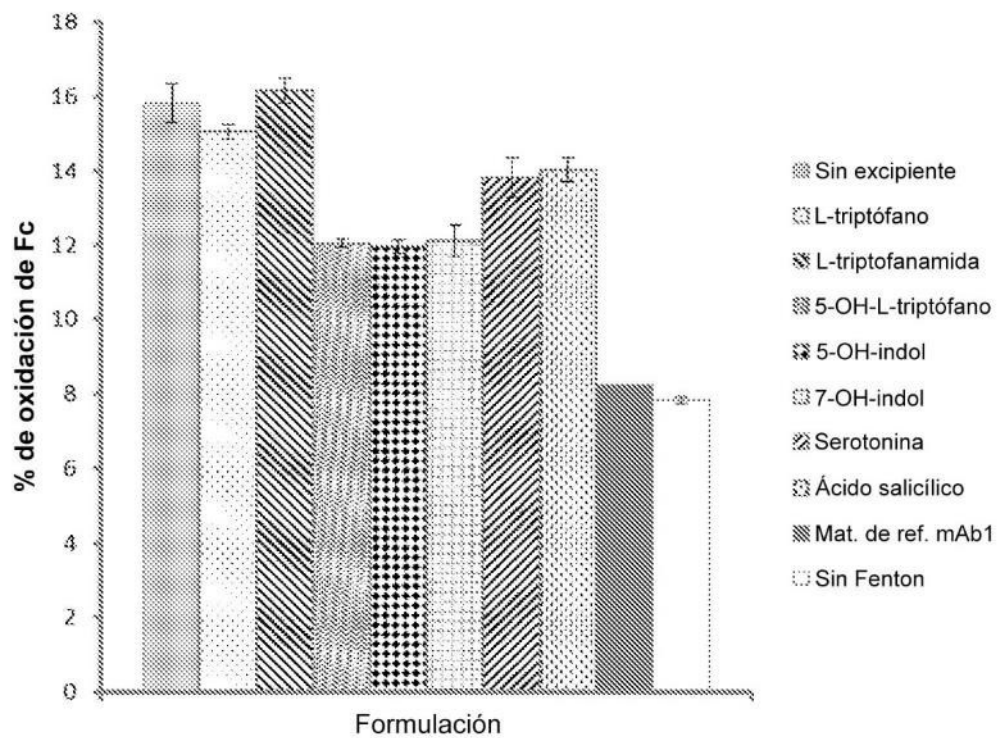
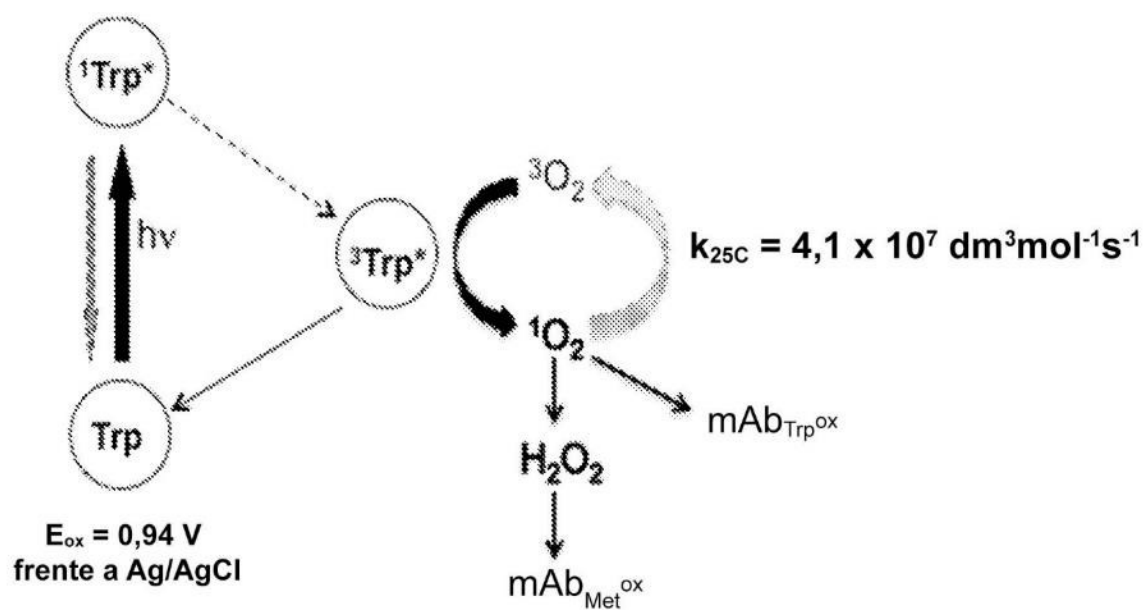


Figura 10

A)



B)

