

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-9315

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO "FORMULACIONES PARA ALMACENAR PROTEINAS"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL G01N 33/531

71. SOLICITANTE WYETH

DOMICILIO MADISON, ESTADO DE NEW JERSEY, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

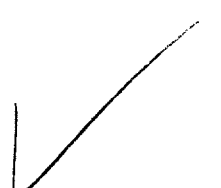
74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTÁ, D.C.

FN 13-03-2007

Publicación

31 ENE 2007



PETITORIO



SUPLENTE DE LA LEY DE INDUSTRIA Y COMERCIO
 Rad: 07-009315-00000-0000
 POC: 2004-01-31 10:53:20 Usp. 2004 NUEVE MESES
 INCL 11 PATENTE I+D
 LVS: 3/8 FASE NACIONAL
 POC: 2004-01-31 10:53:20 Usp. 2004 NUEVE MESES

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

①

SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención

☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I.

☐ Capítulo II.

②

SOLICITANTE (71)

Nombre: **WYETH**

Dirección: Five Giralda Farms, Madison,
Estado de New Jersey 07940,
Estados Unidos de América.

Nacionalidad o Domicilio: Madison, Estado
de New Jersey, Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución: Estado de Delaware,
Estados Unidos de América.

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

③

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83 Piso 5º,
Bogotá, Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES) (72)

Nombre: **LI, Li; KANTOR, Angela y MACMILLAN, Shannon, B.**

Dirección: 32 Pokonoket Avenue, Sudbury, MA 01776; 118 South Road, Pepperell,
MA 01463 y 63 Worcester Road, Hollis, NH 03049.

Nacionalidad o Domicilio: Estados Unidos de América.

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/028861

Fecha: 12/08/05

Publicación Internacional No. WO 2006/020935 A2

Fecha: 23/02/06

⑥

Título (54)

"FORMULACIONES PARA ALMACENAR PROTEÍNAS"

⑦

Clasificación Internacional (51) G01N 33/531

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

13/08/04

(31) Número de Solicitud

60/601,311

⑨

Comprobante de Pago No. 07-1.084

Fecha: 5 de Enero de 2007

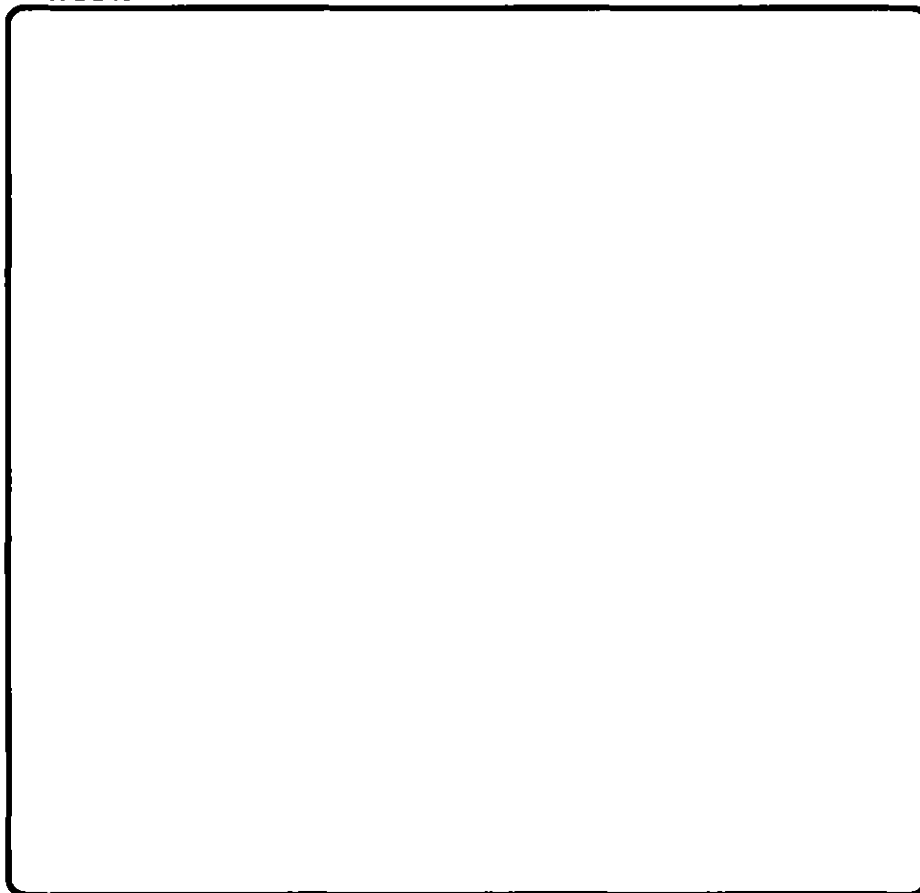
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☒ Documento que acredite la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☒ Documento de Representación Legal.
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- ☐ Declaraciones.
- ☐ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.
- ☐ De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción y opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional con su traducción

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente

NOMBRE ALICIA LOREDA RICAURTE

FIRMA

C.C. 39.899.713

T.P. 153.215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad: 07-009315-00000-0000
Pec: 2007-07-31 10:53:20 Usp. 2007 NUEVE CIENTOS
10. 11 PATENTE Y
Evo: 3/8 PATENTE NACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 140

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 000176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 1,084
FECHA : ENERO 5 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLORERA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	44293368	05/01/2007	6,892,200.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
	TOTAL :	\$ 482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-11-09-582
DE UN DOCUMENTO PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (sociedad), documento también escrito en inglés y en español.

Marilyn L. Mitchell
Notario Público, Estado de New Jersey
Mi Comisión Expira el 6 de febrero de 2005

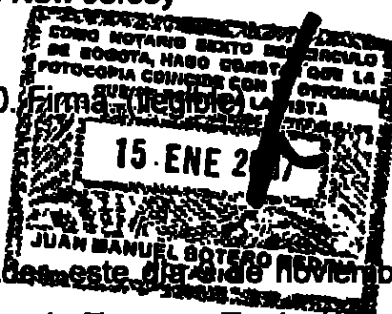
APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por Marilyn L. Mitchell
3. actuando como Notario Público de New Jersey
4. lleva el sello/estampilla de Marilyn L. Mitchell, Notario

CERTIFICADO

5. en Trenton, New Jersey
 6. el día 7 de octubre de 2004
 7. por John E McCormac, CPA, Tesorero de New Jersey
 8. No. A210247
 9. Sello/Estampilla
 10. Firma (región)
- Hay un sello dorado.



Traducido según mi mejor saber y entender, este día 7 de noviembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

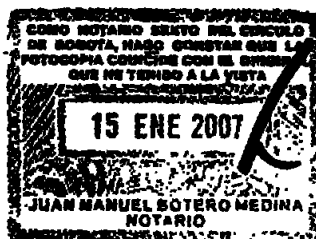
TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO
2004 NOV 10 P 10:40
JEF. DE LEGALIZACIONES
BOGOTÁ D.C.

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

283161
Anexo Escobal
Cuya firma aparece en el
documento de empena
las funciones indicadas



5

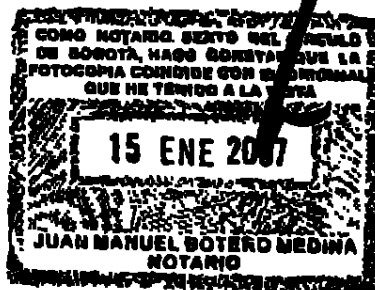
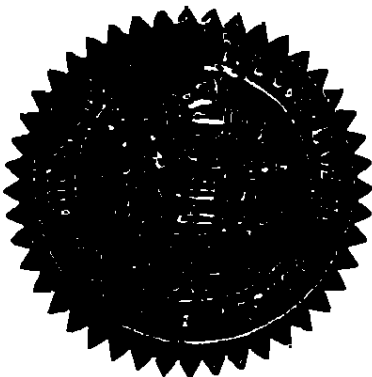
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
MARILYN L MITCHELL
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
MARILYN L MITCHELL, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 7TH DAY OF OCTOBER 2004
7. BY: John E McCormac, CPA, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A210247
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



Los abajo firmados, WYETH, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes del Estado de Delaware, Estados Unidos de América.

con domicilio en Five Giralda Farms, Madison,
Estado de New Jersey 07940,
Estados Unidos de América

nombramos por el presente a ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 8o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores ALICIA LLOREDA y/o GUSTAVO TAMAYO y/o IGNACIO SANTAMARIA y/o ENRIQUE ALVAREZ, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, WYETH, a corporation organized and existing under the laws of State of Delaware, United States of America.

domiciled at Five Giralda Farms, Madison,
State of New Jersey 07940,
United States of America

hereby appoint, ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, 8th Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on that all that said representatives and/or any one of them appointed may do in this behalf.

We also authorize doctors ALICIA LLOREDA and/or GUSTAVO TAMAYO and/or IGNACIO SANTAMARIA and/or ENRIQUE ALVAREZ, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

Given and signed this: 6th day of October 2004
Wyeth

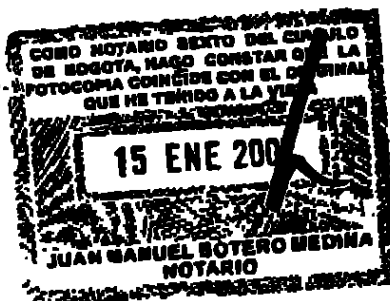

William H. Canen
Assistant Secretary

CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Estados Unidos de América
Estado de New Jersey {ss
Condado de Morris

Hoy 6 de Octubre de 2004 compareció
William H. Calnan, a quien conozco y
de quien me consta que firmó el anterior documento,
y quien debidamente juramentado declaró y dijo que
él es
de WYETH la compañía nombrada en el documento
que antecede, una sociedad debidamente organizada
y existente conforme a las leyes del Estado de
Delaware, Estados Unidos de América, domiciliada
en la ciudad de Madison, Condado de Morris,
Estado de New Jersey, Estados Unidos de América,
legalmente constituida para un período de duración
que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social;
conforme a las leyes del Estado de Delaware,
Estados Unidos de América; que el declarante está
autorizado por dicha Compañía para conferir este
poder; que el sello estampado por él al pie de tal
poder, en nombre y en representación de la
expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que
el objeto para el cual se confiere este instrumento
está comprendido dentro del de la sociedad.
El suscrito Notario ha visto los Estatutos de
Incorporación firmados en Madison, Estado de New
Jersey, con fecha 4 Febrero, 1926, y
certifica que de conformidad con la legislación de
dicho Estado la anterior declaración juramentada es
prueba suficiente de que los hechos sobre que ella
versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).



Retiro folio 7, 8 y 9
Extracto y folio

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

United States of America
State of New Jersey {ss
County of Morris

On this 6th day of October 2004, personally
came, William H. Calnan
to me known, and known to me to be the person who
signed the foregoing instrument, who being by me
duly sworn did depose and say that he is the
Assistant Secretary of WYETH the company named
within, a Corporation organized and existing under
the laws of State of Delaware, United States of
America, domiciled at the City of Madison, County of
Morris, State of New Jersey, United States of
America, legally constituted for a period of tenure not
yet expired, which exercises its corporate purposes
according to the laws of State of Delaware, United
States of America; that the deponent is authorized by
said Company to confer this power of attorney; that
the seal affixed hereunto by the deponent in the
name and on behalf of said Corporation is the
corporate seal thereof; and that the purpose for which
this instrument is granted is included within the
corporate purposes of the Company.
The undersigned Notary Public has seen the articles
of Incorporation of said Corporation executed at
Wilmington, Delaware U.S.A. under date of
February 4, 1926, and hereby certifies that under the
laws of said State the foregoing acknowledgment is
sufficient proof that the facts therein contained are
true, which he attests.

Marilyn L. Mitchell

MARILYN L. MITCHELL
NOTARY PUBLIC STATE OF NEW JERSEY
My Commission Expires February 8, 2005

7

TRATADO DE COOPERACIÓN DE PATENTES

PCT

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente 0036119.00164WO1	PARA FUTURAS ACCIONES ver Forma PCT/ISA/220 así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
Solicitud internacional No. PCT/US05/28861	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 12 de Agosto de 2005 (12.08.2005)	Fecha de Prioridad (Primera) (día/mes/año) 13 de Agosto de 2004 (13.08.2004)
Solicitante WYETH		

Este reporte de búsqueda internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 2 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. Bases del Reporte

a. Respecto al lenguaje, la búsqueda internacional fue llevada a cabo con base en:

☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó.

☐ una traducción de la solicitud internacional en _____, la cual es el lenguaje de una traducción proporcionada para los propósitos de búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b)).

b. ☐ Respecto a una secuencia de ácido nucleótico y/o amino revelado en la solicitud internacional, ver Casilla No. I.

2. ☐ Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse (Ver Casilla No. II).

3. ☐ Falta unidad de invención (ver Casilla No. III).

4. Respecto al título,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lee así:

5. Respecto al resumen,

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Regla 38.2(b), según aparece en la Casilla No. IV. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los dibujos,

a. La figura de los dibujos que se publicará con el resumen es la Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo seleccionó esta Autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención.

b. ☒ ninguna de las figuras es para ser publicada con el resumen.

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/US05/28861

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO

IPC: A61K 39/395(2006.01); C07K 16/00(2006.01)

USPC: 424/130.1; 424/138.1; 530/350

Según la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

U.S.: 424/130.1; 424/138.1; 530/350

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EAST, WEST, DIALOG, MEDLINE

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	US 6,267,958 B1 (ANDYA y col) 31 de Julio de 2001, (31.07.2001) documento completo	1-5, 7-21, 25-55
Y		6, 24
X	WO 98/56418 (LAM y col) 17 de Diciembre de 1998 (17.12.1998) ver documento completo	1-55
Y	US 5,869,053 (STERN y col) 9 de Febrero de 1999 (09.02.1999) ver documento completo	6, 24

☐ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☐ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'Z' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

29 de Septiembre de 2006 (29.09.2006)

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

1 DE DICIEMBRE DE 2006

Nombre y dirección de correo de la ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Comisionado para Patentes
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. (571) 273-3201

Funcionario autorizado

Yunsoo Kim

Teléfono No. 571-272-1600

wyeth 9.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 0036119.00164WO1	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/229 as well as, where applicable, Item 5 below.	
International application No. PCT/US05/28861	International filing date (day/month/year) 12 August 2005 (12.08.2005)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 13 August 2004 (13.08.2004)
Applicant WYETH		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 2 sheets.



It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the Report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:



the international application in the language in which it was filed.



a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b. ☐

With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I

2. ☐

Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3. ☐

Unity of invention is lacking (See Box No. III)

4. ☒

With regard to the title,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established by this Authority to read as follows:

5. ☒

With regard to the abstract,



the text is approved as submitted by the applicant.



the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. ☐

With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____



as suggested by the applicant.



as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.



as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b. ☒

none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US05/28861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC: A61K 39/395(2006.01);C07K 14/00(2006.01) USPC: 424/130.1;424/138.1;530/350 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 424/130.1; 424/138.1; 530/350 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, WEST, DIALOG, MEDLINE		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6,267,958 B1 (ANDYA et al) 31 July 2001, (31.07.2001) entire document	1-3, 7-21, 25-35
Y		6,24
X	WO 98/56418 (LAM et al) 17 December 1998 (17.12.1998) see entire document	1-55
Y	US 5,869,053 (STERN et al) 09 February 1999 (09.02.1999) see entire document	6,24
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"B" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"C" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is considered with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"D" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"A" document member of the same patent family	
"F" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 29 September 2006 (29.09.2006)	Date of mailing of the international search report 01 DEC 2006	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3291	Authorized officer Yunqiao Kiang Telephone No. 571-272-1600	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional



(43) Fecha de Publicación Internacional
23 de Febrero de 2006 (23.02.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/020935 A2

(51) Clasificación Internacional de Patentes:
G01N 33/531 (2006.01)

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/US2005/028861

(22) Fecha de Registro Internacional:
12 de Agosto de 2005 (12.08.2005)

(25) Idioma de registro: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
60/601,311 13 de Agosto de 2004 (13.08.2004) US

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): WYETH [US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para Estados Unidos de América solamente): LI, Li [CH/US]; 32 Pokonoket Avenue, Sudbury, MA 01776 (US). KANTOR, Angela [US/US]; 118 South Road, Pepperell, MA 01463 (US). MACMILLAN, Shannon, B [US/US]; 63 Worcester Road, Hollis, NH 03049 (US).

(74) Agentes: GELLER, Lisa, N. y col.; Wilmer Cutler Pickering Hale and Dorr LLP, 60 State Street, Boston, MA 02109 (US).

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

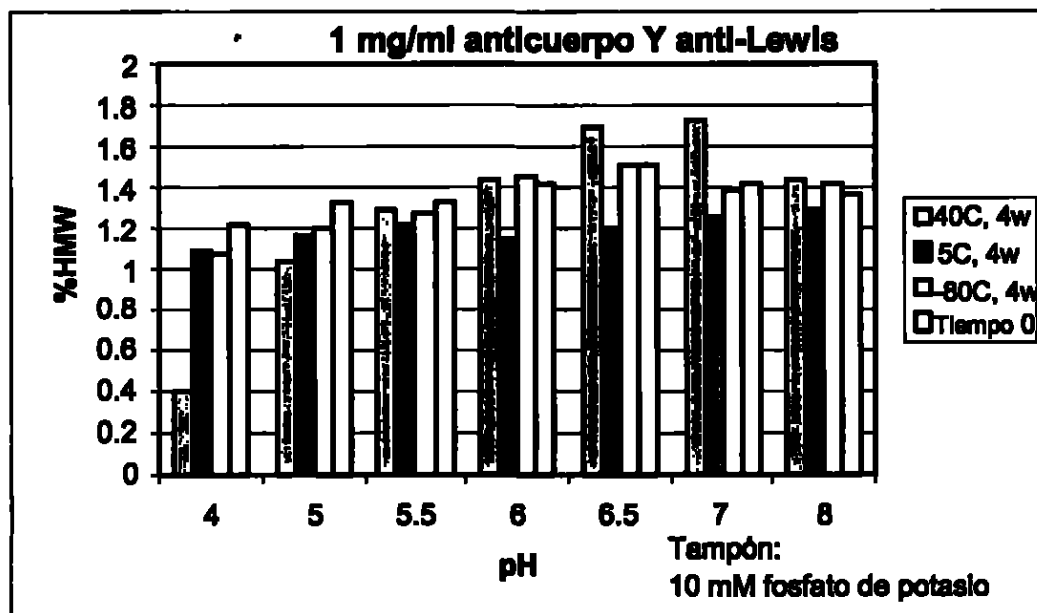
(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

— sin reporte de búsqueda internacional y para ser republicado bajo recibo de ese reporte

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase a "Las Notas Guía sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada edición regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: FORMULACIONES ESTABILIZADORAS



(57) Resumen: Se describen formulaciones que son adecuadas para el almacenamiento de proteínas, tal como anticuerpos, sobre un rango relativamente amplio de concentraciones de proteína, pH, y tipos de tampón. También se describen métodos de almacenamiento de una proteína y métodos para identificar una formulación adecuada para el almacenamiento de una proteína específica. En general, una formulación que contiene poco o nada de surfactante, desde nada a concentraciones relativamente bajas de sal, y que requiere una concentración de tampón relativamente baja.

11

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
23 February 2006 (23.02.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/020935 A2

(51) International Patent Classification:
G01N 33/531 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/028861

(22) International Filing Date: 12 August 2005 (12.08.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/601,311 13 August 2004 (13.08.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): WYETH
[US/US]; Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): LL, LI [CH/US]; 32
Pokonoket Avenue, Sudbury, MA 01776 (US). KANTOR,
Angela [US/US]; 118 South Road, Pepperell, MA 01463
(US). MACMILLAN, Shannon, B [US/US]; 63 Worcester
ter Road, Hollis, NH 03049 (US).

(74) Agents: GELLER, Lisa, N. et al.; Wilmer Cutler Picker-
ing Hale and Dorr LLP, 60 State Street, Boston, MA 02109
(US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of national protection available): AE, AG, AL, AM,
AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN,
CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

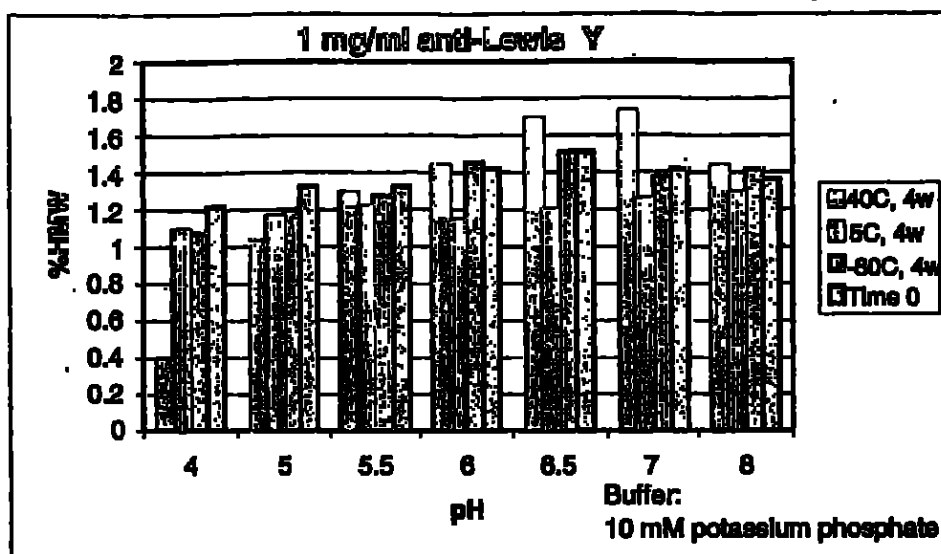
(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every
kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM,
ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),
European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,
FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,
RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA,
GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TO).

Published:

— without international search report and to be republished
upon receipt of that report

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: STABILIZING FORMULATIONS



(57) Abstract: Formulations are described that are suitable for storage of proteins, such as antibodies, over a relatively broad range of protein concentrations, pH, and buffer types. Also described are methods of storing a protein and methods of identifying a suitable formulation for storage of a specific protein. In general, a formulation contains low to no surfactant, no to relatively low salt concentrations, and requires a relatively low buffer concentration.

WO 2006/020935 A2

De la
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para:
LISA N. GELLER
WILMER CUTLER PICKERING
AND DORR LLP
60 STATE STREET
BOSTON, MA 02109

PCT

OPINIÓN ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

(PCT Regla 43bis.1)

Fecha de correo
(día/mes/año) 1 DE DICIEMBRE DE 2006

Registro de referencia del solicitante o agente 0036119.00164WO1		PARA FUTURAS ACCIONES Ver párrafo 2 a continuación	
Solicitud Internacional No. PCT/US05/28861	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 12 de Agosto de 2005 (12.08.2005)	Fecha de prioridad (día/mes/año) 13 de Agosto de 2004 (13.08.2004)	
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC IPC: A61K 39/395(2006.01); C07K 16/00(2006.01) USPC: 424/130.1; 424/145.1; 530/350			
Solicitante WYETH			
1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: ☒ Casilla No. I Bases de la opinión ☐ Casilla No. II Prioridad ☐ Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial ☐ Casilla No. IV Falta de unidad de invención ☒ Casilla No. V Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación ☐ Casilla No. VI Ciertos documentos citados ☐ Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional ☐ Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional 2. ACCIONES FUTURAS Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1bis(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional. Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde. Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220. 3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.			
Nombre y dirección de correo de la ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Comisionado para Patentes P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Fecha completa de esta opinión 29 de Septiembre de 2006 (29.09.2006)	Funcionario Autorizado Yunsoo Kim Teléfono No. 571-272-1600

Forma PCT/ISA/237 (Cartula) (Abril 2005)

**OPINIÓN ESCRITA DE LA
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL**

**Solicitud Internacional No.
PCT/US05/28861**

Casilla No. I. Bases de esta opinión

1. Respecto al idioma, esta opinión se ha establecida con base en:
☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó

☐ una traducción de la solicitud internacional en ,la cual es el idioma de una traducción proporcionada para los propósitos de búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b)).
2. Respecto a cualquier nucleótido y/o secuencia aminoácida revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:
 - a. tipo de material:

☐ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia
 - b. formato de material:

☐ en formato escrito
☐ en formato legible por computador
 - c. tiempo de presentación/suministro:

☐ contenido en la solicitud internacional según se registró.
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
☐ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..
3. ☐ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.
4. Comentarios adicionales:

AA

Casilla No. V Afirmación razonada bajo la Regla 43bis.1(a)(i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Declaración

Novedad (N)	Reivindicaciones	<u>NINGUNA</u>	SI
	Reivindicaciones	<u>1-55</u>	NO
Nivel Inventivo (IS)	Reivindicaciones	<u>NINGUNA</u>	SI
	Reivindicaciones	<u>1-55</u>	NO
Aplicabilidad Industrial (IA)	Reivindicaciones	<u>1-55</u>	SI
	Reivindicaciones	<u>NINGUNA</u>	NO

2. Citaciones y explicaciones

Favor Ver Hoja a Continuación

Casilla Suplementaria
En caso de que el espacio en alguna de las casillas precedentes no sea suficiente

V. 2. Citaciones y Explicaciones:

Las reivindicaciones 1-55 cumplen con los criterios establecidos en el Artículo 33(4) del PCT, y por lo tanto tienen aplicabilidad industrial porque la materia objeto reivindicada puede ser hecha o usada en la industria.

Las reivindicaciones 1-55 carecen de novedad de acuerdo con el Artículo 33(2) del PCT al ser anticipadas por el documento WO 96/56418.

La publicación '418 enseña una formulación acuosa de un anticuerpo que comprende acetato de sodio 10-25mM, a pH 6 a una concentración de 40mg/mL (reivindicaciones 1-22, p. p. 4-10, en particular).

La publicación '418 enseña adicionalmente que el anticuerpo es monoclonal, humanizado, recombinante, apropiado para propósitos terapéuticos y la formulación es estable a 2-8°C durante al menos 2 años (p. 6, en particular). Además, la publicación '418 enseña que el anticuerpo es específico para varios antígenos de sangre (p.ejm. Lewis Y) o receptores Erb (CD22).

La publicación '418 enseña que la formulación del anticuerpo comprende además NaCl y el método para estabilizar el anticuerpo (p.24-46, en particular). Por lo tanto, las enseñanzas de la referencia anticipan la invención reivindicada.

Las reivindicaciones 1-5, 7-21, 25-55 carecen de novedad de acuerdo con el Artículo 33(2) del PCT al ser anticipadas por la Patente de Estados Unidos No. 6,267, 958.

La patente '958 enseña una formulación acuosa de un anticuerpo que comprende acetato de sodio 10-25mM a pH 6 a una concentración de 30mg/mL (reivindicaciones 1-47, en particular).

La patente '958 enseña adicionalmente que el anticuerpo es monoclonal, humanizado, recombinante, apropiado para propósitos terapéuticos, y la formulación es estable a 2-8°C durante al menos 2 años (col. 6-13, en particular).

Adicionalmente, la patente '958 enseña que el anticuerpo es específico para varios antígenos de sangre (p.ejm. Lewis Y) o receptores Erb (CD22).

La patente '958 enseña que la formulación del anticuerpo comprende además NaCl y el método para estabilizar el anticuerpo (co. 14-24 en particular). Por lo tanto, las enseñanzas de la referencia anticipan la invención reivindicada.

Las reivindicaciones 6 y 24 carecen de nivel inventivo de acuerdo con el Artículo 33(3) del PCT al ser obvias a partir de la Patente de Estados Unidos 6,267,958 en vista de la Patente de Estados Unidos No. 5,869,053.

Casilla Suplementaria

En caso de que el espacio en alguna de las casillas precedentes no sea suficiente

Las enseñanzas de la patente '958 han sido discutidas, *supra*.

La patente '958 no enseña el anticuerpo 5T4.

La patente '053 enseña que el anticuerpo se une al 5T4.

Por lo tanto, habría sido obvio para la persona versada en la materia en el momento en que la invención fue realizada, estabilizar un anticuerpo a 5T4 como enseñó la patente '053 con una formulación que comprende un buffer que contiene ácido acético como enseñó la patente '958.

La persona versada en la materia en el momento en que la invención fue realizada, habría estado motivada a realizarla porque la patente '958 enseña que una formulación que comprende un buffer que contiene ácido acético estabiliza cualquier anticuerpo y previene la degradación de los anticuerpos (col 1-4, en particular).

De las enseñanzas de las referencias, la persona versada en la materia habría tenido una expectativa razonable de éxito en la producción de la invención reivindicada. Por lo tanto la invención como un todo fue *prima facie* obvia para la persona versada en la materia en el momento en que la invención fue realizada, como lo evidencian las referencias, especialmente en ausencia de evidencia de lo contrario.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:
LISA M. GELLER
WILMER CUTLER PICKERING HALE AND DORR LLP
60 STATE STREET
BOSTON, MA 02109

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

Applicant's or agent's file reference 0036119.00164WO1		Date of mailing (day/month/year) 01 DEC 2006
International application No. PCT/US05/28861		FOR FURTHER ACTION See paragraph 2 below
International filing date (day/month/year) 12 August 2005 (12.08.2005)	Priority date (day/month/year) 13 August 2004 (13.08.2004)	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC IPC: A61K 39/395(2006.01);C07K 16/00(2006.01) USPC: 424/130.1;424/145.1;530/350		
Applicant WYETH		

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(5) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/ US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201	Date of completion of this opinion 29 September 2006 (29.09.2006)	Authorized officer <i>[Signature]</i> Yuhang Han Telephone No. 571-272-1600
--	--	--

Form PCT/ISA/237 (cover sheet) (April 2005)

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US05/28861

Box No. I Basis of this opinion

1. With regard to the language, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequences disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
 - a. type of material
 - ☐ a sequence listing
 - ☐ table(s) related to the sequence listing
 - b. format of material
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - c. time of filing/furnishing
 - ☐ contained in the international application as filed.
 - ☐ filed together with the international application in electronic form.
 - ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.
3. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US05/28861

Box No. V Reasoned statement under Rule 43 bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement			
Novelty (N)	Claims	NONE	YES
	Claims	1-55	NO
Inventive step (IS)	Claims	NONE	YES
	Claims	1-55	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-55	YES
	Claims	NONE	NO

2. Citations and explanations:

Please See Continuation Sheet

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/US05/28861

Supplemental Box
In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

V. 2. **Claims and Explanations:**

Claims 1-55 meet the criteria set out in PCT Article 33(4), and thus meet industrial applicability because the subject matter claimed can be made or used in industry.

Claims 1-55 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by the WO 96/36418.

The '418 publication teaches an aqueous antibody formulation comprising 10-25mM sodium acetate at pH 6 at concentration of 40mg/ml (claims 1-22, p. 4-10, in particular).

The '418 publication further teaches that the antibody being monoclonal, humanized, recombinant antibody, suitable for therapeutic purpose and the formulation being stable at 2-8°C for at least 2 years (p. 6, in particular). In addition, the '418 publication teaches that the antibody is specific for number of blood antigens (e.g. Lewis Y) or Erb receptors (CD22).

The '418 publication teaches the antibody formulation further comprises NaCl and the method to stabilize antibody (p. 34-46, in particular). Thus, the reference teachings anticipate the claimed invention.

Claims 1-5, 7-21, 25-55 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by the US Pat. NO. 6,267,958.

The '958 patent teaches an aqueous antibody formulation comprising 10-25mM sodium acetate at pH 6 at concentration of 30mg/ml (claims 1-47, in particular).

The '958 patent further teaches that the antibody being monoclonal, humanized, recombinant antibody, suitable for therapeutic purpose and the formulation being stable at 2-8°C for at least 2 years (col. 6-13, in particular). In addition, the '958 patent teaches that the antibody is specific for number of blood antigens (e.g. Lewis Y) or Erb receptors (CD22).

The '958 patent teaches the antibody formulation further comprises NaCl and the method to stabilize antibody (col. 14-24 in particular). Thus, the reference teachings anticipate the claimed invention.

Claims 6 and 24 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over U.S. Pat 6,267,958 in view of U.S. Pat. No. 5,869,053.

Form PCT/ISA/237 (Supplemental Box) (April 2005)

21

24

22

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/US05/28861

Supplemental Box
In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

The teachings of the '938 patent have been discussed, *supra*.

The '958 patent does not teach the antibody being 5T4.

The '053 patent teaches antibody binds to the 5T4.

Therefore, it would have been obvious to one of the ordinary skill in the art at the time the invention was made to stabilize an antibody to 5T4 as taught by the '053 patent with a formulation comprising a buffer comprising acetic acid as taught by the '958 patent.

One of ordinary skill in the art at the time the invention was made would have been motivated to do so because the '958 patent teaches that a formulation comprising a buffer comprising acetic acid adds stability to any antibodies and prevents degradation of antibodies (col. 1-4, in particular).

From the teachings of the references, one of ordinary skill in the art would have had a reasonable expectation of success in producing the claimed invention. Therefore, the invention as a whole was *prima facie* obvious to one of the ordinary in the art at the time the invention was made, as evidenced by the references, especially in the absence of evidence to the contrary.

FORMULACIONES PARA ALMACENAR PROTEÍNAS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

Se describen formulaciones que son adecuadas para el almacenamiento de proteínas, tal como anticuerpos, sobre un rango relativamente amplio de concentraciones de proteína, pH, y tipos de tampón. También se describen métodos de almacenamiento de una proteína y métodos para identificar una formulación adecuada para el almacenamiento de una proteína específica. En general, una formulación que contiene poco o nada de surfactante, desde nada a concentraciones relativamente bajas de sal, y que requiere una concentración de tampón relativamente baja.

FORMULACIONES PARA ALMACENAR PROTEÍNAS

MEMORIA DESCRIPTIVA

La presente solicitud se refiere al campo de una formulación de proteínas, y más particularmente a una formulación de anticuerpos.

La presente solicitud reivindica prioridad respecto de la solicitud provisional U.S. Serial No. 60/601311, presentada en el 13 de Agosto de 2004, la cual se incorpora aquí como referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES

Generalmente, las proteínas, tal como los anticuerpos son producidos y almacenados para su posterior uso. Es importante que dichas proteínas sean almacenadas bajo condiciones que preserven la estabilidad de la proteína bajo varias condiciones incluyendo la temperatura y la concentración de proteína. Por lo cual, las formulaciones utilizadas para el almacenamiento de proteínas generalmente contiene una diversidad de sustancias estabilizadoras. Sin embargo dichas sustancias pueden afectar de manera adversa los usos downstream (de recuperación y purificación de biomoléculas) de la proteína almacenada, ya sea reduciendo la eficiencia de un

25.

proceso downstream o mediante la necesidad de retirar uno o más sustancias estabilizadoras antes de que la proteína pueda ser utilizada en un proceso downstream.

Existe una necesidad de tener formulaciones de proteínas, tales como anticuerpos, que sean estables a lo largo de una variedad de temperaturas y que no contengan sustancias que puedan interferir con los procesos downstream al utilizar las proteínas.

DESCRIPCION DE LA INVENCION

La invención se refiere al hallazgo de que ciertas formulaciones pueden ser utilizadas para almacenar polipéptidos tales como proteínas (por ejemplo, anticuerpos y fragmentos de lo mismo) para formar una preparación que es relativamente estable y simple. Tales formulaciones reducen la posibilidad de que los procesos downstream (procesos para recuperación y purificación de biomoléculas) o la actividad de la proteína sean adversamente afectados por un componente de una formulación y simplifique la preparación de las muestras de proteína para un almacenamiento de corto plazo o un almacenamiento de largo plazo.

Consecuentemente, la invención incluye una formulación que contiene una proteína aislada y una solución acuosa que tiene un valor de pH de 4,0-8,0, de tal modo que una formulación no contiene un crioprotector o surfactante, y la proteína es estable por al menos 3 semanas a una temperatura

26

desde -80° hasta 8°C. En algunos casos una formulación contiene una concentración de menos de 150mM de sal, por ejemplo, de 75mM de sal. La proteína puede ser un anticuerpo (un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal). Por ejemplo, la proteína puede ser un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo Y anti-Lewis o un anticuerpo anti-5T4. La proteína puede ser una proteína recombinante (por ejemplo, un anticuerpo monoclonal humanizado). En algunos casos, la proteína es una proteína terapéutica.

La solución acuosa de una formulación puede ser agua (por ejemplo, filtrada o estéril) o puede incluir un tampón tal como un tampón acetato, un tampón succinato, un tampón fosfato, o un tampón citrato. En general, la concentración del tapón es de alrededor de 0mM hasta alrededor de 150mM, por ejemplo, de alrededor de 50mM, de alrededor de 100mM, o de alrededor de 1mM hasta alrededor de 50mM.

El componente de proteína de una formulación es generalmente estable por al menos 1 año a 5°C, por ejemplo, la proteína es estable por al menos 3 años a 5°C. En algunas modalidades, la proteína está presente a una concentración desde alrededor de 1mg/ml hasta alrededor de 200 mg/ml, desde alrededor de 1mg/ml hasta alrededor de 100 mg/ml, desde alrededor de 20mg/ml hasta alrededor de 200 mg/ml, desde alrededor de 20mg/ml hasta alrededor de 100 mg/ml, desde alrededor de 10mg/ml hasta alrededor de 30 mg/ml, desde 25mg/ml hasta alrededor de 30 mg/ml, desde alrededor de 10mg/ml hasta

27.

alrededor de 50 mg/ml, o desde alrededor de 20mg/ml hasta alrededor de 50 mg/ml. La proteína puede tener un pI de al menos 6,0, por ejemplo, al menos 7,0, o al menos 8,0. La proteína puede ser purificada, por ejemplo, hasta al menos un 90% o al menos un 95%.

En algunos casos, una formulación es almacenada desde alrededor de 0°C hasta alrededor de 8°C o desde alrededor de 0°C hasta alrededor de 5°C. El pH de una formulación puede ser desde alrededor de 5,0 hasta alrededor de 6,0, y en algunos casos, el pH de una formulación es de alrededor de 5,0 hasta alrededor de 6,0 y una formulación es almacenada a una temperatura desde alrededor de 80°C hasta alrededor de 5°C. Generalmente, una formulación es estéril.

En un ejemplo de la invención, la proteína de una formulación puede también ser, por ejemplo, un anticuerpo anti-CD22 humanizado y una solución acuosa de succinato de alrededor de 20mM, pH 6,0. En otro ejemplo de la invención, la proteína es un anticuerpo Y anti-Lewis y la solución acuosa es de alrededor de 10mM de citrato de sodio, pH 5,5 y de alrededor de 75mM de NaCl. En un tercer ejemplo de la invención, la proteína es un anticuerpo anti-5T4 y la solución acuosa es de alrededor de 10mM de acetato de sodio, y de pH d alrededor de 5,5.

La estabilidad de una formulación puede ser determinada, por ejemplo, evaluando al menos uno de, el porcentaje de las especies de alto peso molecular, el porcentaje de las especies de bajo peso molecular, o el

28.

porcentaje de especies ácidas, por ejemplo, comparado con un control.

En otro aspecto, la invención se refiere a un método para almacenar una proteína. El método incluye proveer una formulación como se describe *supra*, colocando la formulación a una temperatura seleccionada, y mantener la formulación a la temperatura (por ejemplo, congelada), de tal modo que la proteína en la formulación es estable por al menos una semana, por ejemplo, por al menos un mes, tres meses, un año, cinco años, siete años, o diez años. En algunos casos, la proteína es almacenada y es estable a una temperatura de alrededor de 2°C hasta 8°C. En ciertas modalidades, la proteína es almacenada a una temperatura de alrededor de -80°C y la proteína es estable por al menos cinco años, siete años, o diez años. Cuando la proteína es congelada, el método puede incluir una etapa en la cual la proteína es rápidamente descongelada. Cuando la proteína va a ser congelada, por ejemplo, para almacenamiento, la proteína puede ser congelada utilizando congelamiento rápido. En algunos casos, se utiliza congelamiento lento. La proteína puede ser un anticuerpo (un anticuerpo monoclonal o un anticuerpo policlonal). En un ejemplo, la proteína es un anticuerpo anti-CD22 humanizado, un anticuerpo Y anti-Lewis, o un anticuerpo anti-5T4. En ciertas modalidades, el anticuerpo es una sustancia intermediaria. En general, la proteína está presente en una concentración de al menos 1 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/ml, al menos 20 mg/ml, o al menos 30

31

mg/ml. Frente a la recuperación desde el almacenamiento, la proteína puede tener, por ejemplo, al menos el 70% de la actividad de una referencia. En algunos casos, frente a la recuperación desde el almacenamiento, la formulación contiene menos que o lo mismo que un 5% de productos de alto peso molecular respecto de un control o frente a la recuperación desde el almacenamiento, la formulación contiene menos que o lo mismo que un 10% de productos de alto peso molecular y agregados, por ejemplo, respecto de un control. En algunas modalidades, la formulación contiene menos que o lo mismo que un 10% de productos de alto peso molecular, por ejemplo, menos que o lo mismo que un 5% de productos de alto peso molecular. En otro aspecto, la invención se refiere a un método para determinar una formulación favorable para almacenar una proteína aislada seleccionada. El método incluye proveer una proteína aislada seleccionada, almacenar la proteína aislada seleccionada en una serie de formulaciones que comprenden una solución acuosa con un valor de pH entre 4,0 y pH 8,0 y que comprende entre alrededor de 0mM hasta alrededor de 150mM de tampón, determinar al menos un parámetro de estabilidad, e identificar una formulación en la cual la proteína es estable, de tal modo que una formulación en la cual la proteína es estable es una formulación favorable para almacenar la proteína aislada seleccionada. En algunas modalidades del método, una disminución en la estabilidad es indicada por al menos uno de un incremento en la cantidad de proteína de alto peso molecular

en la muestra, por ejemplo, respect de un control, un incremento en la cantidad de especies de bajo peso molecular en la muestra, por ejemplo, respecto de un control, o un incremento en el porcentaje de especies ácidas respecto de un control. En algunos casos, una condición es seleccionada en la cual no más que un 0,5%, 0,2%, o 0,1% de la proteína es una especie de alto peso molecular. El parámetro de estabilidad puede ser ensayado para su actividad por enzimo inmuno ensayo (ELISA) y en una formulación estable, la actividad es al menos un 50% de un control o es al menos un 80% de un control. En un ejemplo del método, el parámetro de estabilidad es la presencia de la especie de alto peso molecular y una formulación estable contiene no más que un 5% de una especie de alto peso molecular. En otro ejemplo, el parámetro de estabilidad es la presencia de la especie de alto peso molecular y agregados de proteína, y una formulación estable incluye no más que un 10% de una especie de alto peso molecular y agregados de proteína o no más que un 15% de una especie de alto peso molecular y agregados de proteína combinados. En algunos casos, el porcentaje de especies de alto peso molecular es comparado con la cantidad presente un una muestra control (por ejemplo, una muestra antes del almacenamiento. Incluso en otra modalidad del método, el parámetro de estabilidad es la proporción de proteínas ácidas y básicas, y la proporción en una formulación estable es no más que un 15% diferente de un control.

La invención también se refiere a un polipéptido (una proteína o un péptido) producido por un método que incluye almacenamiento del polipéptido en una formulación que incluye una solución acuosa que tiene un pH de 4,0 hasta un pH 8,0, de tal modo que la formulación no contiene un crioprotector de surfactante, y la proteína es estable por al menos tres semanas a -80°C hasta 8°C. En algunas modalidades, el polipéptido es un anticuerpo o un fragmento del mismo (por ejemplo, un anti-CD22, y un Y anti-Lewis, o un anti-5T4). El anticuerpo o fragmento del mismo puede estar conjugado a una molécula o puede ser usado para conjugación a una molécula, por ejemplo, conjugación a una toxina tal como ricino o caliqueamicina.

En algunas modalidades, la invención se refiere a un polipéptido (una proteína o un péptido) para ser usado en la elaboración de una proteína modificada, de tal modo que el polipéptido es almacenado en una formulación que incluye una solución acuosa que tiene un pH de 4,0 hasta un pH 8,0, la formulación no contiene un crioprotector de surfactante, y la proteína es estable por al menos tres semanas a -80°C hasta 8°C. En algunos casos, el polipéptido es un anticuerpo, por ejemplo, un anti-CD22, un Y anti-Lewis, o un anti-5T4. El polipéptido puede ser usado para preparar una proteína conjugada, por ejemplo, para conjugación a una toxina tal como ricina o caliqueamicina. Tales proteínas conjugadas pueden también ser almacenadas en una formulación descrita aquí.

A menos que se define de otra forma, todos los terminos científicos y técnicos aquí utilizados tienen el mismo significado como generalmente se entiende por un experto en el arte al cual esta invención pertenece. A pesar de que métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos aquí pueden ser utilizados en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen métodos y materiales adecuados más adelante. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes, y otras referencias mencionadas aquí son incorporadas a modo de referencia en su totalidad. Además, los materiales, métodos, y ejemplos son solamente ilustrativos y no se pretende que sean limitantes.

Otras características y ventajas de la invención serán aparentes a partir de la descripción detallada, figuras, y de las reivindicaciones.

BREVE DESCRIPCION DE LAS FIGURAS

Fig. 1A es un gráfico de barras que ilustra los resultados del análisis de cromatografía por exclusión de tamaño-cromatografía líquida de alta resolución (SEC-HPLC) de 1mg/ml de anti-Lewis Y a varios valores de pH y a varias temperaturas. Los resultados se expresan como porcentaje de especies de alto peso molecular (HMW).

Fig. 1B es un gráfico de barras que ilustra los resultados del análisis SEC-HPLC de 1mg/ml de anti-Lewis Y a varios valores de pH y a varias temperaturas. Los resultados se

expresan como porcentaje de especies de bajo peso molecular (LMW).

Fig. 2 es un gráfico de barras que ilustra los resultados del análisis CEX-HPLC de 1mg/ml de anti-Lewis Y a varios valores de pH y a varias temperaturas. Los resultados se expresan como porcentaje de especies ácidas.

Fig. 3 es una representación de un SDS-PAGE de muestras de anti-Lewis Y almacenadas a 40°C por cuatro semanas a varios valores de pH. La imagen de la izquierda es de un gel corrido bajo condiciones no reductoras y la imagen de la derecha es de un gel corrido bajo condiciones reductoras.

Fig. 4 es una representación de un gel de enfoque isoeléctrico (IEF) de muestras como se ha descrito para la Fig. 3.

Fig. 5 es un gráfico de barras que ilustra los resultados del análisis SEC-HPLC de 0,5mg/ml de anti-CD22 incubado por dos semanas a varios valores de pH y a varias temperaturas. Los resultados se expresan como porcentaje de especies HMW.

Fig. 6 es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de 25mg/ml de anti-CD22 incubado por dos semanas a varios valores de pH, y a varias temperaturas, en la presencia o ausencia de NaCl 75mM. Los resultados se expresan como porcentaje de especies HMW.

Fig. 7A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de 1mg/ml de anti-Lewis Y,

incubado por cuatro semanas a varios valores de pH a 40°C, en varios tampones, y en la presencia o ausencia de NaCl 75mM. Los resultados se expresan como porcentaje de especies HMW.

Fig. 7B es un gráfico de barras que ilustra los resultados del análisis SEC-HPLC de 1mg/ml de anti-Lewis Y, incubado por cuatro semanas a varios valores de pH a 40°C, en varios tampones, y en la presencia o ausencia de NaCl 75mM. Los resultados se expresan como porcentaje de especies LMW.

Fig. 8 es un gráfico de barras que ilustra los resultados del análisis CEX-HPLC de 1 mg/ml de anti-Lewis Y, incubado por cuatro semanas a varios valores de pH a 40°C en varios tampones, y en la presencia o ausencia de NaCl 75mM. Los resultados se expresan como porcentaje de especies ácidas.

Fig. 9A es un gráfico de barras que ilustra los resultados del análisis CEX-HPLC de 30mg/ml de anti-Lewis Y incubado por cuatro semanas en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 a varias temperaturas y a varias concentraciones de NaCl. Los resultados se expresan como porcentaje de especies ácidas.

Fig. 9B es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de las muestras descritas para 9A. Los resultados se expresan como porcentaje de especies HMW.

Fig. 9C es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de las muestras descritas para 9A. Los resultados se expresan como porcentaje de especies LMW.

Fig. 10 es un gráfico de barras que ilustra los resultados de SEC-HPLC de anti-Lewis Y a 1mg/ml o 30mg/ml en varias concentraciones de sal y sometidas a agitación. Los resultados se expresan como porcentaje de recuperación de monómero.

Fig. 11A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de SEC-HPLC de anti-Lewis Y a 1mg/ml en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 en la presencia o ausencia de NaCl 150mM luego de diez ciclos de congelamiento-descongelamiento como se indica en la Fig. 11B. Los resultados se expresan como porcentaje de recuperación de monómero.

Fig. 11B es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de anti-Lewis Y a 30mg/ml en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 en la presencia o ausencia de NaCl 150mM luego de diez ciclos de congelamiento-descongelamiento como se indica. Los resultados se expresan como porcentaje de recuperación de monómero.

Fig. 12 es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de 25mg/ml de anti-CD22 en succinato 50mM, pH 6,0, incubado por un mes a varias temperaturas en la presencia o ausencia de NaCl 75mM.

Fig. 13 es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de 15mg/ml de anti-CD22 en succinato 20mM, pH 6,0, succinato más NaCl 75mM, succinato más polisorbato 80 0,01%, o succinato más NaCl 75mM y polisorbato 80 (Tween). Las muestras fueron agitadas por 24 horas antes del

análisis. Un control no agitado de proteína en tampón succinato se incluye. Los resultados se expresan como porcentaje de especies HMW.

Fig. 14A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de anti-Lewis Y a 1mg/ml o 30mg/ml en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 incubado en la presencia o ausencia de NaCl 75mM por cuatro semanas a 40°C. Los resultados se expresan como un cambio en el porcentaje de especies HMW.

Fig. 14B es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de anti-Lewis Y a 1mg/ml o 30mg/ml en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 incubado en la presencia o ausencia de NaCl 75mM por cuatro semanas a 40°C. Los resultados se expresan como un cambio en el porcentaje de especies LMW.

Fig. 14C es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis CEX-HPLC de anti-Lewis Y a 1mg/ml o 30mg/ml en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 incubado en la presencia o ausencia de NaCl 75mM por cuatro semanas a 40°C. Los resultados se expresan como un cambio en el porcentaje especies ácidas.

Fig. 15A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de anti-Lewis Y a 30mg/ml en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 y NaCl 75mM incubado a varias temperaturas por varios tiempos. Los resultados se expresan como porcentaje de especies HMW.

Fig. 15B es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de anti-Lewis Y a 30mg/ml en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 y NaCl 75mM incubado a varias temperaturas por varios tiempos. Los resultados se expresan como porcentaje de especies LMW.

Fig. 15C es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis CEX-HPLC de anti-Lewis Y a 30mg/ml en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 y NaCl 75mM incubado a varias temperaturas por varios tiempos. Los resultados se expresan como porcentaje de especies ácidas.

Fig. 16A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de anti-CD22 a 1mg/ml en succinato 20mM, pH 6,0 y tratado bajo varios regímenes de congelamiento-descongelamiento por varios ciclos. FF es congelamiento rápido, FT es descongelamiento rápido, SF es congelamiento lento, y ST es descongelamiento lento. Los resultados se expresan como porcentaje de especies HMW.

Fig. 16B es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de anti-CD22 a 25mg/ml en succinato 20mM, pH 6,0 y tratado bajo varios regímenes de congelamiento-descongelamiento por varios ciclos. FF es congelamiento rápido, FT es descongelamiento rápido, SF es congelamiento lento, y ST es descongelamiento lento. Los resultados se expresan como porcentaje de especies HMW.

Fig. 16C es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de anti-CD22 a 1mg/ml en

succinato 20mM, pH 6,0 que contiene polisorbato 80 y tratado bajo varios regímenes de congelamiento-descongelamiento por varios ciclos. FF es congelamiento rápido, FT es descongelamiento rápido, SF es congelamiento lento, y ST es descongelamiento lento. Los resultados se expresan como porcentaje de especies HMW.

Fig. 16D es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de anti-CD22 a 25mg/ml en succinato 20mM, pH 6,0 que contiene polisorbato 80 y tratado bajo varios regímenes de congelamiento-descongelamiento por varios ciclos. FF es congelamiento rápido, FT es descongelamiento rápido, SF es congelamiento lento, y ST es descongelamiento lento. Los resultados se expresan como porcentaje de especies HMW.

Fig. 17A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de estudios de agitación, analizados utilizando SEC-HPLC, en los cuales 1mg/ml o 30mg/ml de anti-Lewis Y en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 en la presencia o ausencia de polisorbato 80 fueron agitados a 360 rpm por 24 horas a temperatura ambiente. Los resultados se expresan como porcentaje de recuperación de monómero.

Fig. 17B es un gráfico de barras que ilustra los resultados de estudios de agitación, analizados utilizando SEC-HPLC, en los cuales 30mg/ml de anti-Lewis Y en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 en varias concentraciones de polisorbato 80 fueron agitados a 360 rpm por 24 horas a temperatura ambiente. Los

resultados se expresan como porcentaje de recuperación de monómero.

Fig. 18A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de anti-Lewis Y a 1mg/ml en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 en la presencia o ausencia de polisorbato 80 al 0,01% luego de diez ciclos de congelamiento-descongelamiento como se indica en la Fig. 18B. Los resultados se expresan como porcentaje de recuperación de monómero.

Fig. 18B es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de anti-Lewis Y a 30mg/ml en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 en la presencia o ausencia de polisorbato 80 al 0,01% luego de diez ciclos de congelamiento-descongelamiento como se indica. Los resultados se expresan como porcentaje de recuperación de monómero.

Fig. 19A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de 30mg/ml de anti-Lewis Y en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 y NaCl 75mM en la presencia o ausencia de polisorbato 80 después de incubación a varias temperaturas y por varios tiempos. Los resultados se expresan como porcentaje de especies HMW.

Fig. 19B es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de 30mg/ml de anti-Lewis Y en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 y NaCl 75mM en la presencia o ausencia de polisorbato 80 después de incubación a varias temperaturas y por varios tiempos. Los resultados se expresan como porcentaje de especies LMW.

Fig. 19C es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis CEX-HPLC de 30mg/ml de anti-Lewis Y en citrato de sodio 10mM, NaCl 75mM, pH 5,5 en la presencia o ausencia de polisorbato 80 después de incubación a varias temperaturas y por varios tiempos. Los resultados se expresan como porcentaje de especies ácidas.

Fig. 20A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de estabilidad en el almacenamiento de anti-CD22 por seis meses. Las soluciones contienen succinato 20mM, pH 6,0 (S); succinato 20mM, metionina 10mM, pH 6,0 (SM); succinato 20mM, polisorbato 80 al 0,01%, pH 6,0 (ST); o succinato 20mM, metionina 10mM, polisorbato 80 al 0,01%, pH 6,0 (SMT). Los resultados se expresan como porcentaje de especies HMW.

Fig. 20B es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de estabilidad en el almacenamiento de anti-CD22 por seis meses. Las soluciones contienen succinato 20mM, pH 6,0 (S); succinato 20mM, metionina 10mM, pH 6,0 (SM); succinato 20mM, polisorbato 80 al 0,01%, pH 6,0 (ST); o succinato 20mM, metionina 10mM, polisorbato 80 al 0,01%, pH 6,0 (SMT). Los resultados se expresan como porcentaje de área total del pico.

Fig. 20C es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis CEX-HPLC de estabilidad en el almacenamiento de anti-CD22. Las condiciones se describen en

las Fig. 20A y 20B. Los resultados se expresan como porcentaje de especies completamente activas (% pico 5).

Fig. 21 es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC de los productos de alto peso molecular (HMW) de anti-5T4 almacenado a varios valores de pH y temperaturas por dos semanas. Los resultados se expresan como porcentaje promedio de productos de alto peso molecular.

Fig. 22 es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un análisis SEC-HPLC del porcentaje de productos de alto peso molecular (HMW) o productos de bajo peso molecular (LMW) en muestras anti-5T4 inicialmente o después de cuatro semanas a 40°C en tampón acetato (Ace), tampón citrato (Cit), tampón fosfato (Phos), o tampón succinato (Suc), con o sin sal (NaCl), a varios valores de pH.

Fig. 23A es un termograma que refleja los resultados del barrido de calorimetría diferencial (DSC) de anti-5T4 en tampón citrato (pH 5,5).

Fig. 23B es un termograma que refleja los resultados del barrido de calorimetría diferencial (DSC) de anti-5T4 en tampón succinato (pH 6,0).

Fig. 24A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de DSC de anti-5T4 en varias formulaciones, sin NaCl, y a varios valores de pH.

Fig. 24B es un gráfico de barras que ilustra los resultados de DSC de anti-5T4 en varias formulaciones que contienen NaCl 150mM a varios valores de pH.

Fig. 25 es un gráfico de barras que ilustra los resultados de CEX-HPLC de anti-5T4 en formulaciones que contienen varios tampones, con o sin NaCl 150mM, a varios valores de pH después de cuatro semanas a 40°C.

Fig. 26A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de SEC-HPLC de anti-5T4 (2 mg/ml) en varios tampones a varios valores de pH después de seis semanas a -80°C o 40°C.

Fig. 26B es un gráfico de barras que ilustra los resultados de SEC-HPLC de anti-5T4 (30 mg/ml) en tampón citrato o succinato a pH 6 después de seis semanas a -80°C o 40°C.

Fig. 27A es un gráfico de barras que ilustra los resultados de CEX-HPLC de anti-5T4 (2 mg/ml) en varias formulaciones de tampón a varios valores de pH después de seis semanas a 40°C.

Fig. 27B es un gráfico de barras que ilustra los resultados de CEX-HPLC de anti-5T4 (30 mg/ml) en tampón citrato o succinato a pH 6 después de seis semanas a 40°C.

Fig. 28 es una reproducción de un conjunto de varios electroferogramas cubiertos que representan los resultados de la electroforesis de capilar en geles de SDS de anti-5T4 en varias formulaciones de tampón a varios valores de pH después de seis semanas a 40°C.

Fig. 29A es un gráfico de barras que ilustra la A_{400} de anti-5T4 a 1mg/ml en formulaciones que contienen varios tampones (pH 5,5) y con o sin polisorbato 80 (P80), y con o sin sacarosa bajo diferentes regímenes de congelamiento-

descongelamiento. FF es congelamiento rápido, SF es congelamiento lento, FT es descongelamiento rápido, y ST es descongelamiento lento.

Fig. 29B es un gráfico de barras que ilustra el porcentaje de especies de alto peso molecular (HMW) de anti-5T4 a 1mg/ml en formulaciones que contienen varios tampones (pH 5,5) y con o sin polisorbato 80 (P80), y con o sin sacarosa bajo diferentes regímenes de congelamiento-descongelamiento. FF es congelamiento rápido, SF es congelamiento lento, FT es descongelamiento rápido, y ST es descongelamiento lento.

Fig. 30A es un gráfico de barras que ilustra la A_{400} de anti-5T4 a 25mg/ml en formulaciones que contienen varios tampones (pH 5,5) y con o sin polisorbato 80 (P80), y con o sin sacarosa bajo diferentes regímenes de congelamiento-descongelamiento. FF es congelamiento rápido, SF es congelamiento lento, FT es descongelamiento rápido, y ST es descongelamiento lento.

Fig. 30B es un gráfico de barras que ilustra el porcentaje de especies de alto peso molecular (HMW) de anti-5T4 a 25mg/ml en formulaciones que contienen varios tampones (pH 5,5) y con o sin polisorbato 80 (P80), y con o sin sacarosa bajo diferentes regímenes de congelamiento-descongelamiento. FF es congelamiento rápido, SF es congelamiento lento, FT es descongelamiento rápido, y ST es descongelamiento lento.

Fig. 31A es un gráfico de barras que ilustra la A_{400} de anti-5T4 a 1 mg/ ml o 25mg/ml en varias formulaciones con o

sin polisorbato 80 (P80) y con o sin sacarosa. Las muestras fueron agitadas o no agitadas. "*" Indica que la turbidez excede el límite superior del instrumento.

Fig. 31B es un gráfico de barras que ilustra el porcentaje de especies de alto peso molecular (HMW) de anti-5T4 a 1 mg/ ml o 25mg/ml en varias formulaciones con o sin polisorbato80 (P80) y con o sin sacarosa. Las muestras fueron agitadas o no agitadas.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Se provee una formulación relativamente simple para almacenamiento de una proteína tal como un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo monoclonal-que contiene droga, o una sustancia intermediaria en la producción de un producto de proteína tal como un anticuerpo-que contiene droga. La formulación generalmente contiene poco o nada de surfactante, nada a concentraciones relativamente bajas de sal, y requiere una concentración de tampón relativamente baja. La formulación es efectiva para el almacenamiento estable de ciertas proteínas, tal como anticuerpos, sobre un rango relativamente amplio de concentraciones de proteína, pH, y tipos de tampón. Tales formulaciones proveen gran flexibilidad para el procesamiento adicional, por ejemplo, haciendo la proteína fácilmente ajustable a un pH deseado, adición de excipiente, modificación química, o liofilización. Las formulaciones también pueden ser utilizadas para almacenamiento de péptidos y

de proteínas procesadas, por ejemplo, proteínas tal como anticuerpos que están conjugados a otros residuos péptido o no-péptido.

Ejemplos específicos no limitantes también se proveen ilustrando métodos para identificar una formulación favorable para el almacenamiento de tres anticuerpos diferentes, un anti-CD22, un anti-Lewis Y, y un anti-5T4, los cuales pueden ser utilizados, por ejemplo, como sustancias intermediarias para la elaboración de drogas preparadas conjugando los anticuerpos a un compuesto tal como una citotoxina. Una sustancia intermediaria es una sustancia, generalmente una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) que es utilizado en la fabricación de un compuesto tal como una droga.

Formulaciones

Las formulaciones descritas aquí generalmente incluyen una proteína aislada en una solución acuosa de un pH de alrededor de 3,0-9,0, por ejemplo, pH de alrededor de 4,0-8,0, pH de alrededor de 5,0-6,5, o un pH de alrededor de 5,5-6,0. Las formulaciones no contienen crioprotectores o surfactantes. En general, las formulaciones no contienen un preservante.

Una formulación como se describe aquí no contiene un crioprotector. Los crioprotectores son conocidos para aquellos expertos en el arte, e incluyen, por ejemplo, monosacáridos (por ejemplo, glucosa, fructosa, maltosa, ribosa, manosa, y

xilosa); disacáridos (por ejemplo, trehalosa, sacarosa, celobiosa, y lactosa); trisacáridos (por ejemplo, rafinosa); alcoholes de azúcar (por ejemplo, manitol, sorbitol, mio-inositol, inositoles fosforilados, y glicerol); polisacáridos (por ejemplo, hidroxietil almidón (HES), dextrano, dextrano fosforilado, heparina, sulfato de heparina, ácido hialurónico, sulfato de dermatan, sulfato de condroitina, y agarosa); ácidos carboxílicos (por ejemplo, piruvato y 2,3,-difosfoglicerato); y proteínas o mezclas de proteína utilizadas para un efecto protector (por ejemplo, sangre, suero de animal, plasma, albúmina de humano, albúmina de bovino, gelatina de bovino, y gelatina de pescado).

Las nuevas formulaciones no contienen un surfactante (un reactivo que puede reducir la tensión superficial del agua cuando se utiliza en concentraciones muy bajas). Los surfactantes son conocidos en el arte e incluyen, por ejemplo, a los surfactantes polisorbato 80, polisorbato 20, y Pluronic®.

En general, las nuevas formulaciones no contienen un preservante. Los preservantes son conocidos para aquellos expertos en el arte e incluyen agentes antibacterianos y antifúngicos tal como por ejemplo, azida de sodio, compuestos que contienen mercurio tal como timerosal, xilenoles, antibióticos, isotiazolonas, y anfotericina.

Tampones

Las formulaciones pueden estar en un tampón, que significa un agente que mantiene el pH de una solución en un rango aceptable. Un tampón puede incluir, por ejemplo, citrato, acetato, histidina, gluconato, succinato, fosfato, Tris (tris (hidroximetilaminometano)), dietanolamina, HEPES, u otros tampones ácidos orgánicos. Otros tampones adecuados para ser usados con una proteína son conocidos para aquellos expertos en el arte. Ciertas formulaciones excluyen el uso de tampones de amina. En formulaciones que contienen un tampón, el tampón está generalmente presente en una concentración en el rango desde más que 0mM hasta 150mM. En algunos casos la concentración del tampón es desde alrededor de 50mM hasta alrededor de 100mM o desde alrededor de 1mM hasta alrededor de 50mM. Por ejemplo la concentración del tampón puede ser desde alrededor de 10mM hasta 20mM. En algunos casos, una combinación de tampones puede ser utilizada, por ejemplo, tampones HEPES y Tris pueden ser usados en combinación.

Otras consideraciones pueden ser aplicadas a seleccionar un tampón. Por ejemplo, tampones de amina tal como tampones Tris o histidina no son adecuados para ciertos procedimientos de conjugación y por lo tanto no son adecuados para una formulación que contiene una proteína que será utilizada en tal procedimiento de conjugación.

En general, la concentración de sal utilizada en una formulación es expresada como sal agregada y no se tiene en

consideración, por ejemplo, el sodio contribuido por el tampón o la sal que estaba presente en la muestra de proteína previo a la dilución en la formulación.

Las formulaciones pueden ser preparadas utilizando métodos conocidos en el arte. Por ejemplo, se puede utilizar la diálisis para introducir un tampón del pH deseado y, opcionalmente, una sal a una formulación que contiene la proteína de interés. Generalmente, se provee una muestra inicial que contiene una proteína aislada, de interés. En algunos casos, tal como cuando la muestra inicial es de una alta concentración de proteína, antes de la dilución en la formulación, no es necesario tener en cuenta el pH o la cantidad de sal de la muestra inicial. Cuando se prepara una formulación utilizando una muestra inicial que contiene concentraciones de sal muy altas o concentraciones de tampón muy altas, un método para preparar la proteína es generalmente utilizado, en el cual se retira o reduce los componentes no-proteína de la muestra inicial (por ejemplo, mediante diálisis).

Estabilidad

Es una característica de las formulaciones aquí descritas que la proteína (por ejemplo, anticuerpo) componente de la formulación es estable por al menos un período de tiempo especificado que no es menor de tres semanas cuando la formulación es almacenada a una temperatura desde -80°C hasta

8°C. En general, un componente de proteína en una formulación es estable por al menos un año a 5°C. La estabilidad generalmente se refiere a la estabilidad conformacional de la proteína y/o la estabilidad de la actividad. Con respecto de una formulación, una proteína es estable si cumple al menos uno de los parámetros para estabilidad que se proveen aquí. En general, es deseable minimizar la formación de especies de alto peso molecular que se acumulan durante el almacenamiento de una proteína. Por lo cual, un parámetro para la estabilidad es que el aumento, si lo hay, en la cantidad de especies de alto peso molecular en una formulación sometida a almacenamiento es menor que en un control. Por ejemplo, el porcentaje de especies de alto peso molecular en una muestra después del almacenamiento en una formulación no aumenta significativamente respecto de un control. En general, un control es una réplica de la formulación que no ha sido sometida a almacenamiento bajo las condiciones experimentales (por ejemplo, por tres semanas a -80° hasta 8°C). En algunos casos, el porcentaje del componente de proteína de una formulación en especies de alto peso molecular después del almacenamiento es de 10% o menos del total de proteína, 5% o menos del total de proteína, es 3% o menos del total de proteína, o es 2% o menos del total de proteína. Los métodos de ensayo de especies de alto peso molecular son conocidos en el arte e incluyen SEC-HPLC, SDS-PAGE, electroforesis capilar, y cromatografía por exclusión de tamaño

Otro parámetro que puede ser ensayado es el aumento, si lo hay, en la cantidad de especies de bajo peso molecular en una formulación sometida a almacenamiento. En general, es deseable minimizar la acumulación de especies de bajo peso molecular durante el almacenamiento. Por ejemplo, el porcentaje de especies de bajo peso molecular en una muestra después del almacenamiento en una formulación no aumenta significativamente respecto de un control. En algunos casos, el porcentaje del componente de proteína de una formulación en especies de alto peso molecular después del almacenamiento es de 10% o menos del total de proteína, 5% o menos del total de proteína, es de 3% o menos del total de proteína, o es de 2% o menos del total de proteína. Las especies de bajo peso molecular pueden ser ensayadas utilizando métodos conocidos en el arte, por ejemplo, SEC-HPLC.

La proporción de especies ácidas y básicas en una formulación después del almacenamiento bajo diversas condiciones puede ser comparada con la proporción en un control. En general, el porcentaje de especies ácidas, indicativo de des-amidación, es determinado. Un incremento en el porcentaje de especies ácidas es indicativo de estabilidad disminuida. Por ejemplo, una formulación estable generalmente muestra no más que un 10% de aumento en el porcentaje de especies ácidas respecto de un control bajo una condición seleccionada. Los métodos para determinar el porcentaje de especies ácidas en una muestra son conocidos en el arte, por

ejemplo, CEX-HPLC. En algunos casos, la presencia de especies básicas es probada utilizando métodos conocidos en el arte. U cambio en el porcentaje o tipo de especies básicas presentes en una proteína almacenada en una formulación es indicativo del grado de estabilidad de las especies de proteína en la formulación.

Otro parámetro para la estabilidad puede ser un incremento en los agregados y las especies HMW, si lo hay, que es menos que o lo mismo que un 10% del aumento de los agregados y de las especies de alto peso molecular en un control. Los agregados generalmente son aquellos materiales en una muestra que no ingresan a una gel, columna, u otro medio de separación que puede ser utilizado para separar los componentes de proteína de una formulación. Los métodos para determinar las especies de alto peso molecular más los agregados en una formulación son conocidos en el arte e incluyen electroforesis en gel de poliacrilamida, cromatografía por exclusión de tamaño, electroforesis capilar, y barrido de luz.

La potencia o actividad de una proteína puede ser determinada y utilizada como un parámetro para establecer la estabilidad de una formulación. En el caso de un anticuerpo, se puede utilizar un inmunoensayo (por ejemplo, un ensayo inmunosorbente ligado a enzima(ELISA)). Cuando un inmunoensayo u otro ensayo de actividad son utilizados, un anticuerpo en una formulación es estable si este retiene al menos un 50% de su actividad en el inmunoensayo respecto de la actividad de un

52.

control. En algunos casos, la formulación es estable si la proteína retiene al menos el 20% de su actividad.

Otros parámetros de estabilidad también pueden ser medidos y utilizados para evaluar una formulación. Por ejemplo, la estabilidad de una proteína en una formulación después de agitación puede ser probada. Esto puede ser un parámetro importante, debido a que es deseable que las muestras se mantengan estables durante el transporte. La estabilidad de una formulación con respecto de la agitación es generalmente probada sometiendo la muestra a agitación (por ejemplo, 360 rpm) por un período de tiempo (por ejemplo, 12 horas, 24 horas, 48 horas, o mayor) luego determinando si existe un incremento en productos indicativos de inestabilidad (por ejemplo, especies de alto peso molecular, especies de bajo peso molecular, o especies ácidas) respecto de un control.

Otros métodos conocidos en el arte pueden ser usados para evaluar la estabilidad de una proteína en una formulación. Ejemplos de tales métodos incluyen dicroismo circular, el cual provee ambas la información de la estructura secundaria y terciaria, espectroscopia de fluorescencia (por ejemplo, en presencia de Bis-ANS, el cual se une a parches hidrofóbicos como un indicio de desplegamiento), calorimetría diferencial de barrido (DSC, la cual monitorea el desplegamiento térmico total), y la ultrafiltración/diafiltración.

Más de un parámetro puede ser usado para evaluar la estabilidad de una proteína.

53

Temperatura

Es una ventaja de ciertas formulaciones descritas aquí que estas proveen un método para almacenar una proteína en una solución mínima de tal modo que la proteína no presenta una degradación o agregación importante a lo largo del tiempo y a lo largo del un rango de temperaturas. En general, una proteína o péptido en la formulación es estable por al menos tres días (por ejemplo, dos semanas o cuatro semanas) a temperaturas comprendidas en el rango desde alrededor de -80°C hasta alrededor de 40°C o desde alrededor de -80°C hasta alrededor de 8°C (por ejemplo, hasta alrededor de 5°C). En algunos casos, es deseable que una formulación sea estable por periodos extensos de tiempo, por ejemplo, por al menos 2 meses, tres meses, seis meses, nueve meses, un año, tres años, cinco años, siete años, o diez años.

Además, una proteína incluida en una formulación puede exhibir una estabilidad importante a lo largo de ciclos de congelamiento-descongelamiento repetidos, y luego de dicho tratamiento puede mantenerse estable después de ser descongelada. En general, una formulación a ser congelada es congelada rápido, por ejemplo, congelada en nitrógeno líquido. El descongelamiento puede ser a un rango de temperaturas, por ejemplo, desde alrededor de 0°C hasta alrededor de 25°C , el cual es descongelamiento lento; o desde alrededor de 26°C hasta 40°C , el cual es descongelamiento rápido. UN ejemplo de descongelamiento rápido es descongelar la formulación en un

53

baño de agua a 37°C. Una proteína en una formulación puede ser estable por al menos un ciclo de congelamiento-descongelamiento, al menos cinco ciclos de congelamiento-descongelamiento, o al menos diez ciclos de congelamiento-descongelamiento.

Puede ser deseable determinar un régimen óptimo para el congelamiento-descongelamiento de una formulación de modo de preservar la estabilidad, o puede ser deseable identificar una formulación que provea la mayor estabilidad para una proteína que sea sometida a un ciclo de congelamiento-descongelamiento particular. Consecuentemente, en algunas modalidades, es evaluado este parámetro. Por ejemplo, una formulación de ensayo puede ser probada en cuanto a la estabilidad bajo diversas condiciones de congelamiento-descongelamiento tal como congelamiento rápido, congelamiento lento, descongelamiento rápido, descongelamiento lento en varias combinaciones para determinar el procedimiento que produce la menor degradación de productos (por ejemplo, la que tiene la mayor estabilidad).

Polipéptidos

Los polipéptidos utilizados en las formulaciones descritas aquí son generalmente proteínas aisladas. Una proteína "aislada" está substancialmente libre de material celular o de otras proteínas contaminantes de la célula o de la fuente de tejido de la cual la proteína es derivada, o está substancialmente libre de precursores químicos o de otros

55

productos químicos cuando es químicamente sintetizada. El término "substancialmente libre" representa a una preparación de proteína aislada que tiene menos de alrededor de 30%, 20%, 10% o 5% (es peso seco), de otras proteínas (también conocidas aquí como "proteína contaminante"), o de precursores químicos. Cuando la proteína aislada es producida de manera recombinante, generalmente también está substancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de alrededor de 20%, menos de alrededor de 10%, o menos de alrededor de 5% del volumen de la preparación de proteína.

En algunos casos, son utilizadas combinaciones de proteínas en una formulación. Por ejemplo, dos anticuerpos diferentes que se van a preparar como un medicamento pueden ser almacenados juntos en misma formulación. También puede ser utilizado un anticuerpo con una formulación en combinación con otros tipos de proteínas o péptidos, incluyendo péptidos tóxicos. Los fragmentos de péptidos o proteínas pueden ser utilizados con las formulaciones, por ejemplo, un fragmento de anticuerpo tal como un fragmento Fab puede ser utilizado.

En general, "proteína" se refiere a una proteína de largo total o un fragmento de la misma. Una proteína puede corresponder a una proteína que existe de manera natural o un fragmento de la misma, o una proteína sometida a ingeniería genética originada desde por ejemplo, mutagenesis o técnicas recombinantes, o un fragmento de la misma. Una proteína puede, en algunos casos incluir una porción no-proteínacea tal como

una molécula detectable (por ejemplo, una molécula fluorescente o un radioisótopo), una toxina, una droga, o una molécula pequeña. Las proteínas pueden contener, por ejemplo, aminoácidos que no existen de manera natural. La proteína puede ser una proteína híbrida. La proteína puede incluir más de un tipo de proteína separada como en un anticuerpo (por ejemplo, que contiene ambas cadenas liviana y pesada) o una proteína insulina madura. UN ejemplo de un fragmento de proteína que puede ser usado incluye un fragmento Fab o un fragmento Fc. En algunos casos, un péptido es usado con una formulación, o, como se describe antes, una combinación de al menos una proteína y al menos un péptido o fragmento de proteína. Las toxinas proteináceas también pueden ser almacenadas en formulaciones, por ejemplo, solas, conjugadas a otra proteína o péptido, o como una entidad separada con otra proteína o péptido. En general, las formulaciones provistas aquí son útiles para cualquier polipéptido (proteína o péptido) como se describe aquí para las proteínas.

Un péptido es un compuesto que tiene dos o más aminoácidos covalentemente unidos (por ejemplo, 5, 10, 15, 20, 30, o 50 aminoácidos). En general, una proteína es un polipéptido o múltiples polipéptidos (por ejemplo, una molécula de anticuerpo que contiene cadenas livianas y pesadas, o porciones de las mismas) que tiene al menos 50 aminoácidos de longitud.

57

Las formulaciones también pueden ser usadas para almacenar polipéptidos que están conjugados a un residuo de péptido o no péptido. Ejemplos de tales residuos incluyen, sin limitación, una molécula fluorescente (por ejemplo, fluoresceína, rodamina, proteína verde fluorescente (GFP), proteína roja fluorescente (RFP), Cy3, Cy3.5, Cy5, o Cy5.5), un residuo elemental (por ejemplo, partículas de oro), una droga, o una toxina. Los métodos para conjugar tales moléculas a un polipéptido son conocidos en el arte. Ejemplos de moléculas incluyen, sin limitación, ricina (Mansfield et al., 1997, Blood 90:2020-2026; Ghetie et al., 1991, Cancer Res. 51:5876; Conry et al., 1995, J. Immunother. Emphas. Tumor Immunol. 18:231-241), exotoxina A de *Pseudomonas* (PE) (Smith, 2001, Seattle Genetics Curr. Opin. Investig. Drugs 2(9):1314-1319; Mansfield et al., 1996, Bioconjug. Chem. 7:557), taxano (es decir, Paclitaxel) (Guillemard et al., 2001, Cancer Res. 61: 694-699), doxorubicina (Shouval et al., 1988, Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 85:8276-8280; Takahashi et al., 1996, Anticancer Drugs 7(6):687-696; Shih et al., 1991, Cancer Res. 51(16):4192-4198; Shih et al., 1994, Cancer Immunol. Immunother. 38(2):92-98; Alexandru et al., 1999, Cancer Res. 59:115-121; Trail et al., 1993, Science 261:212-215), antracenos (Days et al., 2005, Bioconjugate Chem. 16:949-958), maitansinoide (Tassone et al., 2004, Cancer Res. 64:4629-4636; Tolcher et al., 2003, J. Clin. Oncol. 21(2):211-222), adriamicina (Hurwitz et al., 1983, Ann. N.Y. Acad. Sci. 417:125-36; Takahashi et al., 1988, Gan No

60

58'

Rinsho 34:847-50; Deguchi et al., 1987, J. Urol. 137(2):353-358), radioisótopos (Karube et al., 1996, Nuclear Med. Biol. 23:753-759; Mishra et al., 2004, J. Drug Target. 12(9-10):559-567; Lee et al., 2001, Cancer Res. 61:4474-4482), metotrexato (Ryser et al., 1988 J. Cell Physiol. 135(2):277-284; Mandel et al., 1991, J. Cell Physiol. 149(1):60-65), ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecan-*N,N',N'',N'''*-tetraacético (DOTA), por ejemplo, conjugado a otro residuo tal como 90-Itrio (Lu et al., 2005, J. Pharm. Sci. 94(4):788-797), estreptavidina (Ngai et al., 1995, Nucl. Med. Biol. 22(1), 77-86), productos conjugados a radioisótopos (por ejemplo, indicados en Biopharmaceutical Products in the U.S. Market, 4th Edition, Rader, ed., Biotechnology Information Institute, Rockville, MD, 2005), incluyendo Tecnecio (Tc) 99m, Itrio, y radioconjugados In111.

En general, el componente proteína de una formulación es una proteína que tiene un pI relativamente alto, por ejemplo, un pI de al menos 6,0, 7,0, 8,0, o 8,5. La proteína puede tener más de una cadena peptídica como en un anticuerpo. Cuando el componente proteína de una formulación es un anticuerpo, el anticuerpo puede ser policlonal o monoclonal, o un fragmento del mismo (por ejemplo, un fragmento Fab). Una proteína puede estar presente en una formulación a una concentración desde alrededor de 1mg/ml hasta alrededor de 300 mg/ml, desde alrededor de 1mg/ml hasta alrededor de 200 mg/ml, desde alrededor de 1mg/ml hasta alrededor de 100 mg/ml, desde alrededor de 1mg/ml hasta alrededor de 50 mg/ml, desde

alrededor de 10mg/ml hasta alrededor de 300 mg/ml, desde alrededor de 10mg/ml hasta alrededor de 200 mg/ml, desde alrededor de 10mg/ml hasta alrededor de 50 mg/ml, desde alrededor de 10mg/ml hasta alrededor de 30 mg/ml, o desde alrededor de 20mg/ml hasta alrededor de 50 mg/ml. Los anticuerpos específicos utilizados en las formulaciones descritas aquí son un anticuerpo monoclonal anti-CD22 humanizado, un anticuerpo Y anti-Lewis monoclonal, y un anticuerpo anti-5T4.

Una proteína aislada utilizada en una formulación es generalmente una proteína que tiene potencial como un agente terapéutico o potencial para ser parte de un agente terapéutico. Tales proteínas se conocen aquí como una proteína terapéutica e incluye anticuerpos.

Ejemplos de proteínas específicas que pueden ser utilizadas aquí incluyen anticuerpos tales como anti-CD-22 (véase US20040082764A1 y US20040192900A1), anti-Lewis Y (WO 05/019271A1), y anti-5T4 (véase la solicitud U.S. serial No. 60/608494, presentada en Septiembre 10 de 2004).

pH

Las condiciones favorables de pH para una formulación se encuentran entre alrededor de pH 4,0 hasta un pH de 8,0. En general, el pH es de alrededor de 5,5-6,0. A un pH de alrededor de 5,5-6,0, una formulación que contiene un anticuerpo monoclonal puede ser almacenada y mantiene la estabilidad por

60

al menos tres meses, por ejemplo, seis meses, un año, o dos años desde una temperatura de 0°C hasta alrededor de 8°C (generalmente de alrededor de 1°C hasta alrededor de 5°C), y para almacenamiento de largo plazo (por al menos tres años, cinco años, siete años, o diez años) por ejemplo a -80°C.

Identificación de formulaciones favorables

En algunos métodos descritos aquí, una formulación favorable se identifica para una proteína de interés específica. En estos métodos, una proteína aislada, por ejemplo, una proteína terapéutica tal como un anticuerpo, es identificada para ser almacenada en una formulación tal como aquellas descritas aquí. La proteína puede ser un anticuerpo que va a ser almacenado hasta que pueda ser utilizado para procesos downstream (proceso de recuperación y purificación de biomoléculas) tal como para la fabricación de un anticuerpo conjugado a una citotoxina (por ejemplo, caliqueamicina) para ser usado como un agente terapéutico. Otros ejemplos incluyen el almacenamiento de un anticuerpo que se va a conjugar a una marca detectable tal como fluoresceína, rodamina, o conjugado a polietilén glicol seguido de liofilización para un almacenamiento más largo del anticuerpo.

Para identificar una formulación favorable para el almacenamiento de la proteína aislada, generalmente, la proteína es suspendida en una serie de soluciones de ensayo a un pH en el rango desde alrededor de 4,0-8,0 (por ejemplo, pH 5,0-6,0) y con concentraciones de sal en el rango desde

65

alrededor de 0mM-150mM. Estas soluciones de ensayo se almacenan a varias temperaturas por un período de tiempo especificado o varios períodos de tiempo diferentes (por ejemplo, tres días, dos semanas, o cuatro semanas). Luego las muestras son evaluadas para al menos un parámetro de estabilidad tal como especie de alto peso molecular, especies de bajo peso molecular, un cambio en el porcentaje de especies ácidas, o un cambio en la cantidad de agregados y de especies de alto peso molecular. Las muestras en las cuales el componente de proteína de la formulación es estable son luego seleccionadas como formulaciones favorables para almacenamiento de las especies. Evaluaciones adicionales pueden ser realizadas para evaluar otros parámetros de estabilidad tal como estabilidad después del ciclo de congelamiento-descongelamiento o después de agitación (revolver). Los ejemplos provistos *supra* proveen una guía adicional para métodos que sirven para identificar una formulación favorable para el almacenamiento de una proteína aislada específica.

Métodos de almacenamiento de una proteína

Aquí se proveen métodos de almacenamiento de proteínas o péptidos (por ejemplo, anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, o proteínas conjugadas a un residuo peptídico o no-peptídico). Los métodos son particularmente útiles para almacenar una proteína tal como un anticuerpo hasta que se necesita para la fabricación, por ejemplo, para fabricar o

elaborar una droga conjugada a una citotoxina o para fabricar un reactivo marcado que sea detectable, o para el almacenamiento de una proteína que ha sido modificada, por ejemplo, por medio de conjugación a un residuo peptídico o no-peptídico.

El almacenamiento de una proteína (por ejemplo, un anticuerpo) como parte de una formulación reivindicada provee flexibilidad incrementada para procesos downstream respecto de formulaciones que contienen agentes estabilizantes y/o crioprotectores.

También puede ser utilizada una formulación para proveer, por ejemplo, una sustancia de droga de un anticuerpo monoclonal estable, o una formulación de sustancia de droga intermediaria para un procesamiento posterior, tal como para ser conjugada con potentes agentes anti-cancerígenos, liofilización, o una formulación líquida para administración parental. En general, El método incluye el almacenamiento de una proteína aislada seleccionada como parte de una solución acuosa que no incluye un surfactante, no incluye un criopreservante, y que tiene una concentración de tampón relativamente baja (por ejemplo, desde alrededor de 10mM hasta alrededor de 20mM). En general, la concentración de sal de la formulación es relativamente baja, generalmente menos de alrededor de 100mM, por ejemplo, desde alrededor de 0mM hasta alrededor de 50mM, desde alrededor de 1mM hasta alrededor de

20mM, desde alrededor de 1mM hasta alrededor de 10mM, o desde alrededor de 5mM hasta alrededor de 10mM.

Además de las ventajas descritas *supra* y aquellas aparentes a partir de las cláusulas, las proteínas almacenadas como se ha descrito aquí tienen una buena reproducibilidad entre muestras (por ejemplo, muestras de proteína de una a preparación única las cuales son separadas en alícuotas y en donde las alícuotas utilizando una formulación descrita aquí). Además, las proteínas almacenadas como se ha descrito aquí generalmente son eficientemente procesadas posteriormente al almacenamiento, por ejemplo ellas son conjugadas más eficientemente que las proteínas almacenadas con crioprotector y/o surfactante.

EJEMPLOS

Además la invención es ilustrada a través de los siguientes ejemplos. Los ejemplos son provistos para propósitos ilustrativos solamente. No se pretende que estos sean interpretados como limitando el espectro o contenido de la invención, de ninguna forma.

Ejemplo 1: pH

Anti-Lewis Y

Para investigar el rango de pH en el cual un anticuerpo es estable, se prepararon muestras de 1mg/ml de anticuerpo Y anti-Lewis en un rango de pH desde 4 a 8,

6A.

específicamente a pH 4,0, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, y 8,0. En este ejemplo y aquellos descritos más adelante, se prepararon muestras generalmente en frascos Teflon® PFA de 5 ml (Cole-Parmer, Vernon Hills, IL), por ejemplo, un volumen total de muestra de 2 ml. Las concentraciones de proteína fueron determinadas utilizando absorbancia UV a 280 nm medida con un espectrofotómetro Spectra Max® PLUS (Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA) para probar las muestras en placas UV Costar® de 96 pocillos (Corning, Corning, NY). La concentración de proteína fue calculada utilizando el coeficiente de absorbancia específica de $1,36 \text{ (mg/ml)}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Las muestras fueron preparadas por medio de diálisis en tampones de pH que contienen tampón fosfato de potasio 10mM del pH seleccionado. También, cada muestra contiene NaCl 75mM. Las muestras preparadas fueron filtradas de forma estéril y colocadas en un congelador a -80°C , o en una cámara de estabilidad mantenida a 5°C o 40°C . Después de cuatro semanas, las muestras fueron probadas para la presencia de especies de alto peso molecular y de especies de bajo peso molecular utilizando SEC-HPLC (cromatografía por exclusión de tamaño-cromatografía líquida de alta resolución). En análisis SEC-HPLC fue realizado utilizando TosoHaas (Montgomeryville, PA) BIOSEP G3000SW_{XL} como la columna de separación utilizando métodos conocidos en el arte.

Las muestras congeladas fueron descongeladas en un baño de agua a 37°C antes del análisis.

6A

65

La existencia de especies de alto peso molecular aumentó con el pH, pero las especies de alto peso molecular no fueron el principal producto de degradación como una función del pH (Fig. 1A). El perfil de pH de las especies de bajo peso molecular para las muestras almacenadas a 40°C fue de forma V, con el mínimo de las especies de bajo peso molecular a pH 5,5 (Fig. 1B). Por consiguiente, el anticuerpo Y anti-Lewis era estable a un rango de temperatura desde -80°C hasta 5°C y sobre un rango de pH desde pH 4,0 hasta 8,0.

Además, se utilizó CEX-HPLC (cromatografía de intercambio catiónico-HPLC) para evaluar la estabilidad de las muestras. Estos análisis fueron realizados utilizando una columna Dionex (Sunnyvale, CA) ProPac WCX-10. Se encontró que la concentración de especies ácidas aumentó a mayor pH en las muestras almacenadas a 40°C (Fig. 2). Sin embargo, para muestras almacenadas a 5°C y a -80°C, el Y anti-Lewis fue estable a lo largo del rango completo de pH, confirmando las conclusiones obtenidas de los datos SEC-HPLC.

Incluso como un otro método para evaluar la estabilidad, se utilizó SDS-PAGE para además analizar las muestras almacenadas a 40°C utilizando geles de 4-20% corridos ya sea bajo condiciones de reducción o de no-reducción. En estos experimentos, se demostró que la menor cantidad de cambio en el peso molecular, y por ende la mayor estabilidad, fue de aquellas muestras en el rango de pH de 5,0 - 6,0 (Fig. 3). Por lo cual, las muestras (por ejemplo, anticuerpos) que van a ser

66.

almacenados a 40°C son mejor mantenidos a un pH entre alrededor de 5,0 y 6,0.

Además, se utilizó electroforesis de enfoque isoeléctrico (IEF) para evaluar las muestras almacenadas a 40°C. La electroforesis IEF fue utilizada para monitorear los cambios de pI de las muestras de anticuerpo debido a la producción de especies ácidas como un resultado de la degradación de proteína.

Consistente con los resultados del análisis SDS-PAGE de las muestras de anticuerpo, aquellas muestras en el rango de pH entre 5,0 - 5,5 presentaron la menor cantidad de cambio en la carga de total de proteína (Fig. 4).

Un aspecto importante del almacenamiento es la estabilidad del pH de una formulación a lo largo del tiempo. Por lo tanto, el pH de las muestras fue probado al principio del experimento, después de dos semanas, y después de cuatro semanas de almacenamiento a las tres temperaturas. No existió desviación importante desde el pH de partida en ninguna de las muestras (Tabla 1).

Tabla 1: medición de control de estabilidad de las muestras de Y anti-Lewis, frente al pH

pH objetivo	pH medido						
	Time 0	2 semanas			4 semanas		
		-80°C	5°C	40°C	-80°C	5°C	40°C
4,00	4,01	4,01	4,02	4,02	4,05	4,07	4,03
5,00	5,01	5,02	5,01	5,02	5,07	5,06	5,02

69

5,50	5,51	5,52	5,52	5,52	5,55	5,57	5,54
6,00	6,00	5,99	5,99	6,00	6,04	6,06	6,02
6,50	6,51	6,51	6,51	6,50	6,55	6,56	6,53
7,00	7,03	7,03	7,00	6,99	7,04	7,05	7,01
8,00	8,01	7,97	7,96	7,92	7,97	7,97	7,91

Juntos, los datos presentados más arriba demuestran que el Y anti-Lewis es estable a lo largo de un rango de temperatura desde -80°C hasta 5°C y sobre un rango de pH de 4-8. En general, un pH favorable para el almacenamiento de este anticuerpo es de alrededor de 5,5. Esto también provee condiciones relativamente favorables para el almacenamiento del anticuerpo a 40°C .

En general, se selecciona un pH para el almacenamiento de proteína que resulta en estabilidad a lo largo de un rango de dos o más temperaturas, por ejemplo, cuando la muestra es almacenada por debajo de 0°C , cuando la muestra es almacenada entre 0°C y 15°C , y cuando la muestra es almacenada entre alrededor de 15°C y 40°C . En otro ejemplo no limitante, cuando la muestra es almacenada a alrededor de -80°C , 5°C , y 40°C .

Anti-CD22

También fueron probados los efectos de pH en el almacenamiento de un segundo anticuerpo (anti-CD22), un anticuerpo IgG4 humanizado que está dirigido a CD22, el cual es expresado en la superficie de células B maduras normales y malignas. El pI teórico del anti-CD22 es de aproximadamente 8,5. Mientras que la hidrólisis es más probable que ocurra a pH 5,0 y por debajo, la desamidación es probable a un pH mayor que 7,5. De modo que los experimentos fueron diseñados para cubrir un rango de pH de 4 a 8 para probar el efecto del pH sobre la estabilidad de la proteína, para evaluar la capacidad indicadora de estabilidad de los procedimientos analíticos, y para proveer una razón para la selección del pH adecuado para el almacenamiento de una formulación de proteína.

Se preparó muestras que contienen anti-CD22 las cuales contenían 0,5 mg/ml de anti-CD22 en varios tampones a los valores de pH a ser probados. Se almacenó las muestras por dos semanas a 5°C, 25°C, o 40°C a un pH de 4,0 (succinato 10mM), 5,0 (citrato 10mM), 5,5 (succinato 10mM), 6,0 (histidina 10mM), 6,5 (histidina 10mM), 7,0 (fosfato 10mM), o 8,0 (Tris 10mM). Las muestras fueron analizadas en cuanto al porcentaje de especies de alto peso molecular presentes utilizando SEC-HPLC. En estas muestras (cada una de ellas conteniendo 0,5 mg/ml de anti-CD22), no se observó un aumento importante en el porcentaje de especies de alto peso molecular en aquellas muestras en el rango de pH de 5,0 a 8,0 comparada con la

cantidad presente bajo condiciones iniciales después de dos semanas (Fig. 5).

Cuando un anticuerpo tal como un anti-CD22 va a ser utilizado para un proceso downstream, se debe tener en consideración la presentación de la sustancia intermediaria en un tampón adecuado para el procesamiento posterior. Por ejemplo, la conjugación de caliqueamicina a un anti-CD22 puede ser realizada en un tampón que no contiene una amina primaria, a un pH de 7 a 8,5. Sin embargo, puede no ser necesario que la sustancia intermediaria que sea provista en el tampón de conjugación. En este ejemplo, la formulación de la sustancia intermediaria es limitada en cuanto a que las aminas primarias en los componentes del tampón pudieran interferir con el procedimiento de conjugación. Para investigar el almacenamiento de proteínas en una solución que no contiene aminas primarias, fueron realizados experimentos en los cuales en anti-CD22 se concentró hasta 25 mg/ml y se diafiltró o dializó ya sea en HEPES 50mM (pH 7,6), succinato 50mM (pH 6,0), o succinato 50mM + HEPES 50mM (pH 7,0). Cada muestra fue estudiada hasta dos semanas en cuanto a la estabilidad. Se prepararon las muestras con o sin NaCl 75mM y se almacenaron a -80°C, 4°C, o 40°C. La muestras se analizaron al tiempo = 0, una semana, y a las dos semanas por A280/A320, SEC-HPLC, SDS-PAGE, e IEF (a las dos semanas).

Los datos de estos experimentos demostraron que el pH 6,0 (tampón succinato) proveyó una mayor estabilidad respecto

del pH 7,0 (HEPES) o una combinación a pH 7,6 (HEPES y succinato) (Fig. 6).

También se utilizó SEC-HPLC para evaluar el porcentaje de especies de alto peso molecular en muestras que contienen 25 mg/ml de anti-CD22 a pH 6,0, 7,0, o 7,6 en succinato, HEPES, o una combinación (como se ha descrito más arriba) que fueron almacenadas por dos semanas a -80°C, 5°C, o 40°C, en presencia o ausencia de NaCl 75mM. Estos datos demostraron que la sal (NaCl) no tuvo un efecto importante sobre la formación de especies de alto peso molecular en estas muestras (Fig. 6). Por lo tanto, la presencia de sal no es una condición crucial para el almacenamiento de anticuerpos.

Ejemplo 2: pH/ tampones

Para determinar si los diferentes tampones proveen condiciones de almacenamiento favorables a diferentes valores de pH, se estudió tampones a un pH 0,5 unidades por encima y por debajo del pH "óptimo" tentativo utilizando el anticuerpo Y anti-Lewis, como la muestra almacenada. En estos experimentos, se estudió cuatro diferentes sistemas de tampón en el rango de pH desde 5,0 hasta 6,0. También se evaluó el efecto de varias fuerzas iónicas sobre la estabilidad. Los tampones utilizados en estos experimentos fueron acetato de sodio 10mM , pH 5,0, 5,5, y 6,0; acetato de sodio 10mM, NaCl 75mM, pH 5,0, 5,5 y 6,0; citrato de sodio 10mM, pH 5,0, 5,5, y 6,0; citrato de sodio 10mM, NaCl 75mM, pH 5,0, 5,5 y 6,0; fosfato de sodio

10mM, pH 5,0, 5,5, y 6,0; fosfato de sodio 10mM, NaCl 75mM, pH 5,0, 5,5, y 6,0; succinato de sodio 10mM, pH 5,0, 5,5, y 6,0; y succinato de sodio 10mM, NaCl 75mM, pH 5,0, 5,5, y 6,0. En estos experimentos, se dializó Y anti-Lewis en los tampones anteriores y se diluyó a una concentración final de 1 mg/ml. Luego las muestras fueron almacenadas a -80°C o 40°C por hasta 4 semanas, luego fueron analizadas en cuanto al porcentaje de especies de alto peso molecular y el porcentaje de especies de bajo peso molecular utilizando SEC-HPLC. En estos experimentos, se encontró que las especies de alto peso molecular no fueron las más degradadas, y la diferencia en el nivel de las especies de alto peso molecular entre las diferentes formulaciones fue insignificante (Fig. 7A). A un valor de pH 5,5, la muestra de citrato de sodio demostró el menor nivel de especies de bajo peso molecular entre todos los tampones (con o sin adición de NaCl) (Fig. 7B).

Además, las muestras fueron analizadas utilizando CEX-HPLC. Estos datos confirmaron las observaciones totales de los datos SEC-HPLC en cuanto a que había un porcentaje aumentado de especies ácidas presentes en muestras de pH mayores en los cuatro tampones estudiados (Fig. 8), es decir, hay una tendencia ascendente de las especies ácidas para todos los tampones en el rango de pH de 5,0 a 6,0.

Estos datos demuestran que en global, la estabilidad de Y anti-Lewis fue similar en los cuatro tampones estudiados (acetato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio, y

72

succinato de sodio) en un rango de pH desde 5,0 hasta 6,0. Además, en el estudio de estabilidad acelerada (examinando la estabilidad a 40°C; Fig. 7B), la formación de la menor cantidad de especies de bajo peso molecular se produjo en la muestra que contiene tampón citrato de sodio. Por lo cual, un tampón favorable para el Y anti-Lewis es citrato de sodio 10mM, pH 5,5. Estos datos también demuestran un método para identificar una formulación favorable para el almacenamiento de una proteína tal como un anticuerpo.

Ejemplo 3: Concentración de sal y Concentración de proteína

La concentración de sal fue examinada como un parámetro que puede tener un efecto sobre la estabilidad de una proteína e una formulación en almacenamiento. La estabilidad al almacenamiento a una baja concentración de proteína también fue evaluada en el protocolo de degradación acelerada descrito en el Ejemplo 2. En estos experimentos, se encontró que a una concentración de proteína de 1mg/ml, la adición de NaCl promovió levemente la formación de las especies de bajo peso molecular (Fig. 7B) mientras que suprimió la formación de las especies ácidas (Fig. 8) en todos los tampones estudiados.

Se utilizó CEX-HPLC y SEC-HPLC para evaluar la estabilidad de anti-Lewis Y en citrato de sodio 10mM pH 5,5 conteniendo diferentes molaridades de NaCl. Estos datos demuestran que el anti-Lewis Y fue estable a 5°C y a -80°C en

75

citrato de sodio 10mM, pH 5,5 que contiene 0-150mM de NaCl (Fig. 9A). La degradación acelerada muestra, a una concentración de proteína de 30mg/ml, que el NaCl suprime la aparición de especies ácidas (Fig. 9A) pero eleva la formación de las especies de bajo peso molecular (Fig. 9C) y la formación de las especies de alto peso molecular fue relativamente estable bajo las diferentes condiciones (Fig. 9B), lo cual confirma la observación de las muestras que contienen 1mg/ml de proteína (Figs. 7 y 8). Por lo cual, se encontró que una concentración de sal de NaCl 75mM era la más favorable para minimizar la degradación total.

Estabilidad con agitación

Otra condición que puede afectar la estabilidad de una proteína es la cantidad de agitación sufrida por la muestra. Por lo cual, es deseable que el almacenamiento de la formulación preserve una cierta cantidad de estabilidad cuando la muestra es agitada. Los experimentos fueron realizados para estudiar la estabilidad de anti-Lewis Y en una formulación bajo diversas condiciones de incubación con agitación. En estos experimentos, se estudiaron las formulaciones que contienen ya sea 1mg/ml o 30mg/ml de anti-Lewis Y en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 en presencia o ausencia de NaCl 150mM, por medio de agitación a 360 rpm por 24 horas a temperatura ambiente y el porcentaje de recuperación de monómero fue estudiada utilizando SEC-HPLC.

Estos experimentos demostraron que el anticuerpo era estable cuando estaba presente en una concentración de 30mg/ml al ser sometido a agitación (Fig. 10). También se encontró que a una concentración de 1 mg/ml, de NaCl se redujo levemente la recuperación de monómero.

Consecuentemente, el simple almacenamiento de la formulación puede proveer suficiente protección a la muestra, frente al estrés inducido por la agitación.

Estabilidad frente al congelamiento/descongelamiento

Las proteínas a ser utilizadas para diversos métodos de elaboración pueden necesariamente ser sometidos a ciclos de congelamiento-descongelamiento, ciertamente, algunas veces a múltiples ciclos de congelamiento-descongelamiento. Por lo tanto, es ventajoso para el almacenamiento de una formulación, proveer condiciones bajo las cuales haya una mínima degradación causada por ciclos de congelamiento-descongelamiento. Además, es útil para determinar que condiciones fueron preparadas para las muestras, de modo que el congelamiento y descongelamiento provea una óptima preservación de la proteína. Para estudiar estos parámetros, se prepararon muestras que contenían anti-Lewis Y ya sea a las concentraciones de 1mg/ml o 30mg/ml en citrato de sodio 10mM, pH 5,5, en presencia o ausencia de NaCl 150mM. Estas muestras fueron luego sometidas a diez ciclos de congelamiento-descongelamiento con condiciones de congelamiento rápido/descongelamiento rápido, congelamiento

75

rápido/descongelamiento lento, congelamiento
lento/descongelamiento rápido, o congelamiento
lento/descongelamiento lento. El congelamiento rápido se
realizó, congelando la muestra en nitrógeno líquido y el
congelamiento lento se realizó colocando la muestra a -80°C . El
descongelamiento rápido se realizó congelando la muestra en un
baño de agua a 37°C y el descongelamiento lento se realizó
colocando la muestra a temperatura ambiente. La cantidad de
monómero fue luego evaluada en cada muestra utilizando SEC-
HPLC.

Los resultados de estos experimentos mostraron que el
anti-Lewis Y era estable a alta concentración de proteína (30
mg/ml) sin importar las condiciones de
congelamiento/descongelamiento o la concentración de NaCl (Fig.
11A y Fig. 11B). El anti-Lewis Y fue estable frente a
condiciones de congelamiento lento sin importar la
concentración de proteína, las condiciones de descongelamiento,
o la concentración de NaCl. Sin embargo, a una concentración de
1 mg/ml de NaCl en la formulación se redujo levemente la
recuperación bajo condiciones de congelamiento muy rápido.

En vista de lo anterior, se puede concluir que el
anti-Lewis Y es estable a -80°C y a 5°C en NaCl a una
concentración en el rango desde 0 mM a 150 mM. Además, estudio
de estabilidad acelerada (un estudio de formulaciones a 40°C)
mostró que el NaCl disminuye levemente la formación de las
especies ácidas mientras que promueve una aparición de especies

de bajo peso molecular. En vista de estos resultados, se encontró que el NaCl 75mM es óptimo para minimizar la degradación total del anti-Lewis Y.

Estos experimentos también demuestran métodos para identificar condiciones favorables para una proteína específica a ser almacenada en una formulación aquí descrita.

Anti-CD22

Para examinar la variabilidad de las condiciones de almacenamiento entre diferentes proteínas y además validar los métodos para identificar el almacenamiento de las formulaciones para una proteína específica, se investigó la estabilidad al almacenamiento de un anti-CD22. En estos experimentos, las formulaciones que contienen 25mg/ml (Fig. 6) de anti-CD22 fueron preparadas en varios tampones para alcanzar el pH deseado; pH 6,0 (succinato 50mM); pH 7,0 (succinato 50mM y HEPES 50mM); pH 7,6 (HEPES 50mM), y almacenadas por un mes a -80°C, 5°C, 25°C, o 40°C, para luego ser evaluadas en cuanto al porcentaje de especies de alto peso molecular.

Se encontró que el NaCl no tuvo efecto sobre la estabilidad de anti-CD22 en el almacenamiento a altas concentraciones de proteína (Fig. 6 y Fig. 12) a cualquiera de las temperaturas estudiadas.

Estabilidad frente al estrés por agitación

Se realizó un estudio de agitación para determinar los efectos de la interacción superficie/aire sobre anti-CD22

77

en presencia de NaCl y polisorbato 80. Este estudio también fue realizado para evaluar la estabilidad de anti-CD22 como un líquido durante el embarque y la manufactura. En estos experimentos, se prepararon las muestras que contenían 15mg/ml de anti-CD22 en tampón succinato 20mM, pH 6,0, con la adición de NaCl 75mM, 0,1% de polisorbato 80, o NaCl 75mM más polisorbato 80 al 0,1% (Tween). Las muestras fueron agitadas a 300 rpm por 24 horas. También se prepare un control, el cual contenía solo el anti-CD22 en tampón succinato. Luego fue estudiado el porcentaje de especies de alto peso molecular. Estos datos demuestran que ni NaCl ni polisorbato 80 son beneficiosos para la estabilidad de anti-CD22 durante la agitación (Fig. 13).

En conjunto, los datos presentados antes para anti-CD22 en el almacenamiento de la formulación demuestran que el NaCl no tiene un efecto substancial sobre la estabilidad total de anti-CD22. Por lo cual, NaCl no es necesario en la formulación anti-CD22.

Ejemplo 4: Concentración de anticuerpo

Se investigó los efectos de la concentración de proteína sobre la estabilidad al almacenamiento en una formulación. Es deseable, la determinación de una concentración de proteína favorable cuando se identifica una formulación para almacenamiento de una proteína específica, así como el

7A
descubrir los principios generales relacionados con la importancia de este parámetro en una formulación.

En estos experimentos, se prepararon las muestras que contenían anti-Lewis Y en citrato 10mM, pH 5,5 a una concentración de 1mg/ml o 30mg/ml y que contenían ya sea nada de NaCl o NaCl 75mM. Las muestras fueron almacenadas por cuatro semanas a 40°C, y luego estudiadas para el cambio en el porcentaje de especies de alto peso molecular (Fig 14A), cambio en el porcentaje de especies de bajo peso molecular (Fig. 14B), y cambio en el porcentaje de especies ácidas (Fig. 14C).

Los resultados de estos experimentos revelaron una estabilidad comparable para las formulaciones que contienen 1mg/ml y 30 mg/ml, con la menor concentración (1 mg/ml) solo levemente más sensible a la presencia de NaCl.

La estabilidad sostenida es particularmente deseable en el almacenamiento de una formulación. Consecuentemente, se llevó a cabo un estudio para determinar la estabilidad de formulaciones de anti-Lewis Y 30mg/ml, que contienen 30mg/ml de anti-Lewis Y en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 y NaCl 75mM a varias temperaturas: -80°C, -20°C, 5°C, 25°C, y 40°C. Se estudió las muestras a un mes, dos meses, tres meses, seis meses, y nueve meses en cuanto al porcentaje de especies de alto peso molecular (Fig. 15A), el porcentaje de especies de bajo peso molecular (Fig. 15B), y el porcentaje de especies ácidas (Fig. 15C). El análisis de estos datos demuestran que hay una buena estabilidad de proteína de anti-Lewis Y después de 9 meses de

71.

almacenamiento a un rango de temperatura desde -80°C hasta 5°C en la formulación de citrato de sodio 10mM, NaCl 75mM, pH 5,5.

Estabilidad al Congelamiento/descongelamiento y agitación

Como se muestra antes, (Fig. 10 y Fig. 11), pareciera que anti-Lewis Y no es sensible a la agitación y al estrés del congelamiento/descongelamiento a una concentración de 30 mg/ml. Además, el anti-Lewis Y no fue sensible al congelamiento lento a una concentración de 1mg/ml sin importar la velocidad de descongelamiento, sin embargo se encontró pérdida de proteína a una concentración de 1mg/ml de anti-Lewis Y con agitación así como cuando se colocó bajo condiciones de congelamiento rápido.

Anti-CD22/Congelamiento/descongelamiento

Para investigar además los efectos de los ciclos de congelamiento-descongelamiento, en anti-CD22 a una concentración ya sea de 1mg/ml o 25mg/ml en succinato 20mM, pH 6,0 y, que opcionalmente, contiene polisorbato 80 (0,001%), se la sometió a varios regímenes de congelamiento-descongelamiento y a cero, uno, cinco, o 10 ciclos del régimen. Los regímenes fueron congelamiento rápido/descongelamiento rápido (FF/FT), congelamiento rápido/descongelamiento lento (FF/ST), congelamiento lento/descongelamiento rápido (SF/FT), y congelamiento lento/descongelamiento lento (SF/ST). Después fue estudiado el porcentaje de especies HMV.

82

80

Estos datos demuestran que a 25 mg/ml, el anti-CD22 no es sensible al estrés de congelamiento/descongelamiento, sin importar la presencia de polisorbato 80 (Fig. 16B y Fig. 16D). Sin embargo, a una concentración de 1 mg/ml, el anti-CD22 es sensible al congelamiento rápido (Fig. 16A y Fig. 16C). Por lo cual, para este anticuerpo, si la muestra va a ser sometida a ciclos de congelamiento-descongelamiento, una mayor concentración de almacenamiento debiera ser seleccionada a pesar de que no es necesario incluir un surfactante.

Estabilidad al Almacenamiento

Las Figs. 5 y 6, muestran los resultados de experimentos que demuestran que el anti-CD22 es estable desde -80°C hasta 5°C a 0,5 mg/ml y a 30 mg/ml. A 40°C, el porcentaje de especies de alto peso molecular aumentó en la muestra que contiene la mayor concentración de proteína después de dos semanas de almacenamiento (Fig. 6), mientras que no se detectó cambio en el porcentaje de especies de alto peso molecular, en muestras que contienen bajas concentraciones de proteína (Fig. 5).

Ejemplo 5: Efecto de Surfactantes

Muchos protocolos para almacenar muestras de proteína llaman a la incorporación de un surfactante. Por lo cual se investigó, la necesidad de incluir el surfactante en la formulación en almacenamiento. En estos experimentos, el

81.

anticuerpo anti-Lewis Y a una concentración de 1mg/ml o 30mg/ml en un tampón de citrato de sodio 10mM y, que opcionalmente, contiene 0%, 0,001%, 0,005%, o 0,01% de polisorbato 80, fueron incubadas con agitación a 360 rpm a temperatura ambiente por 24 horas. Luego fue estudiado el porcentaje de recuperación de monómero utilizando SEC-HPLC.

Los datos demuestran que el polisorbato 80 no es requerido cuando la proteína en la formulación está presente a una concentración relativamente alta, 30 mg/ml. A 1 mg/ml, el polisorbato 80 no proveyó protección alguna para el anti-Lewis Y contra el estrés por agitación (Fig. 17A y Fig. 17B).

Estabilidad al Congelamiento/descongelamiento

Se examinó el efecto del polisorbato 80 sobre la estabilidad de anti-Lewis Y durante varias condiciones de congelamiento/descongelamiento. En estos experimentos, fueron preparadas las muestras ya sea de 1mg/ml o de 30mg/ml de anti-Lewis Y anticuerpo en citrato de sodio 10mM, pH 5,5, y que contenían ya sea nada de polisorbato 80 o un 0,01% de polisorbato 80. Luego las muestras fueron sometidas a 10 ciclos de congelamiento/descongelamiento como se ha descrito antes.

A una concentración de 30 mg/ml, el anti-Lewis Y no fue sensible a estrés de congelamiento/descongelamiento sin importar la presencia de surfactante (Fig. 18B). También, el anti-Lewis Y fue estable bajo condiciones de congelamiento lento sin importar la concentración de proteína o las

condiciones de descongelamiento (Fig. 18A y Fig. 18B). El polisorbato 80 no afecta los resultados a 30mg/ml de concentración de proteína o si se utiliza congelamiento lento. El muestras que contienen 1mg/ml de anticuerpo, el polisorbato 80 protege al anti-Lewis Y frente a las condiciones de congelamiento rápido (Fig. 18A).

Estabilidad al Almacenamiento

Se investigó el efecto del surfactante sobre la estabilidad al almacenamiento de anti-Lewis Y. En estos experimentos, se prepararon muestras que contienen 30mg/ml anti-Lewis Y en citrato de sodio 10mM, pH 5,5 y NaCl 75mM. Además, las muestras tenían ya sea 0,001% de polisorbato 80 o no contenían polisorbato 80. Las muestras fueron incubadas a -80°C, -20°C, 5°C, 25°C, o 40°C por un mes, dos meses, tres meses, seis meses, o nueve meses y el porcentaje especie de alto peso molecular, porcentaje especies de bajo peso molecular, y el porcentaje de especies ácidas fueron estudiados de acuerdo a lo que se describe aquí.

En general, estos experimentos demuestran que el polisorbato 80 no tiene efecto significativo sobre la estabilidad de anti-Lewis Y bajo las condiciones de ensayo a lo largo del rango completo de temperaturas, desde -80°C hasta 40°C (Figs. 19A, 19B, y 19C).

En general, los resultados de los experimentos con anti-Lewis Y demuestran que a una concentración de 30 mg/ml, el

anti-Lewis Y es estable bajo condiciones de agitación y condiciones de estrés de congelamiento/descongelamiento. El surfactante no es necesario para efectuar esta estabilidad. A una concentración de 1 mg/ml, el anti-Lewis es estable bajo condiciones de congelamiento lento. El surfactante no es necesario para efectuar esta condición. Además, a una anticuerpo concentración de 1 mg/ml, el polisorbato 80 protege al anti-Lewis Y contra la desnaturación inducida por ambos la agitación y el congelamiento rápido, y, en general, el surfactante no tiene un efecto importante sobre la estabilidad de la proteína durante el almacenamiento.

En contraste con los resultados con el anti-Lewis Y, el polisorbato 80 no es completamente protector para el anti-CD22 contra el estrés por agitación (Fig. 13). Sin embargo, como se indica en los datos de la Fig. 16, a 25 mg/ml, el anti-CD22 es estable sometido a estrés de congelamiento/descongelamiento y no se necesita surfactante. A 1 mg/ml, el anti-CD22 es estable bajo condiciones de congelamiento lento y no se necesita surfactante. El surfactante provee protección adicional al anti-CD22 solo bajo condiciones de congelamiento rápido.

Para además investigar los efectos del surfactante sobre anti-CD22, se realizó un estudio de seis meses de la estabilidad de anti-CD22. En estos experimentos, se preparó anti-CD22 a una concentración de 25mg/ml en succinato 20mM, pH 6,0 (S); succinato 20mM, metionina 10mM, pH 6,0 (SM); succinato

20mM, polisorbato 80 al 0,01%, pH 6,0 (ST); o succinato 20mM, metionina 10mM, polisorbato 80 al 0,01%, pH 6,0 (SMT); y se incubó por seis meses a -80°C, 2-8°C, 25°C, o 40°C. Las muestras se estudiaron en cuanto al porcentaje de especies de alto peso molecular, porcentaje del área total del pico (lo cual es un indicio de la recuperación), y porcentaje de especies completamente activas. Nótese que el pico 5 corresponde a las especies completamente activas.

En general, ninguno de los parámetros muestra algún efecto importante sobre la estabilidad de anti-CD22 (Fig. 20A, Fig. 20B, y Fig. 20C).

En general, ambos los datos de almacenamiento de corto plazo y los datos de almacenamiento de largo plazo para dos anticuerpos diferentes (un anti-Lewis Y y un anti-CD22) demuestran que el surfactante (polisorbato 80) no es necesario para la estabilización de anticuerpos en un formulación de almacenamiento.

Ejemplo 6: Formulación de Anti-5T4 para almacenamiento

Como otro ejemplo para determinar una formulación para almacenamiento de una proteína, los parámetros de la concentración de sal, pH, concentración de proteína y tipo de tampón y la concentración fueron estudiados para el almacenamiento de un anticuerpo dirigido contra 5T4.

pH

Para identificar un pH ventajoso a ser utilizado en una formulación para almacenamiento de un anticuerpo anti-5T4, las muestras que contienen 1mg/ml de anti-5T4 se estudiaron a un rango de pH desde pH 4,0 hasta un pH 8,0. Las muestras se prepararon por medio de diálisis en cada tampón de pH. Todas las formulaciones utilizadas en estos experimentos emplearon un tampón fosfato de sodio 10mM con o sin NaCl 150mM. La proteína en la formulación fue filtrada estéril y colocada en un congelador a -80°C, o en una cámara de estabilidad mantenida a 5°C, 25°C, o 40°C. Luego las muestras fueron estudiadas para la presencia de especies de alto peso molecular (HMW) (Fig. 21).

Se encontró que anti-5T4 tiene la menor cantidad de especies de alto peso molecular en ausencia de NaCl a 5°C, 25°C, y 40°C a lo largo del rango de pH completo cuando está en tampón fosfato de sodio 10mM. El anticuerpo no fue estable a una ciclo de congelamiento/descongelamiento a pH 7 en una formulación que contiene NaCl y a un pH 8 con fosfato de sodio como el tampón. También, se observó que la proteína era inestable a pH 4 con NaCl 150mM a 40°C.

Se realizó enfoque isoeléctrico(IEF) en muestras preparadas y almacenadas a los diversos pH (como se ha descrito antes) y almacenadas a 40°C por dos semanas. Se encontró que las muestras almacenadas en una formulación a pH 4 (sin NaCl) y a pH 5 y pH 6 (con o sin NaCl) reflejaron la menor cantidad de cambio en la carga total de proteína.

También se realizó el análisis SDS-PAGE de anti-5T4 un estudio de pH de las muestras almacenadas a 40°C por dos semanas. Las muestras en el rango de pH de pH 5,0 hasta un pH 7,0 reflejaron una menor cantidad de especies de alto peso molecular en el gel no-reducido y la menor cantidad de cambio en el peso molecular de la proteína comparado con el material de partida en un gel reducido.

Estos datos demuestran que el anti-5T4 es estable en fosfato de sodio 10mM en presencia o ausencia de NaCl a -80°C, 5°C, y 25°C a lo largo del rango de pH desde pH 4,0 hasta un pH 7,0. Basado en los resultados acelerados (es decir, resultados obtenidos a temperaturas superiores) del estudio de pH, desde pH 5 hasta un pH 6 es seleccionado como el rango de pH ventajoso para la estabilidad de anti-5T4.

Tampones

Cuatro diferentes sistemas de tampón fueron probados para el almacenamiento estable de anti-5T4 en formulaciones en el rango de pH desde 5,0 hasta 7,0. También fue evaluado el efecto de la fuerza iónica sobre la estabilidad. Estos sistemas de tampón utilizados fueron acetato de sodio 10mM, pH 5,0; acetato de sodio 10mM pH 5,5; acetato de sodio 10mM, NaCl 150mM, pH 5,0; acetato de sodio 10mM, NaCl 150mM, pH 5,5; citrato de sodio 10mM, pH 5,0; citrato de sodio 10mM pH 5,5, citrato de sodio 10mM, pH 6,0; citrato de sodio 10mM, NaCl 150mM, pH 5,0; citrato de sodio 10mM, NaCl 150mM, pH 5,5;

citrato de sodio 10mM, NaCl 150mM, pH 6,0; fosfato de sodio 10mM, pH 6,0; fosfato de sodio 10mM, pH 6,5; fosfato de sodio 10mM, pH 7,0; fosfato de sodio 10mM, NaCl 150mM, pH 6,0; fosfato de sodio 10mM, NaCl 150mM, pH 6,5; fosfato de sodio 10mM, NaCl 150mM, pH 7,0; succinato de sodio 10mM, pH 5,0; succinato de sodio 10mM, pH 5,5; succinato de sodio 10mM, pH 6,0; succinato de sodio 10mM, pH 6,5; succinato de sodio 10mM, NaCl 150mM, pH 5,0; succinato de sodio 10mM, NaCl 150mM, pH 5,5; succinato de sodio 10mM, NaCl 150mM, pH 6,0; y succinato de sodio 10mM, NaCl 150mM, pH 6,5.

El anti-5T4 fue dializado en los tampones anteriores y diluido a una concentración final de 2 mg/ml. Las muestras se almacenaron a -80°C y 40°C por hasta cuatro semanas, luego se analizaron utilizando los SEC-HPLC de las muestras iniciales (antes del almacenamiento) y después del almacenamiento por cuatro semanas. En estos datos (Fig. 22), se encontró que las especies de alto peso molecular no correspondían a los productos de mayor degradación y el porcentaje de especies de alto peso molecular en cada formulación después de cuatro semanas de almacenamiento era comparable a, o menor que, el porcentaje de especies de alto peso molecular presentes en las muestras iniciales. Las especies de bajo peso molecular se vieron aumentadas en muchas de las formulaciones que contienen NaCl.

Las fundiciones térmicas (T_m s) se realizaron para evaluar el efecto de almacenamiento en varias formulaciones

sobre la estabilidad térmica de una proteína (anti-5T4). La Calorimetría diferencial de barrido (DSC) se utilizó para generar termogramas. Ejemplos de tales termogramas se muestran en la Fig. 23A). Los resultados de la calorimetría diferencial de barrido se ilustran en la Fig. 23B.

Las proteínas en las formulaciones que tienen un pH de 5,0 fueron las menos estables térmicamente cuando la formulación utiliza citrato o succinato como el tampón. Se encontró que el NaCl es térmicamente desestabilizador debido a que los valores T_m fueron menores a cada condición pH/tampón al compararlas con sus correspondientes formulaciones libres de NaCl. Todas las otras formulaciones en el rango de pH desde 5,5 hasta 7,0 en tampones de acetato, citrato, succinato, y fosfato exhibieron los mayores T_m s y por lo tanto la mayor estabilidad térmica.

También se utilizó CEX-HPLC para analizar la estabilidad de anti-5T4. En estos estudios, se realizó CEX-HPLC en muestras después del almacenamiento por cuatro semanas a 40°C. Estos resultados se encuentran ilustrados en la Fig. 25 y demuestran un incremento en el porcentaje de especies ácidas y una disminución en el porcentaje de especies básicas a un pH mayor para los cuatro tampones estudiados. Algunas de las formulaciones que contienen NaCl también tuvieron mayores niveles de especies ácidas y menores niveles de especies básicas respecto de las correspondientes formulaciones libres de NaCl.

Para analizar además la estabilidad de las varias formulaciones, se realizó una SDS-PAGE reductora en las muestras después del almacenamiento por cuatro semanas a 40°C. El análisis de estas muestras demuestra que las muestras almacenadas en formulaciones de pH 5,5 y pH 6,0 retuvieron la menor cantidad de cambio en el peso molecular de la proteína al compararlo con el material de partida en el gel reductor.

En general, estos datos demuestran que la proteína anti-5T4 utilizada en estos experimentos tiene una estabilidad similar en los cuatro tampones probados (acetato de sodio, citrato de sodio, fosfato de sodio, y succinato de sodio) cuando se almacenan a un pH de 5,5-6,5. Un estudio de estabilidad acelerada mostró que la menor cantidad de especies de bajo peso molecular se formaron en las formulaciones que no contienen NaCl.

Efecto de sal (NaCl)

Como se ilustra anteriormente, el anti-5T4 es estable en fosfato de sodio 10mM en formulaciones a pH 5-6 a -80°C, 5°C, y 25°C en NaCl 150mM. Sin embargo, el NaCl no mejoró la estabilidad y por lo cual no provee de beneficio a la estabilidad (Fig. 21).

Los resultados de un estudio de estabilidad acelerada a 40°C demuestran que el NaCl promueve la formación de alto peso molecular y de bajo peso molecular y disminuye la

estabilidad térmica del anticuerpo (Fig. 22, Fig. 24A, Fig. 24B, y Fig. 25).

Concentración de Anticuerpo

Se examinaron, los efectos de la concentración de anticuerpo (proteína) en la estabilidad en el almacenamiento. En estos experimentos, los sistemas de tampón de acetato de sodio, citrato de sodio, y tampón succinato de sodio fueron nuevamente probados utilizando un estrecho rango de pH; desde 5,5 hasta 6,5. Se dializó el anti-5T4 en los tampones y se diluyó a una concentración final de 2 mg/ml. UN conjunto de muestras adicional se preparó con una concentración de 30mg/ml en citrato o succinato. Las muestras fueron almacenadas a -80°C y 40°C por hasta seis semanas, y luego fueron analizadas. Las Fig. 26A y Fig. 26B ilustran los resultados del análisis SEC-HPLC de estas muestras. En general, estos datos demuestran que se observa estabilidad comparable para las formulaciones de 2mg/ml y 30mg/ml, a pesar de que la mayor concentración de proteína acumuló una cantidad levemente mayor de especies de alto peso molecular después de seis semanas a 40°C.

También se realizó CEX-HPLC en estas muestras después de 6 semanas de almacenamiento a 40°C. Se observó estabilidad comparable para las formulaciones de pH 5,5 que contienen 2mg/ml o 30 mg/ml, a pesar que a pH 5,5 las muestras de 2mg/ml tienen un porcentaje levemente menor de especies ácidas después del almacenamiento por seis semanas a 40°C (Fig. 27A y 27B).

91

También se utilizó electroforesis de capilar SDS (ceSDS; un método equivalente a SDS-PAGE) para el análisis de muestras de 2mg/ml que fueron almacenadas por seis semanas a 40°C. En estos experimentos, se observó una estabilidad cercanamente comparable para las muestras de 2mg/ml, con las muestras de pH 5,5 mostrando un cambio levemente menor en el peso molecular de la proteína. Se observa estabilidad comparable para las muestras de 2mg/ml con las muestras de pH 5,5 mostrando un cambio levemente menor en el peso molecular (PM) de la proteína por electroforesis de capilar método SDS (método equivalente a SDS-PAGE) (Fig. 28).

Estabilidad al congelamiento/descongelamiento y agitación

Se evaluaron los sistemas de tampón de acetato de sodio, citrato de sodio, y succinato de sodio en un estudio de estabilidad de proteína bajo condiciones de congelamiento/descongelamiento y estudio de agitación a pH 5,5 en presencia o ausencia de polisorbato 80 al 0,005% derivado de planta y sacarosa al 3%. En estos experimentos, el anti-5T4 fue dializado en los tampones y diluido hasta concentraciones finales de 25mg/ml y de 1 mg/ml. Las muestras fueron congeladas en nitrógeno líquido (alrededor de -196°C o a -80°C y luego descongeladas a 37°C o a temperatura ambiente. UN conjunto de muestras separadas se agitó a 200 rpm por 24 horas, a 20°C.

Se probó la turbidez después de un ciclo de congelamiento/descongelamiento midiendo la absorbancia a A_{400} , y

97

se determinó el porcentaje de especies de alto peso molecular para las muestras de 1mg/ml. Después de un ciclo de congelamiento/descongelamiento, el anti-5T4 fue levemente sensible a las condiciones de congelamiento lento (SF) (-80) a 1mg/ml y muy sensible a las condiciones de congelamiento rápido (FF) (nitrógeno líquido). El polisorbato 80 minimizó la turbidez y el porcentaje de especies de alto peso molecular se vio aumentado en muestras de 1mg/ml. La sacarosa mejoró (minimizó) la turbidez y en presencia de sacarosa, el porcentaje de especies de alto peso molecular aumentó solo bajo condiciones de congelamiento rápido condiciones (Fig. 29A y Fig. 29B).

La turbidez y el porcentaje de especies de alto peso molecular también fueron probadas después de múltiples ciclos (diez) de congelamiento/descongelamiento utilizando muestras con una concentración de proteína (anti-5T4) de 25 mg/ml. (Fig. 30A y Fig. 30B). Estos datos demuestran que el anti-5T4 no es sensible al estrés de congelamiento/descongelamiento a una concentración de 25 mg/ml. Solo hay un leve descenso en la turbidez y el porcentaje de especies de alto peso molecular con la adición de polisorbato 80 y/o sacarosa después de diez ciclos de congelamiento/descongelamiento. Los resultados de la turbidez también demuestran que no hay beneficio, y en algunos casos esto fue perjudicial, para la estabilidad de anti-5T4 cuando se agrega sacarosa a una formulación. El uso del tampón acetato en una formulación resultó en una turbidez levemente

menor y en una menor porcentaje de especies de alto peso molecular bajo muchas condiciones de congelamiento/descongelamiento.

La estabilidad bajo condiciones de agitación fue probada midiendo la turbidez (A_{490}) y el porcentaje de especies de alto peso molecular utilizando las formulaciones que contienen 25mg/ml de anti-5T4. Las Fig. 31A y Fig. 31B ilustran los resultados de las mediciones de turbidez de muestras en varias formulaciones. Estos datos demuestran que el anti-5T4 es muy sensible al estrés e la agitación en una formulación que contiene tampón citrato. Existe una disminución en la turbidez y el porcentaje de especies de alto peso molecular en algunas formulaciones con la adición de polisorbato 80 con ambas muestras de 1mg/ml y de 25mg/ml, Pero no hay beneficio al agregar sacarosa a las formulaciones. Las formulaciones de tampón acetato generalmente exhiben la menor turbidez.

Surfactante y Crioprotector

Algunos de los experimentos descritos supra (por ejemplo, aquellos ilustrados en la Fig. 29A, Fig. 29B, Fig. 30A, Fig. 30B, Fig. 31A, y Fig. 31B) incluyen datos en los cuales la formulación incluye un surfactante (polisorbato 80) y/o un crioprotector (sacarosa). Con respecto de la estabilidad después de congelar, las muestras que contienen 25mg/ml de anti-5T4 no fueron sensibles al estrés de congelamiento/descongelamiento. El anti-5T4 fue estable bajo

condiciones de congelamiento lento sin importar la concentración de proteína o la condición de descongelamiento. El polisorbato 80 no fue necesario para mejorar la estabilidad de muestras de 25mg/ml de concentración de proteína cuando se aplica un protocolo de descongelamiento rápido.

La adición de sacarosa a una formulación no mejoró la estabilidad para aquellas muestras que contienen 25mg/ml de anti-5T4. Para muestras que contienen 1 mg/ml, polisorbato 80 y sacarosa protegieron al anti-5T4 durante al congelamiento/descongelamiento, particularmente bajo condiciones de congelamiento rápido (Fig. 29A y Fig. 29B y Fig. 30A y Fig. 30B).

También se analizó la estabilidad de anti-5T4 en varias formulaciones bajo condiciones de agitación. El polisorbato 80 contribuyó a la minimización de la turbidez y la minimización del porcentaje de las especies de alto peso molecular de las formulaciones de anti-5T4 a una concentración de proteína de 25mg/ml cuando la proteína es agitada a valores de rpm extremadamente altos. En formulaciones que contienen 1mg/ml de anti-5T4, el polisorbato 80 protegió a la proteína frente al estrés por agitación (Fig. 31A y Fig. 31B).

Estos datos demuestran que para concentraciones de proteína mayores (por ejemplo, 25 mg/ml), el anti-5T4 es estable bajo estrés de congelamiento/descongelamiento. Hubo un poco o nada de beneficio al agregar surfactante a una formulación bajo muchas condiciones de

95

congelamiento/descongelamiento, particularmente en formulaciones que contienen tampón acetato. Además, no hay necesidad de usar un crioprotector (por ejemplo, sacarosa) en las formulaciones. El polisorbato 80 fue útil para estabilizar el anti-5T4 bajo condiciones de agitación severa.

Además, se encontró que muestras que contienen bajas concentraciones de proteína (por ejemplo, 1mg/ml de anti-5T4) eran estables bajo condiciones de congelamiento lento. En muestras de tan baja cantidad de proteína, el polisorbato 80 y la sacarosa protegieron a la proteína (anti-5T4) contra la desnaturación inducida por congelamiento/descongelamiento. Incluso, en las muestras de baja concentración de proteína, el polisorbato 80 protegió a la proteína contra la desnaturación inducida por agitación.

Otras Modalidades

Se debe entender que mientras la invención ha sido descrita en conjunto con la descripción detallada de la misma, se pretende que la descripción anterior ilustre y no limite el espectro de la invención, el cual está definido por el espectro de las reivindicaciones anexas. Otros aspectos, ventajas, y modificaciones están comprendidos dentro del espectro de las siguientes cláusulas.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación, CARACTERIZADA porque comprende

- (a) una proteína aislada; y
- (b) una solución acuosa que tiene pH desde 4,0 hasta un pH de 8,0,

en donde la formulación no contiene un crioprotector o surfactante, y la proteína es estable por al menos 3 semanas desde una temperatura de -80°C hasta 8°C.

2. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la formulación comprende menos de 150mM de sal.

3. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la proteína es un anticuerpo.

4. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la proteína es un anticuerpo policlonal.

5. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la proteína es un anticuerpo monoclonal.

6. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la proteína es un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo Y anti-Lewis o un anticuerpo anti-5T4.

7. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la proteína es una proteína recombinante.

8. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la proteína es una proteína terapéutica.

9. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la solución acuosa es agua estéril.

10. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la solución acuosa además comprende un tampón.

98

11. La formulación de acuerdo a la reivindicación 10, CARACTERIZADA porque el tampón es un tampón acetato, tampón succinato, tampón fosfato, o tampón citrato.

12. La formulación de acuerdo a la reivindicación 10, CARACTERIZADA porque la concentración del tampón es desde alrededor de 0mM hasta 150mM.

13. La formulación de acuerdo a la reivindicación 10, CARACTERIZADA porque la concentración del tampón es desde alrededor de 50mM hasta 100mM.

14. La formulación de acuerdo a la reivindicación 10, CARACTERIZADA porque la concentración del tampón es desde alrededor de 1mM hasta 50mM.

15. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la proteína es estable por al menos 1 año a 5°C o la proteína es estable por al menos 3 años a 5°C.

101

99

16. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la proteína está presente a una concentración desde alrededor de 1mg/ml hasta alrededor de 200 mg/ml, desde alrededor de 1mg/ml hasta alrededor de 100 mg/ml, desde alrededor de 20mg/ml hasta alrededor de 200 mg/ml, o desde alrededor de 20mg/ml hasta alrededor de 100 mg/ml.

17. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la proteína está presente a una concentración desde alrededor de 10mg/ml hasta alrededor de 30 mg/ml, desde alrededor de 25mg/ml hasta alrededor de 30 mg/ml, desde alrededor de 10mg/ml hasta alrededor de 50 mg/ml, o desde alrededor de 20mg/ml hasta alrededor de 50 mg/ml.

18. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la proteína tiene un valor de pI de al menos 6,0, 7,0, o 8,0.

19. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la formulación es almacenada desde alrededor de 0°C hasta alrededor de 8°C o desde alrededor de 0°C hasta alrededor de 5°C.

102

100

20. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque el pH de la formulación es desde alrededor de pH 5,0 hasta alrededor de pH 6,0.

21. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque el pH de la formulación es desde alrededor de pH 5,0 hasta alrededor de pH 6,0 y la formulación es almacenada a una temperatura desde alrededor de -80°C hasta 5°C.

22. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la proteína es un anticuerpo anti-CD22 humanizado y la solución acuosa tiene succinato a una concentración de alrededor de 20mM, pH 6,0.

23. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la proteína es un anticuerpo Y anti-Lewis y la solución acuosa es de citrato de sodio de una concentración de alrededor de 10mM, pH 5,5 y NaCl a alrededor de 75mM.

24. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la proteína es un anticuerpo anti-5T4 y la

103

101.

solución acuosa tiene acetato de sodio a una concentración de alrededor de 10mM Na, pH 5,5.

25. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la estabilidad es determinada probando al menos uno del porcentaje de especies de alto peso molecular, el porcentaje de especies de bajo peso molecular, o el porcentaje de especies ácidas respecto de un control.

26. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la proteína es purificada al menos en un 95%.

27. La formulación de acuerdo a la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la formulación es estéril.

28. Un método para almacenar una proteína, CARACTERIZADO porque el método comprende

(a) proveer una formulación de acuerdo a la reivindicación 1;

(b) colocar la formulación a una temperatura seleccionada; y

104

(c) mantener la formulación a la temperatura seleccionada, en la cual la proteína en la formulación es estable por al menos una semana.

29. El método de acuerdo a la reivindicación 28, CARACTERIZADO porque la proteína es estable por al menos un mes, tres meses, un año, cinco años, siete años, o diez años.

30. El método de acuerdo a la reivindicación 29, CARACTERIZADO porque la proteína es estable a una temperatura desde alrededor de -80°C o desde alrededor de 2°C hasta alrededor de 8°C .

31. El método de acuerdo a la reivindicación 28, CARACTERIZADO porque la proteína es almacenada a una temperatura de alrededor de -80°C y la proteína es estable por al menos cinco años, siete años, o diez años.

32. El método de acuerdo a la reivindicación 28, CARACTERIZADO porque la formulación es congelada a la temperatura seleccionada y después de la etapa (c), la proteína es rápidamente descongelada.

33. El método de acuerdo a la reivindicación 28, CARACTERIZADO porque la formulación es congelada en (b), y el congelamiento es congelamiento rápido.

34. El método de acuerdo a la reivindicación 28, CARACTERIZADO porque la proteína es un anticuerpo.

35. El método de acuerdo a la reivindicación 28, CARACTERIZADO porque la proteína es un anticuerpo monoclonal.

36. El método de acuerdo a la reivindicación 28, CARACTERIZADO porque la proteína es un anticuerpo anti-CD22 anticuerpo, un anticuerpo Y anti-Lewis o un anticuerpo anti-ST4.

37. El método de acuerdo a la reivindicación 34, CARACTERIZADO porque el anticuerpo es una sustancia intermediaria.

104

38. El método de acuerdo a la reivindicación 28, CARACTERIZADO porque la concentración de proteína es al menos 15 mg/ml, al menos 20 mg/ml, o al menos 30 mg/ml.

39. El método de acuerdo a la reivindicación 28, CARACTERIZADO porque frente a la recuperación desde el almacenamiento, la proteína tiene al menos el 70% de la actividad de una referencia.

40. El método de acuerdo a la reivindicación 28, CARACTERIZADO porque frente a la recuperación desde el almacenamiento, la formulación comprende menos que o lo mismo que un 5% de productos de alto peso molecular comparado con una referencia.

41. El método de acuerdo a la reivindicación 28, CARACTERIZADO porque frente a la recuperación desde el almacenamiento, la formulación comprende menos que o lo mismo que un 10% de productos de alto peso molecular y agregados comparado con una referencia.

107

105

42. Un método para determinar una formulación favorable para almacenar una proteína aislada seleccionada, CARACTERIZADO porque el método comprende:

- (a) proveer una proteína aislada seleccionada;
- (b) almacenar la proteína aislada seleccionada en una serie de formulaciones que comprenden una solución acuosa con un pH entre alrededor de 5,0 y alrededor de pH 8,0 y que comprende tampón a una concentración entre alrededor de 0mM hasta 150mM;
- (c) determinar al menos un parámetro de estabilidad;
- y
- (d) identificar una formulación en la cual la proteína es estable, en donde una formulación en la cual la proteína es estable es una formulación favorable para almacenar la proteína aislada seleccionada.

43. El método de acuerdo a la reivindicación 42, CARACTERIZADO porque una disminución en la estabilidad es indicada por un incremento en la cantidad de proteína de alto peso molecular en la muestra respecto de un control.

44. El método de acuerdo a la reivindicación 43, CARACTERIZADO porque una condición es seleccionada en la cual

108

no más que un 0,5%, 0,2%, o 0,1% de la proteína es una especie de alto peso molecular.

45. El método de acuerdo a la reivindicación 42, CARACTERIZADO porque el parámetro de estabilidad es ensayado para su actividad por medio de inmunoensayo ligado a enzima y la actividad es al menos 50% de un control o es al menos 80% de un control en una formulación estable.

46. El método de acuerdo a la reivindicación 42, CARACTERIZADO porque el parámetro de estabilidad es la presencia de la especie de alto peso molecular y una formulación estable comprende no más que un 5% de especie de alto peso molecular respecto de un control.

47. El método de acuerdo a la reivindicación 42, CARACTERIZADO porque el parámetro de estabilidad es la presencia de la especie de alto peso molecular y agregados de proteína, y una formulación estable comprende no más que un 10% de especies de alto peso molecular y agregados de proteína o no más que un 15% de especies de alto peso molecular y agregados de proteína combinados respecto de un control.

48. El método de acuerdo a la reivindicación 42, CARACTERIZADO porque el parámetro de estabilidad es la proporción de proteínas ácidas y básicas, y la proporción en una formulación estable no es más diferente que un 15% respecto de un control.

49. Un polipéptido, CARACTERIZADO porque es producido por un método que comprende almacenamiento en una formulación de acuerdo a la reivindicación 1.

50. El método de acuerdo a la reivindicación 49, CARACTERIZADO porque el polipéptido es una proteína.

51. El método de acuerdo a la reivindicación 49, CARACTERIZADO porque la proteína es un anticuerpo.

52. Un polipéptido para ser usado en la fabricación de una proteína modificada, CARACTERIZADO porque el polipéptido es almacenado en una formulación de acuerdo a la reivindicación 1.

68

53. El polipéptido de acuerdo a la reivindicación 52,
CARACTERIZADO porque el polipéptido es un anticuerpo.

54. El polipéptido de acuerdo a la reivindicación 52,
CARACTERIZADO porque el polipéptido es utilizado para elaborar
una proteína conjugada.

55. El polipéptido de acuerdo a la reivindicación 54,
CARACTERIZADO porque la proteína es conjugada a una toxina.

AAA

Figura 1A

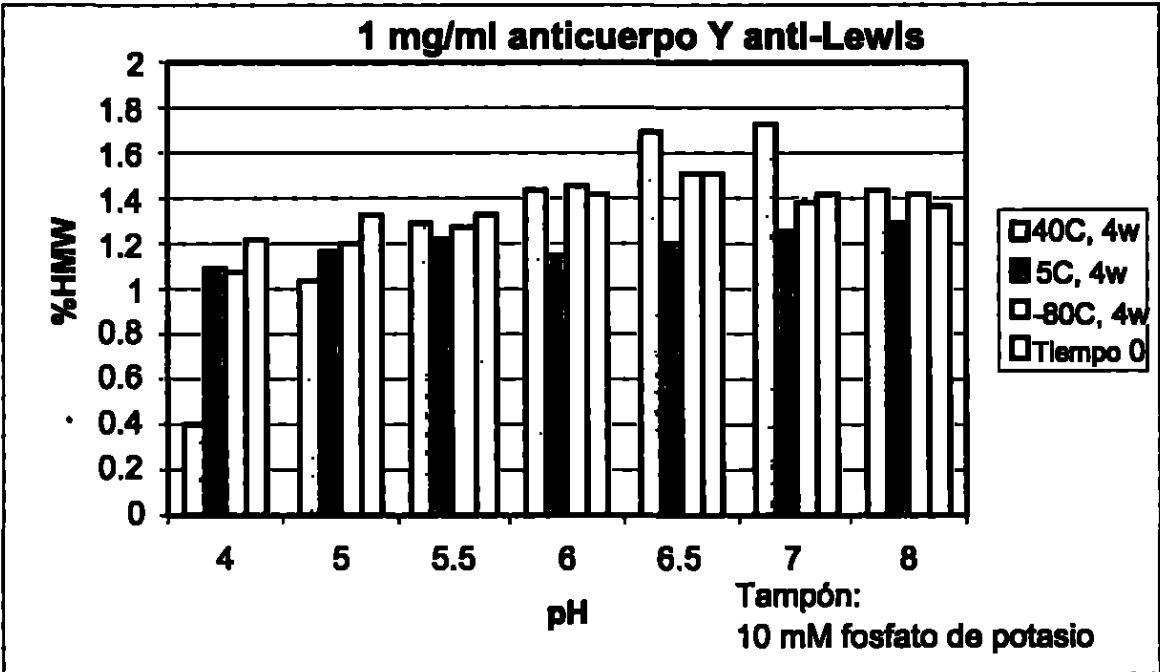


Figura 1B

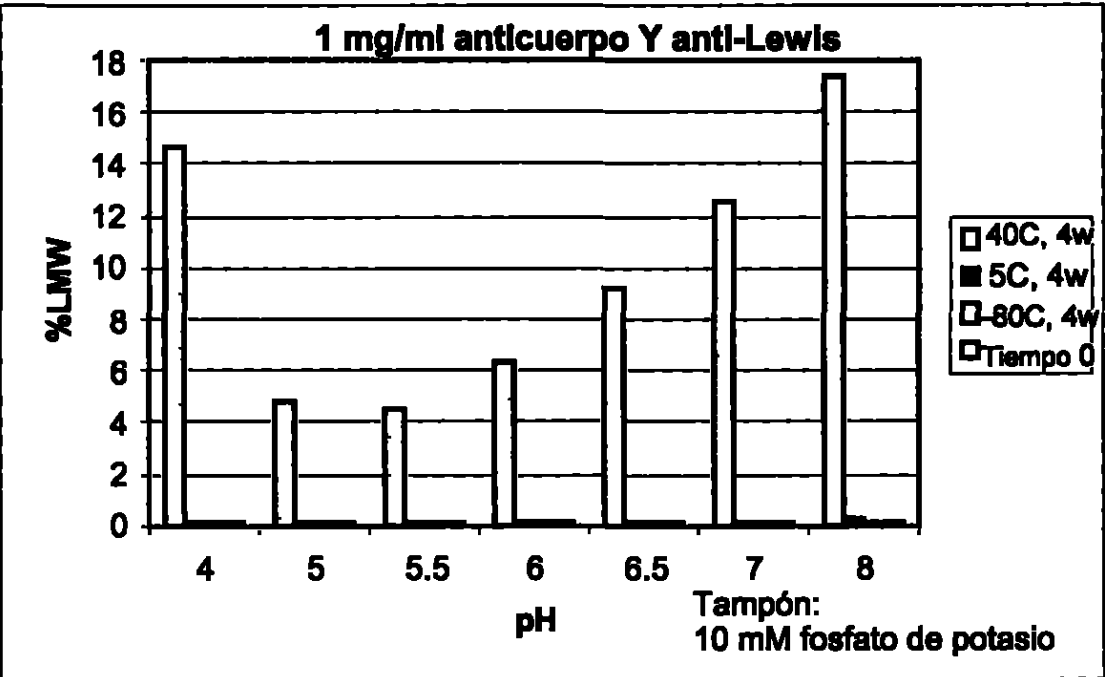


Figura 2

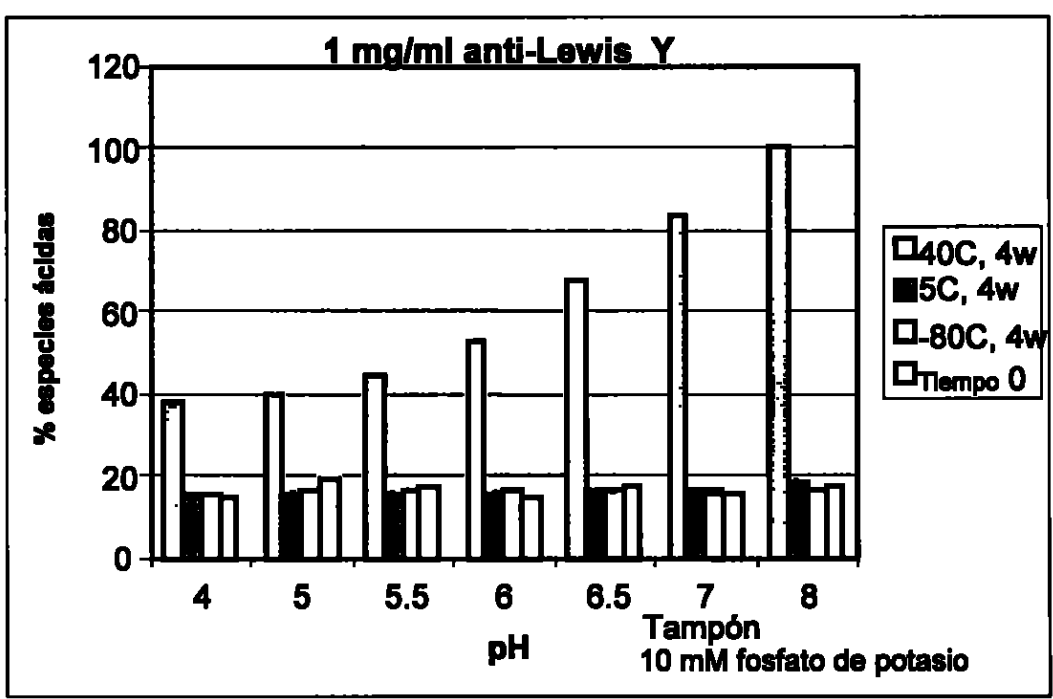
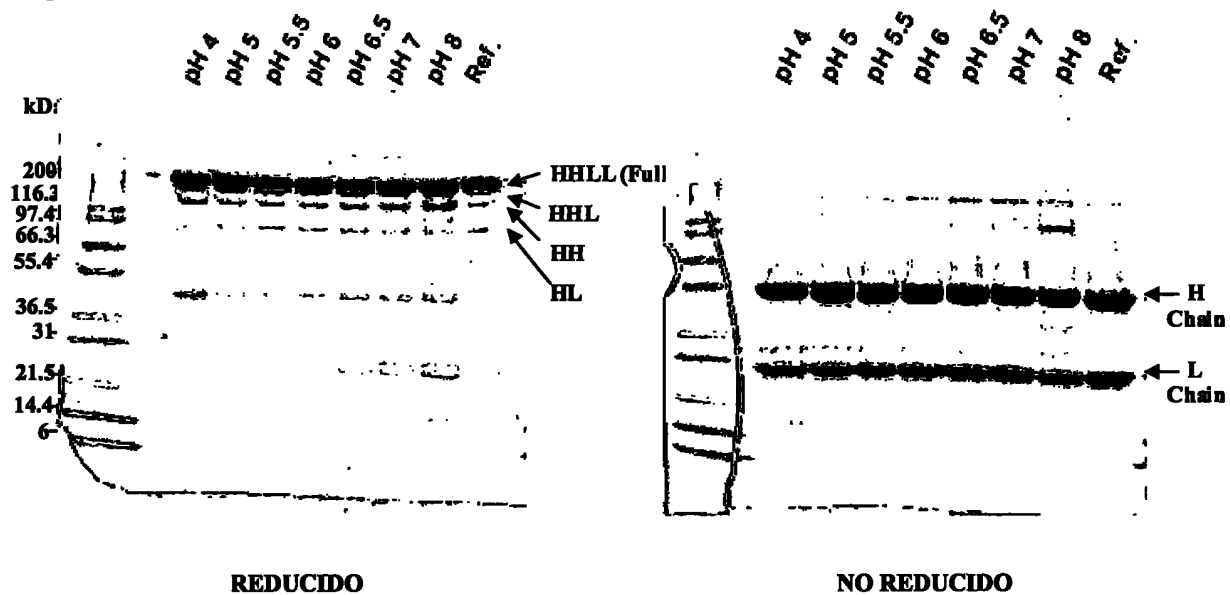


Figura 3



114

Figura 4

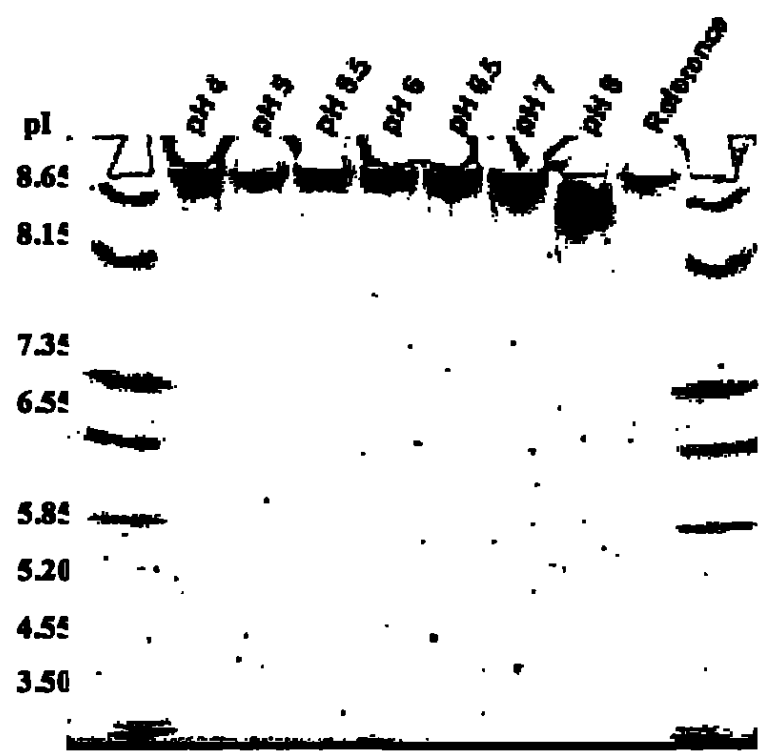


Figura 5

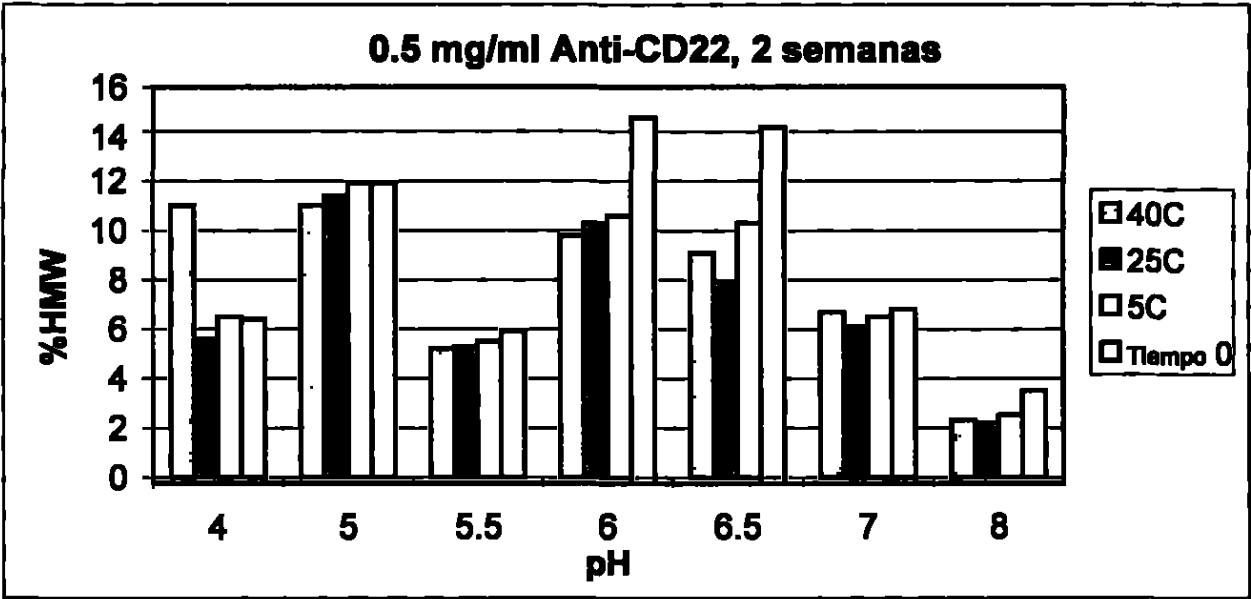
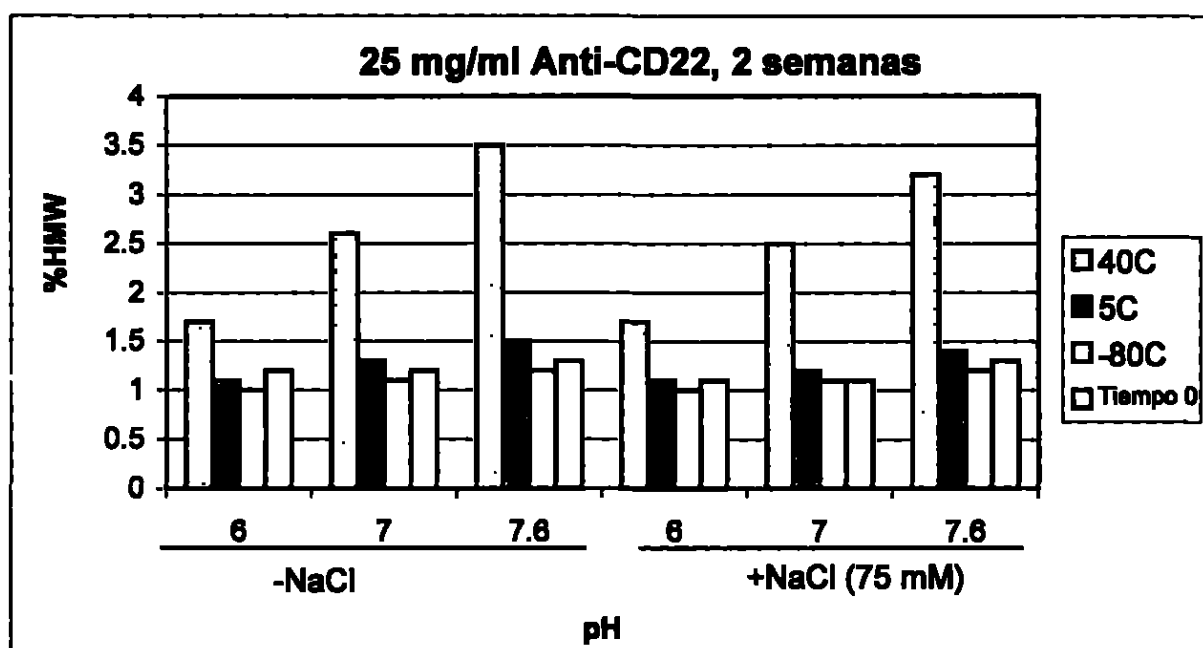


Figura 6



Tampones:
 pH6: succinato 50 mM
 pH7: succinato 50 mM
 HEPES 50 mM

Figura 7A

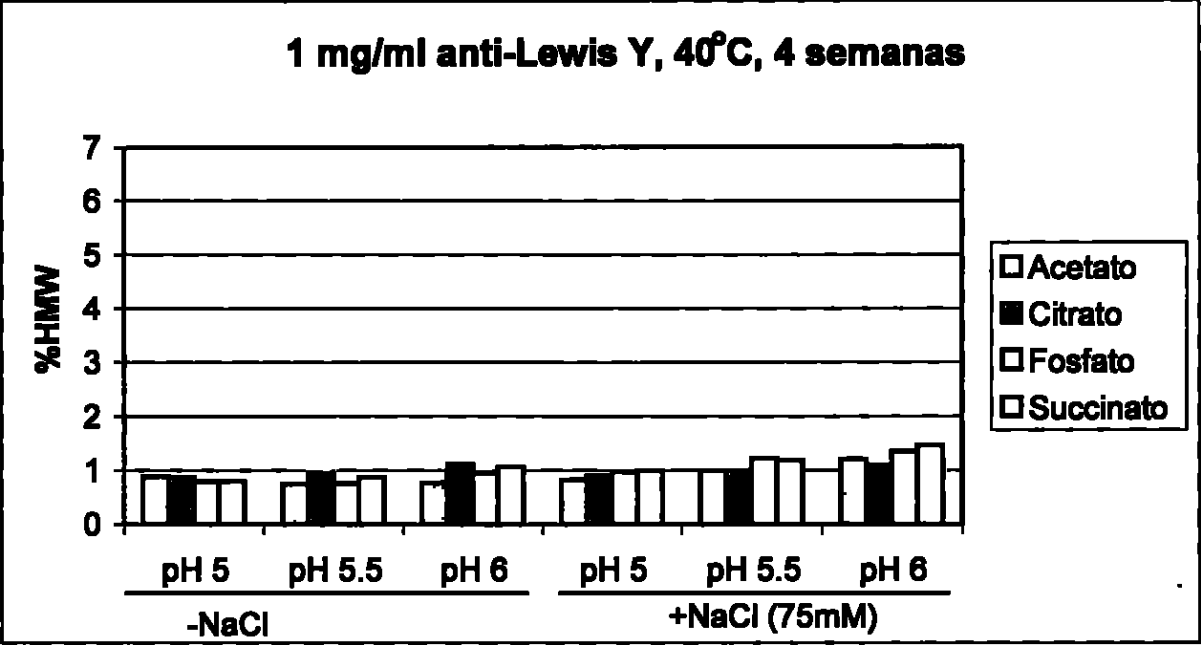


Figura 7B

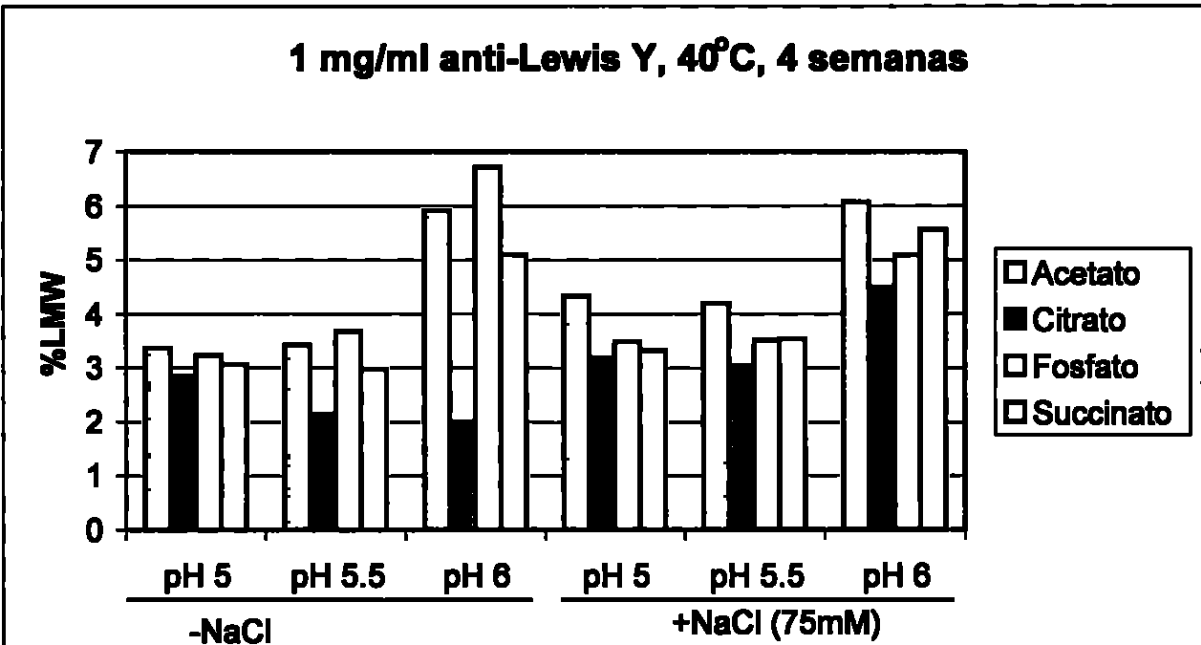


Figura 8

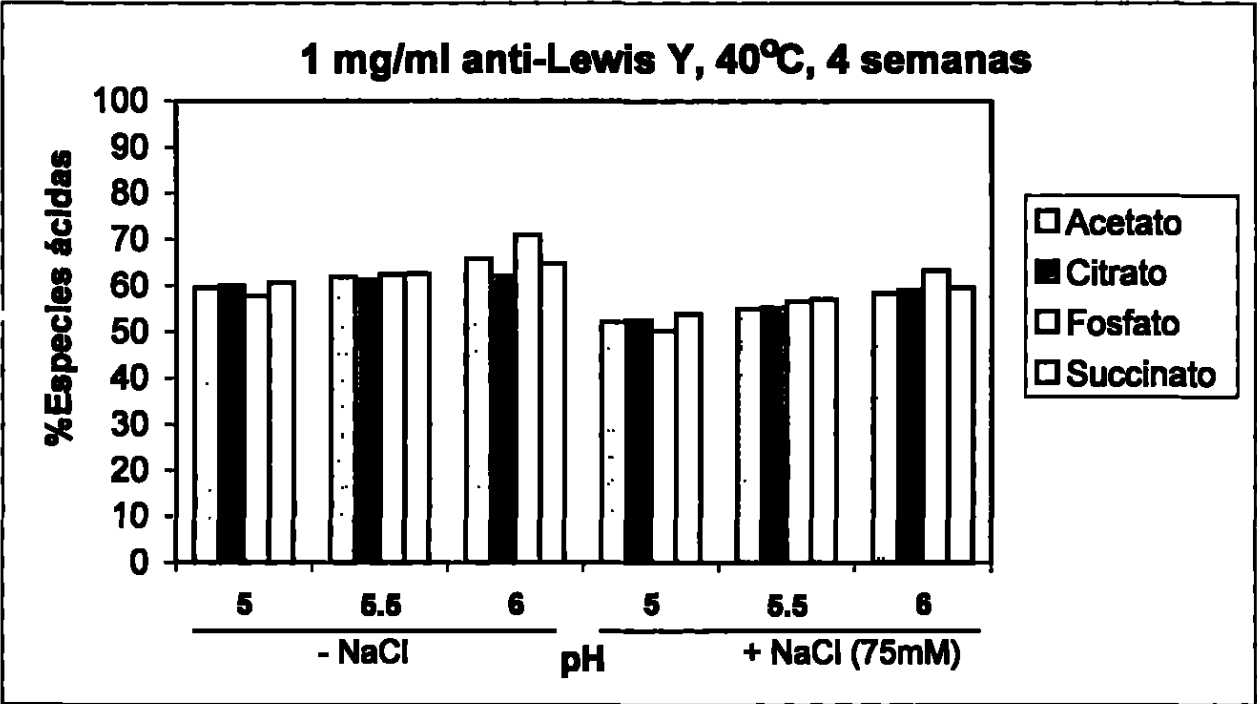


Figura 9A

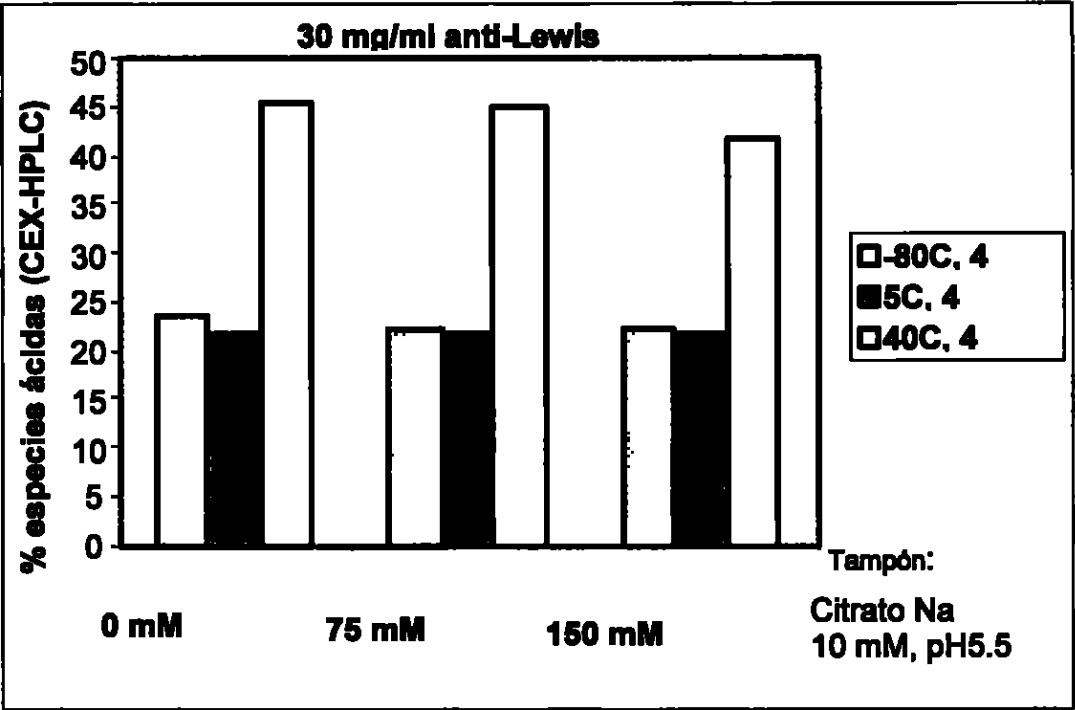


Figura 9B

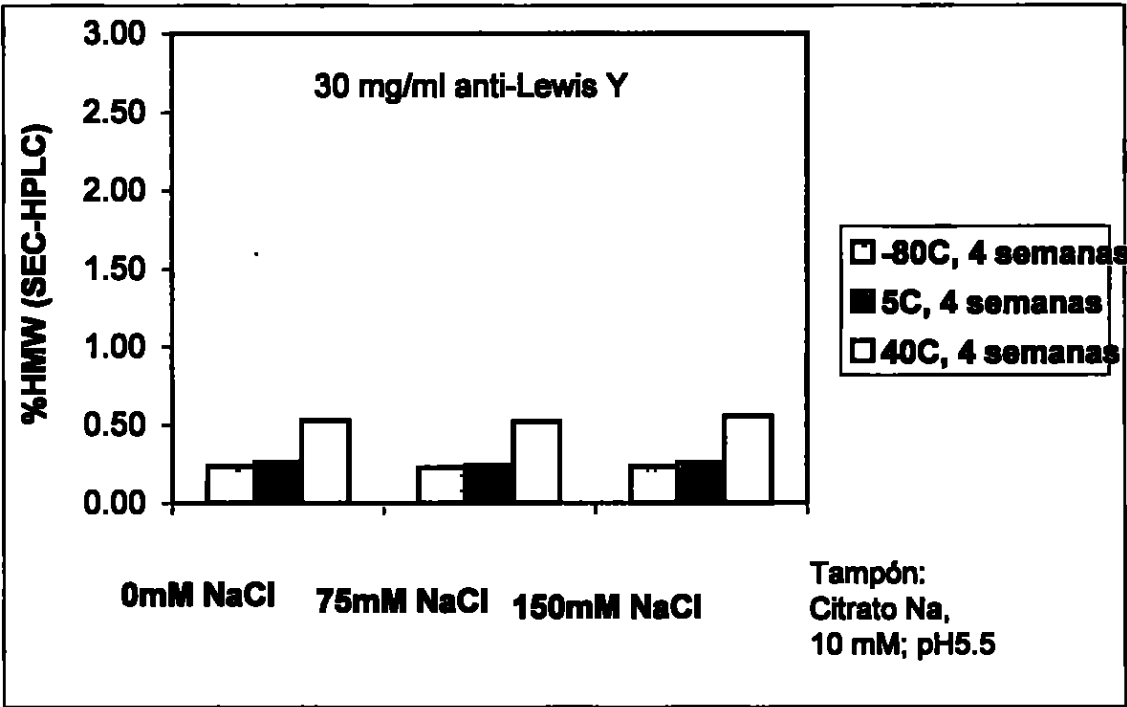


Figura 9C

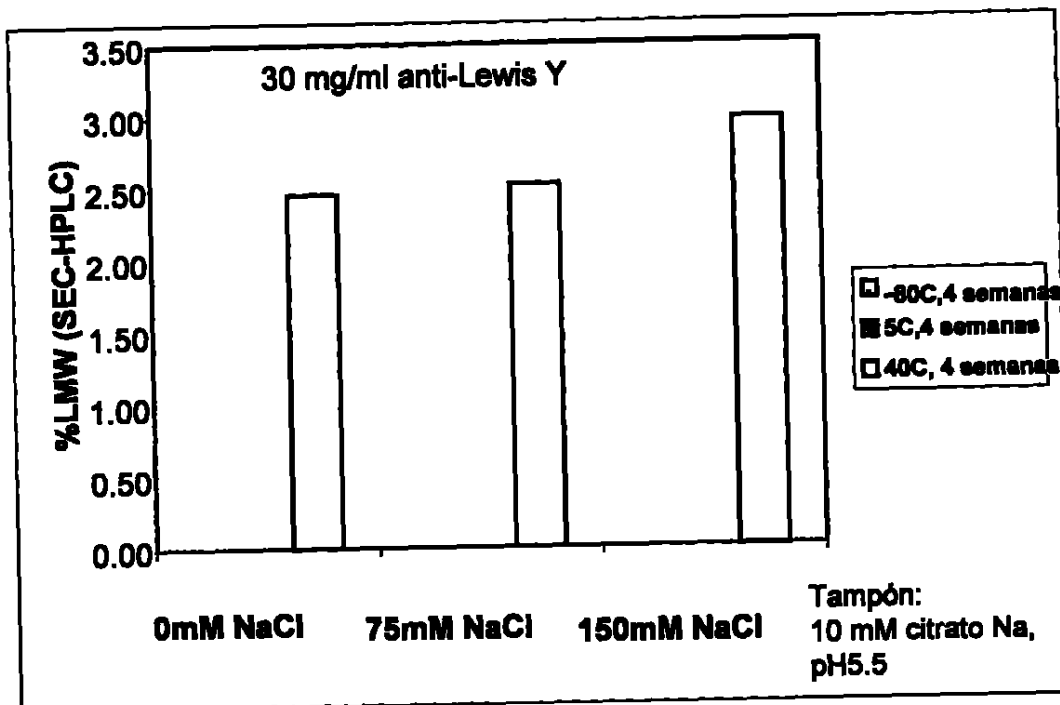


Figura 10

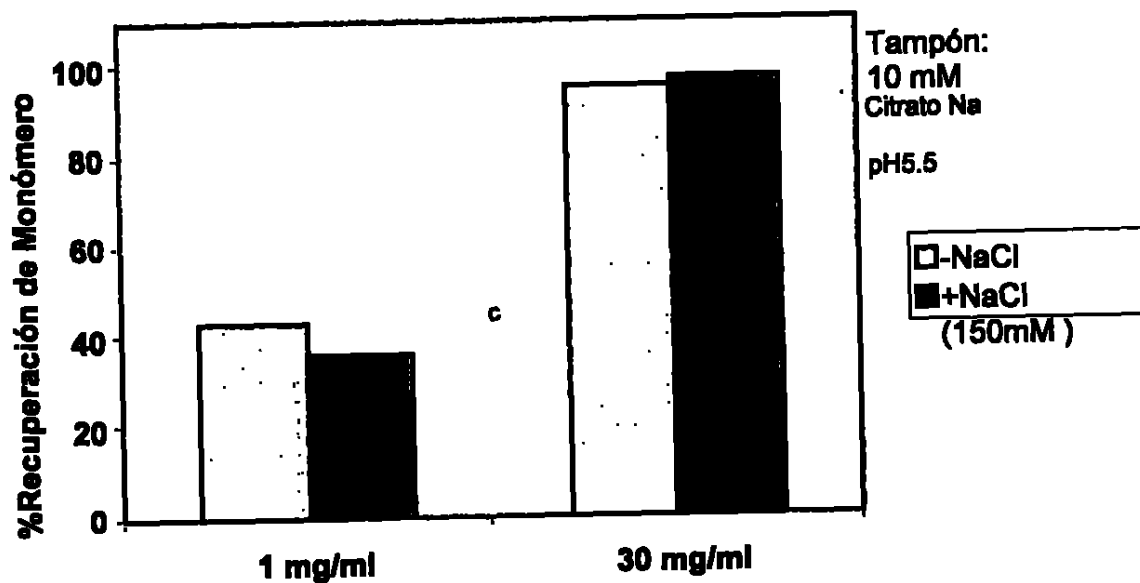


Figura 11A

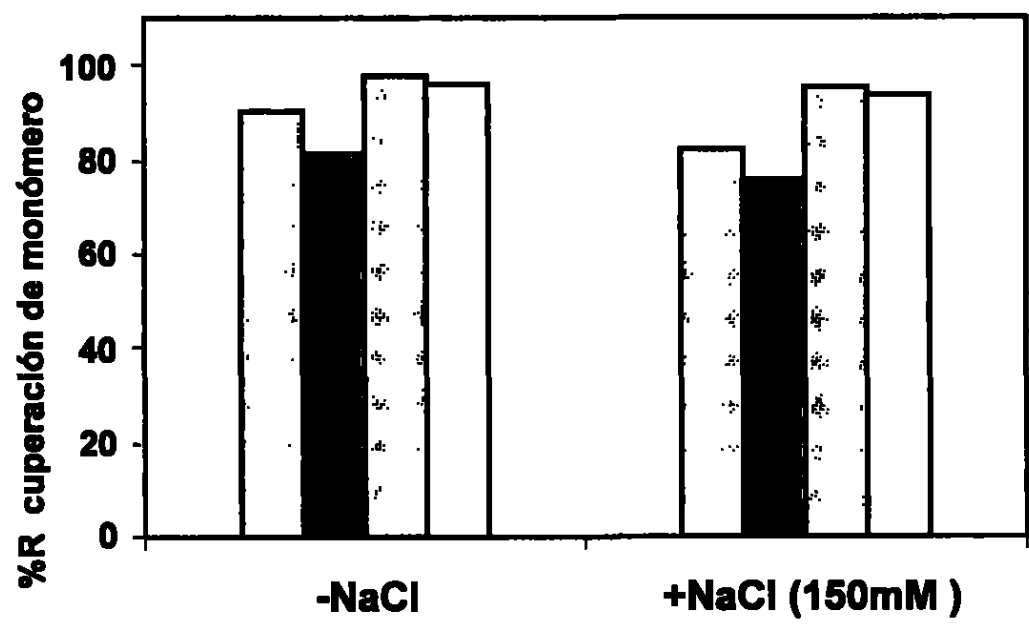


Figura 11B

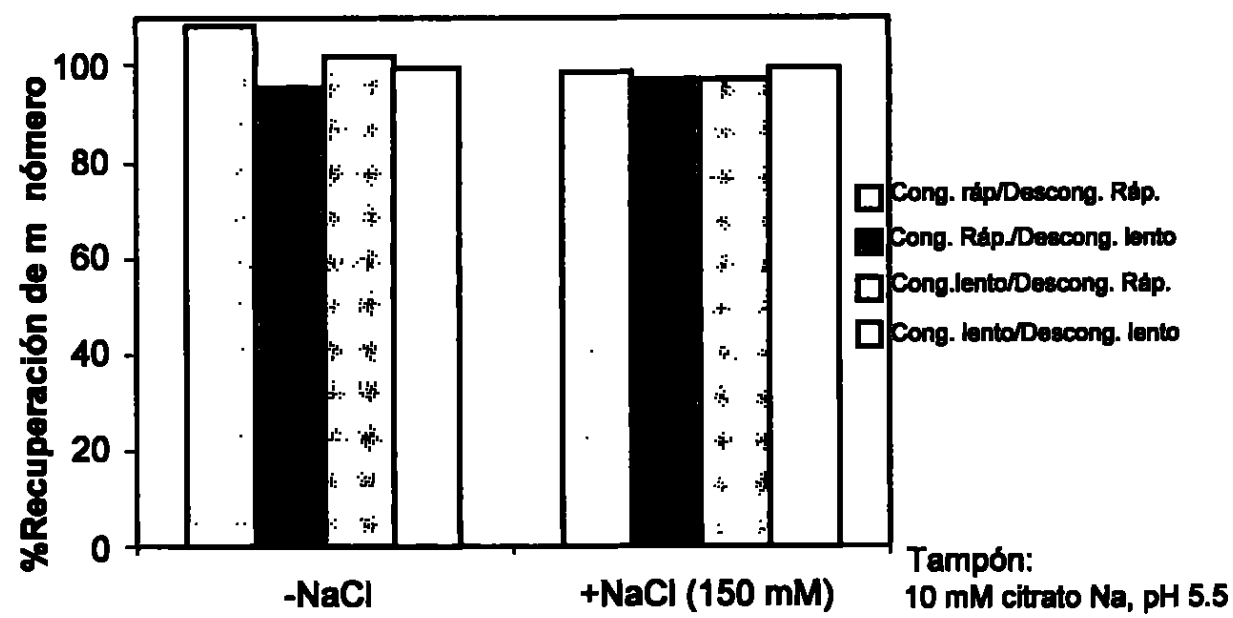


Figura 12

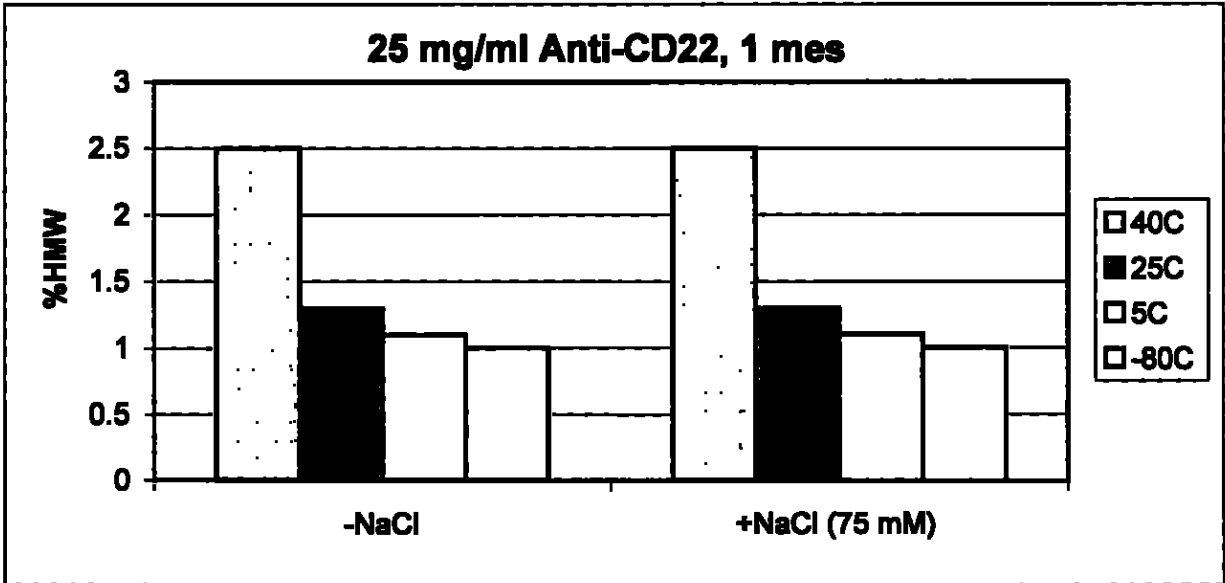


Figura 13

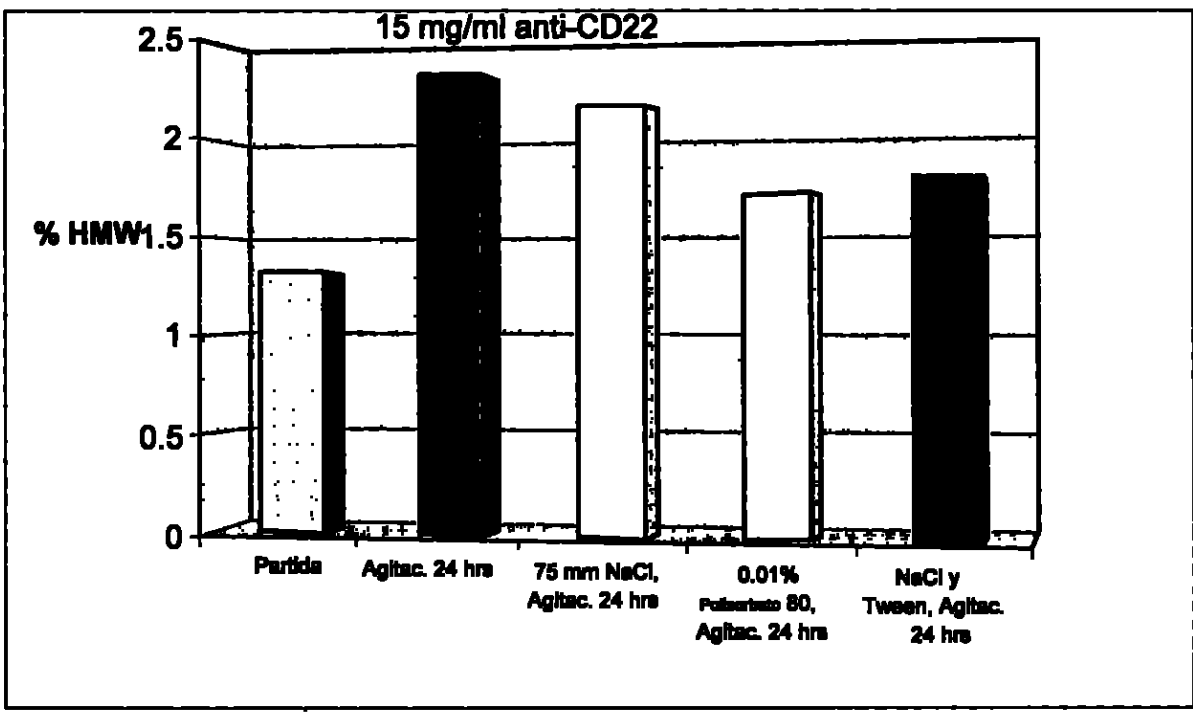


Figura 14A

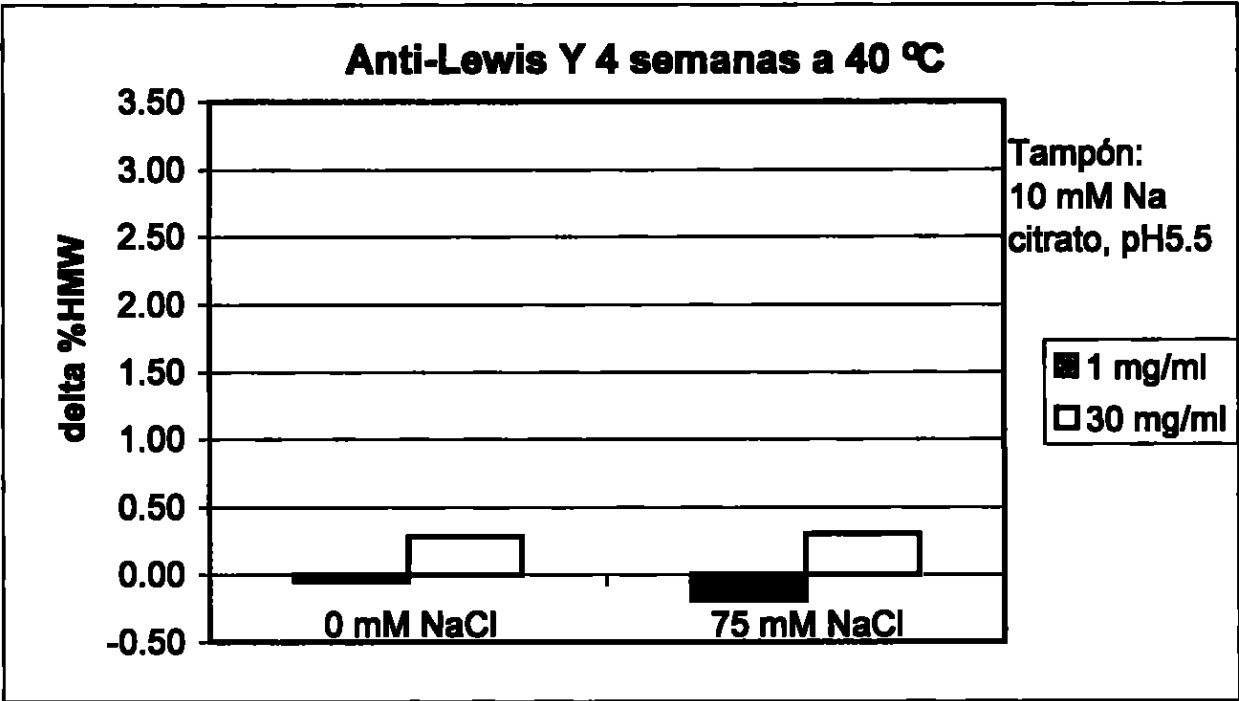


Figura 14B

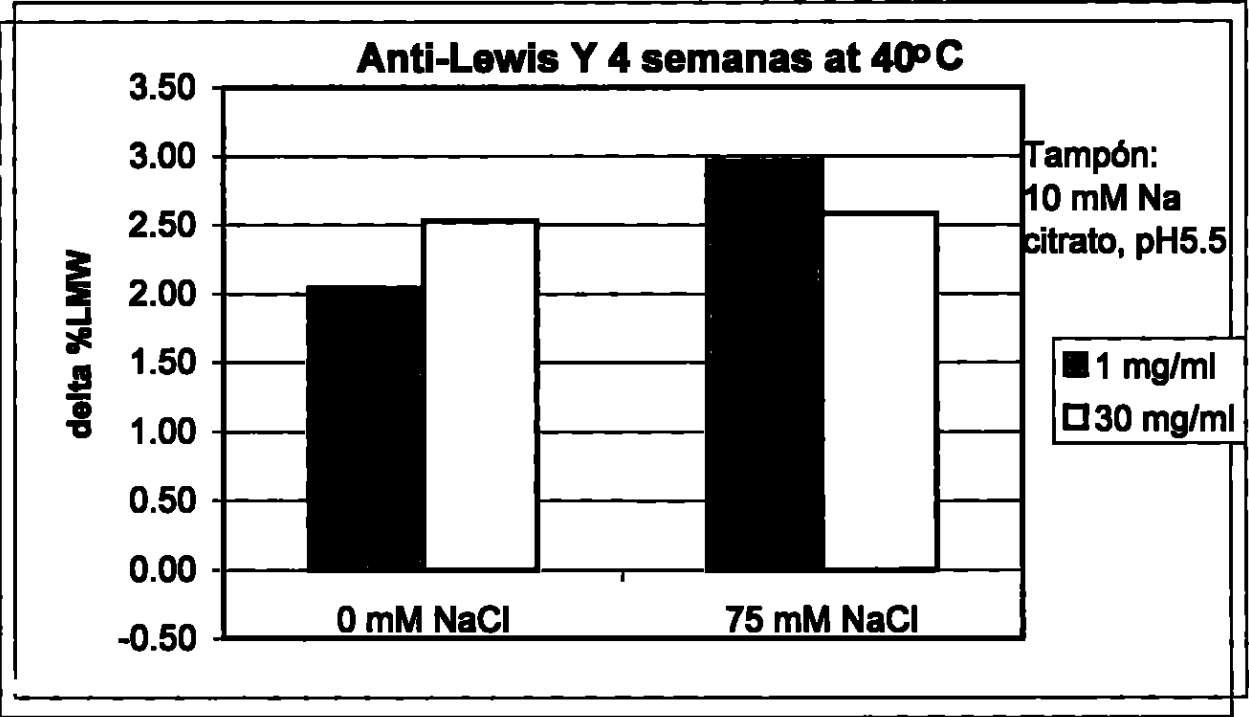
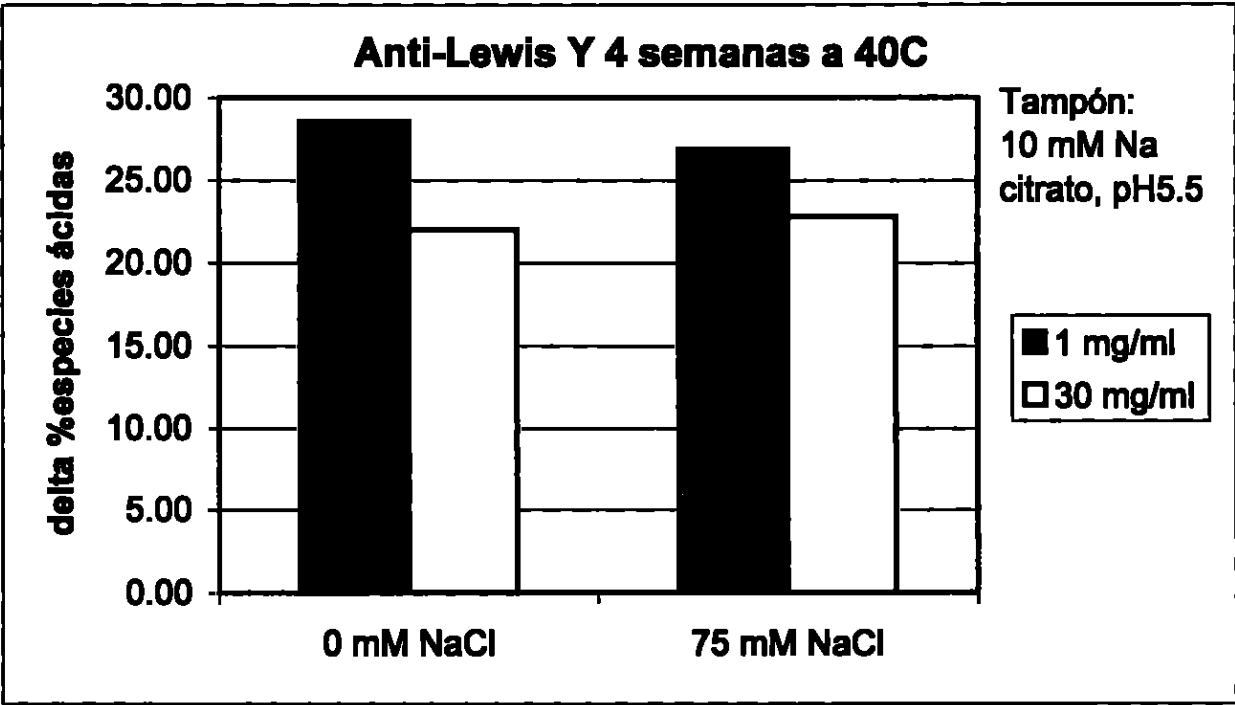


Figura 14C



122.

Figura 15A

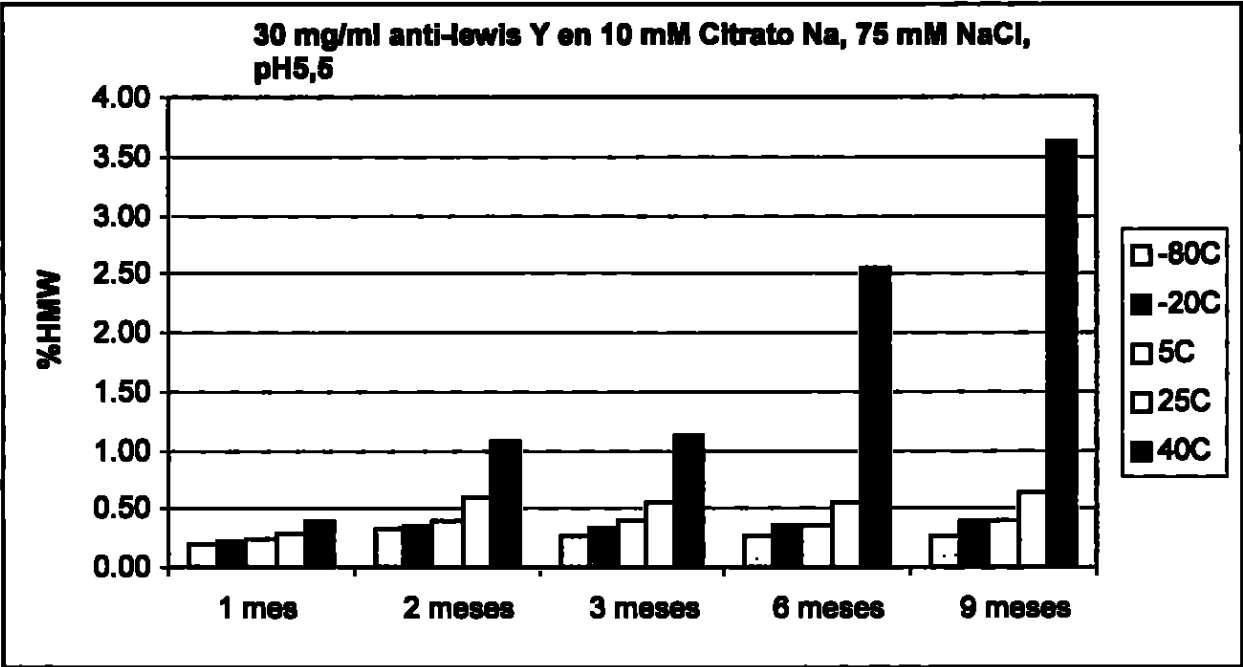


Figura 15B

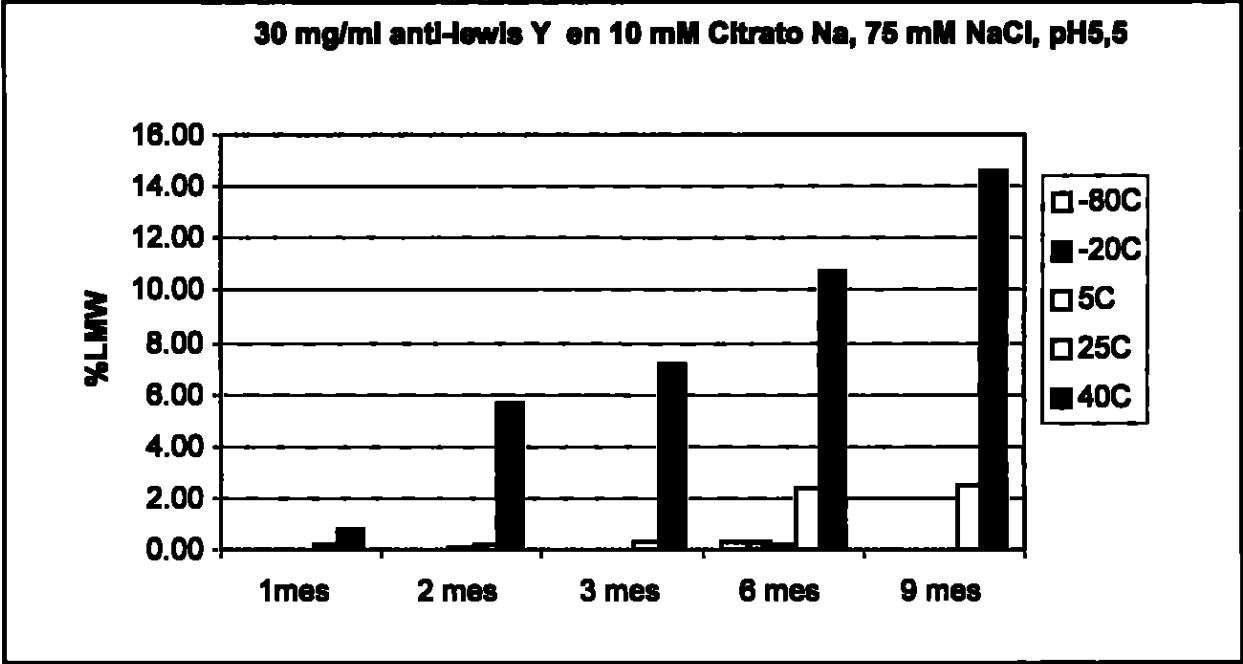


Figura 15C

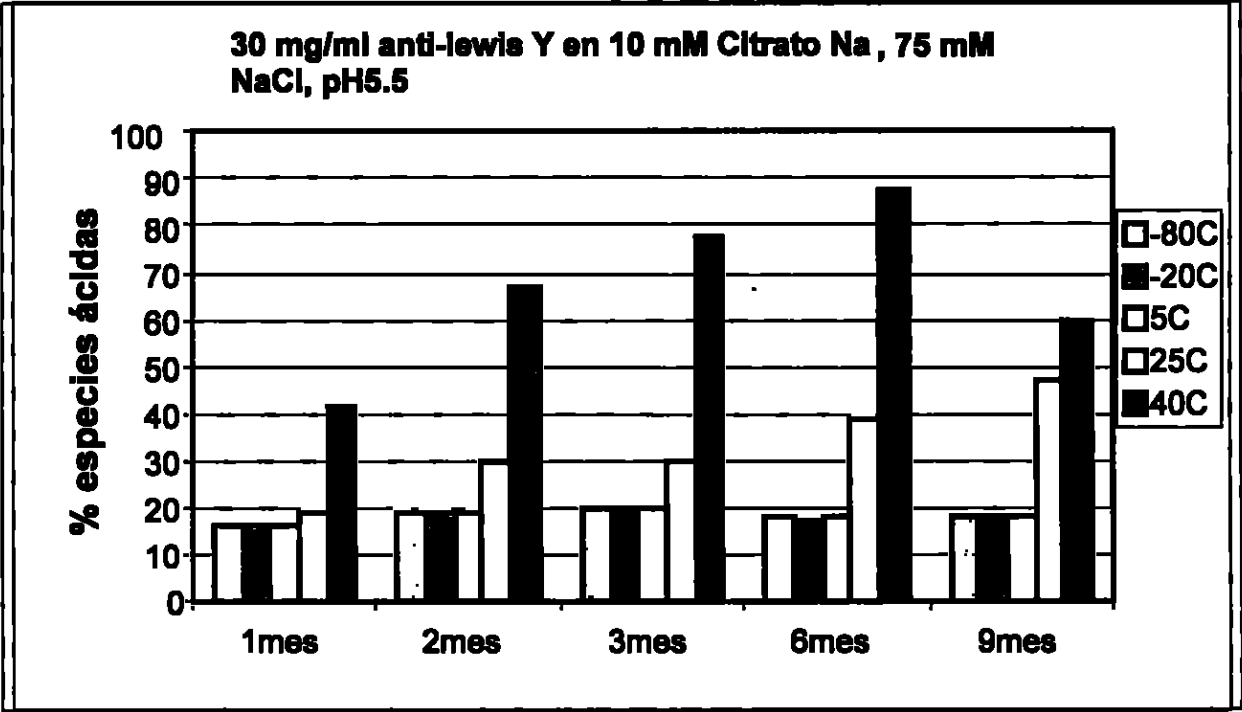


Figura 16A

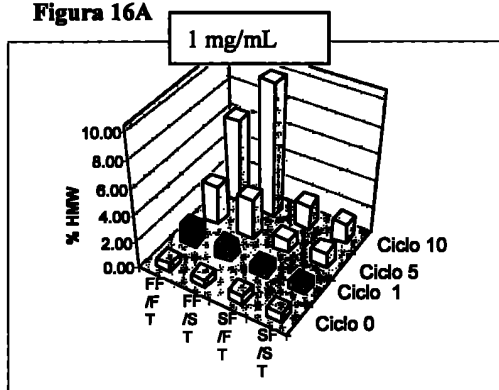


Figura 16B

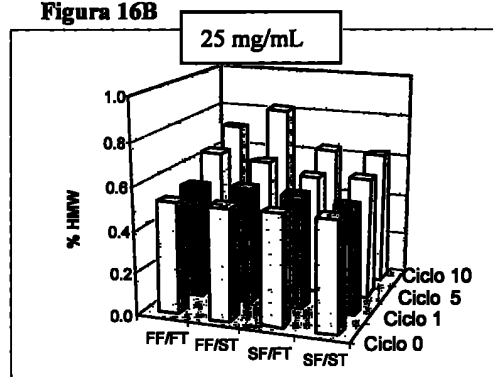


Figura 16C

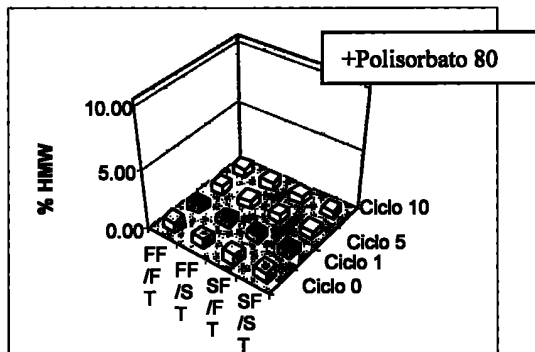
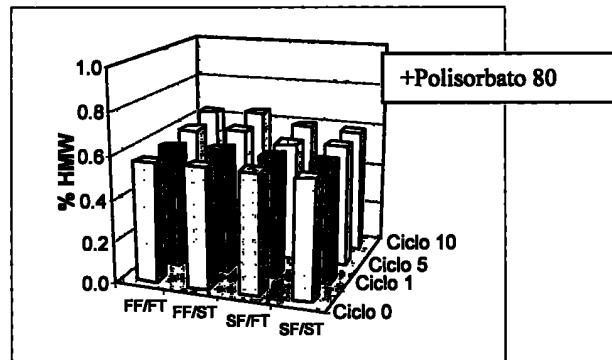


Figura 16D



125

Figura 17A

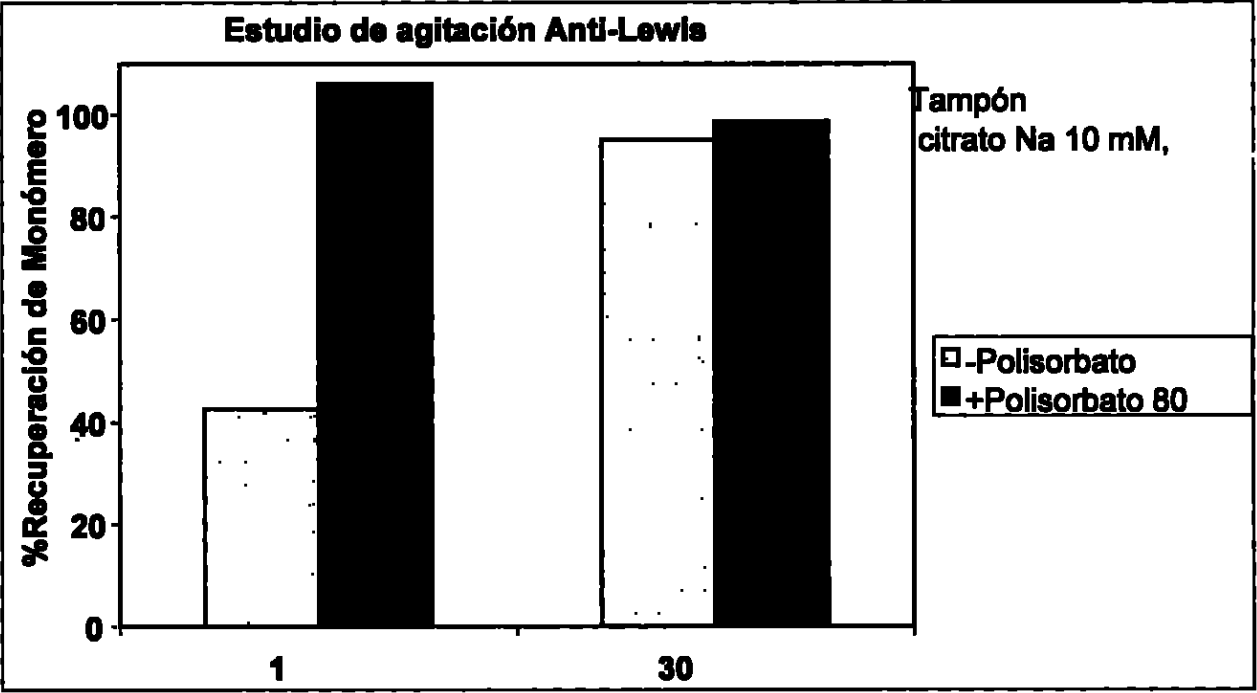
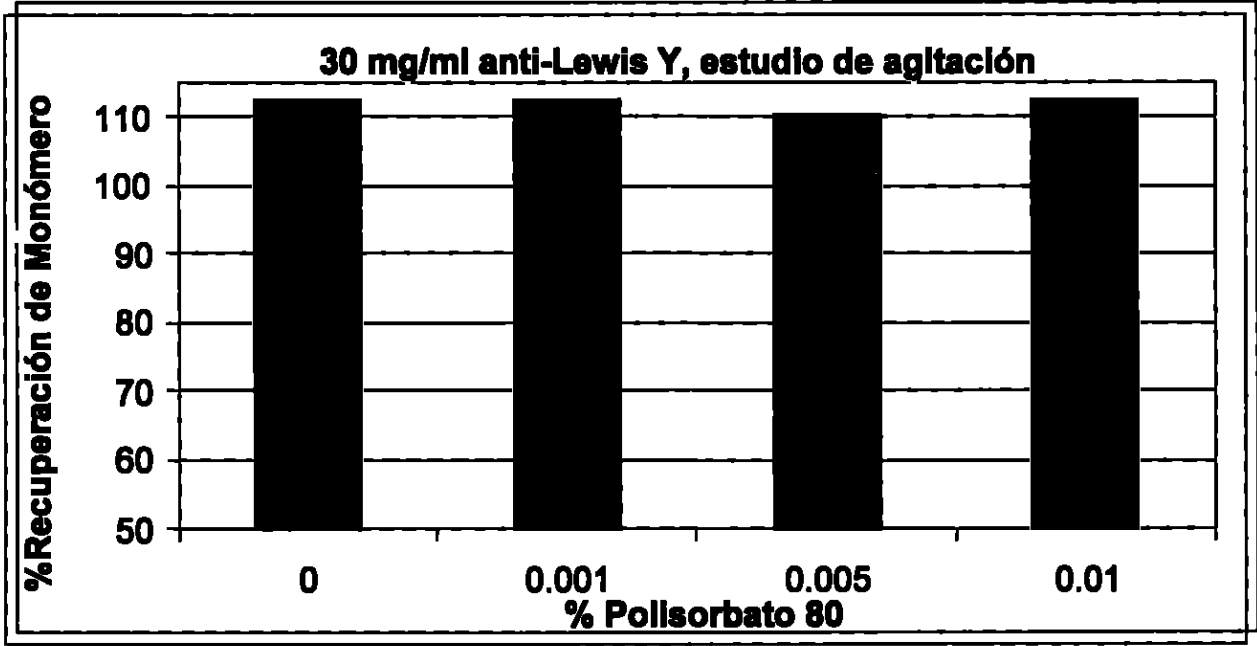


Figura 17B



125

Figura 18A

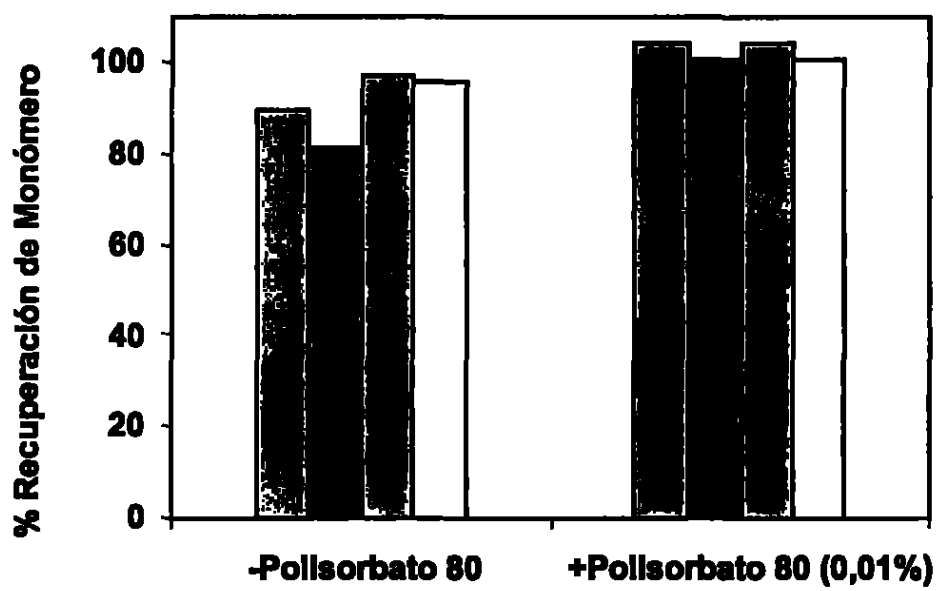
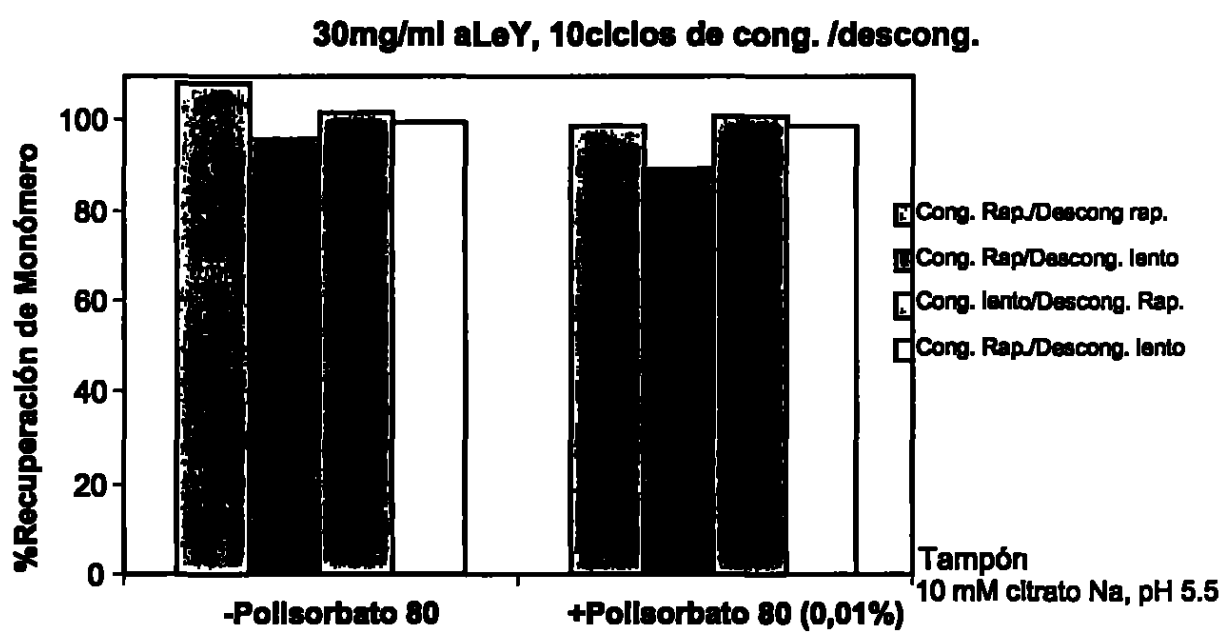
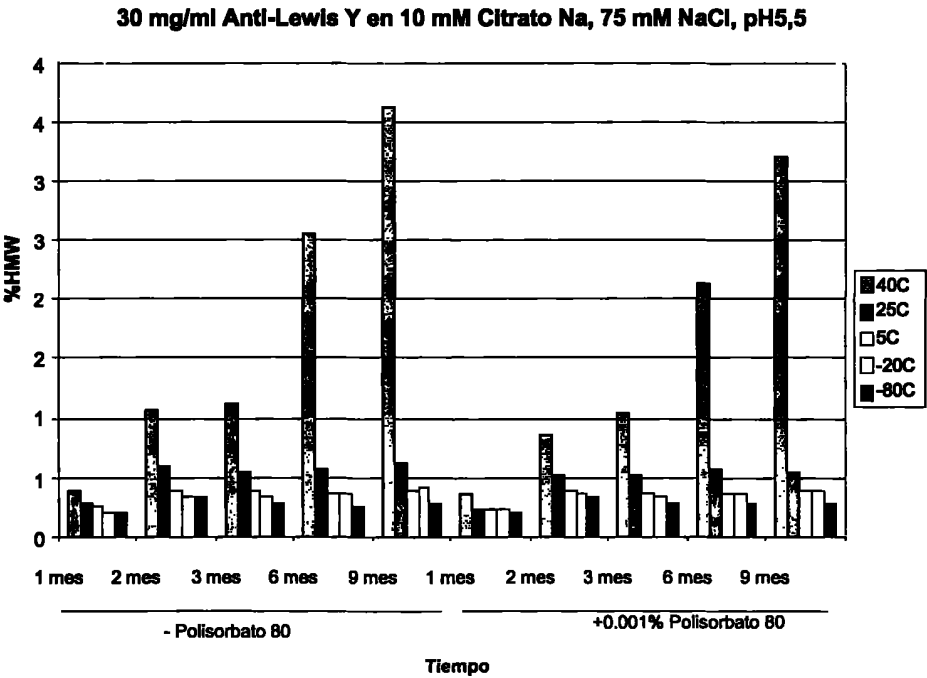


Figura 18B



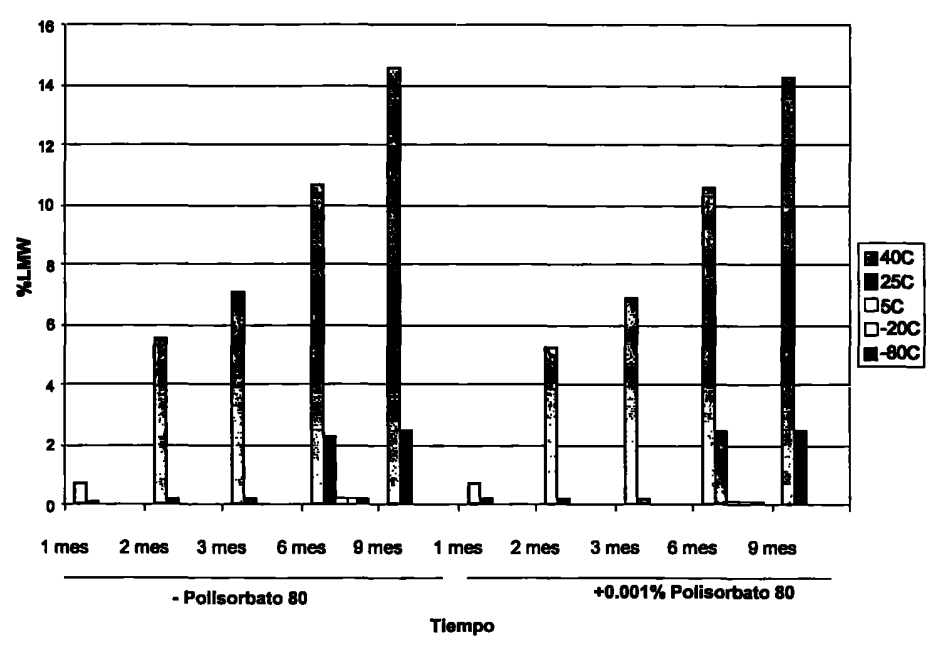
127

Figura 19A



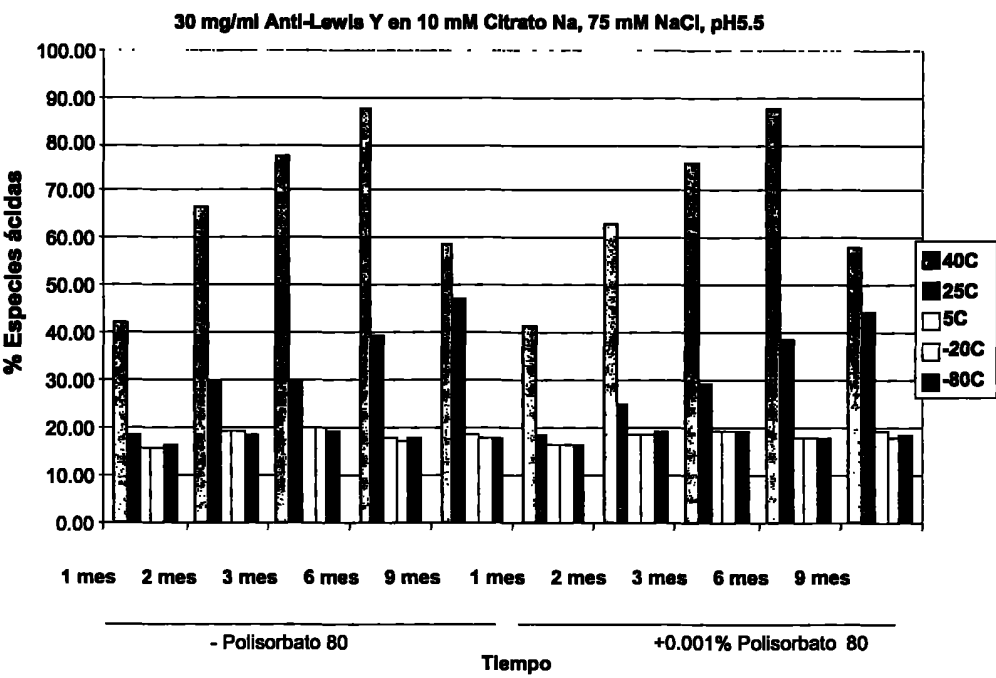
ASD

Figura 19B



131

Figura 19C



132

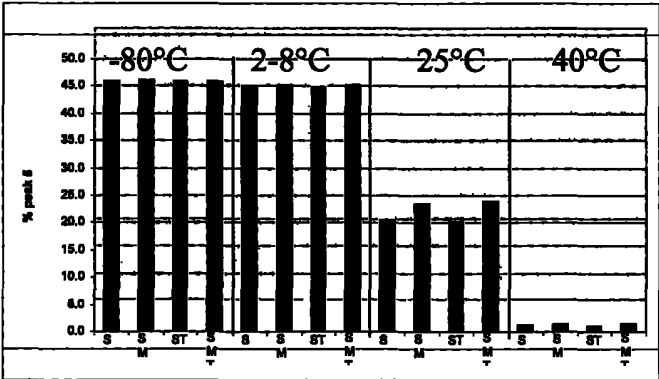
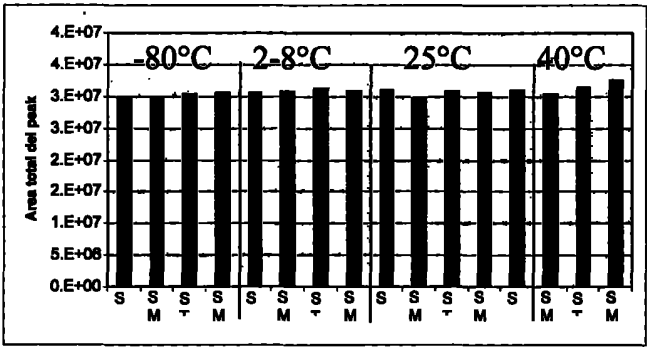
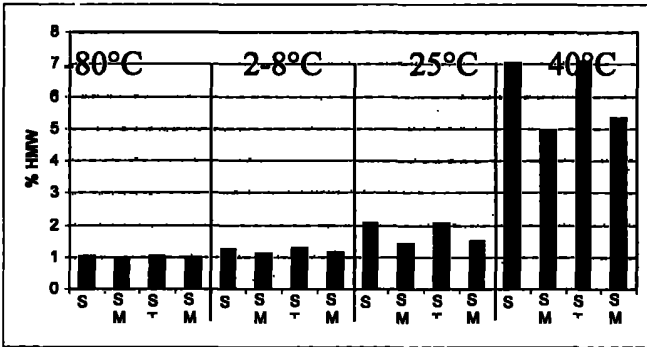


Figura 21

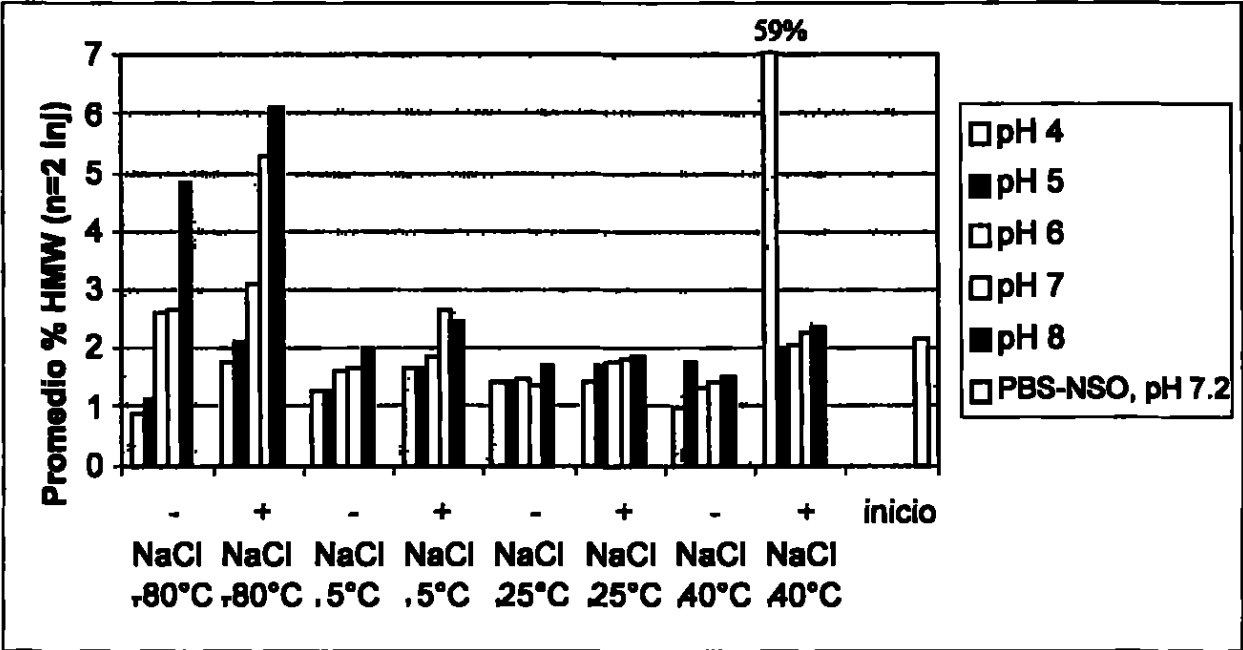


Figura 22

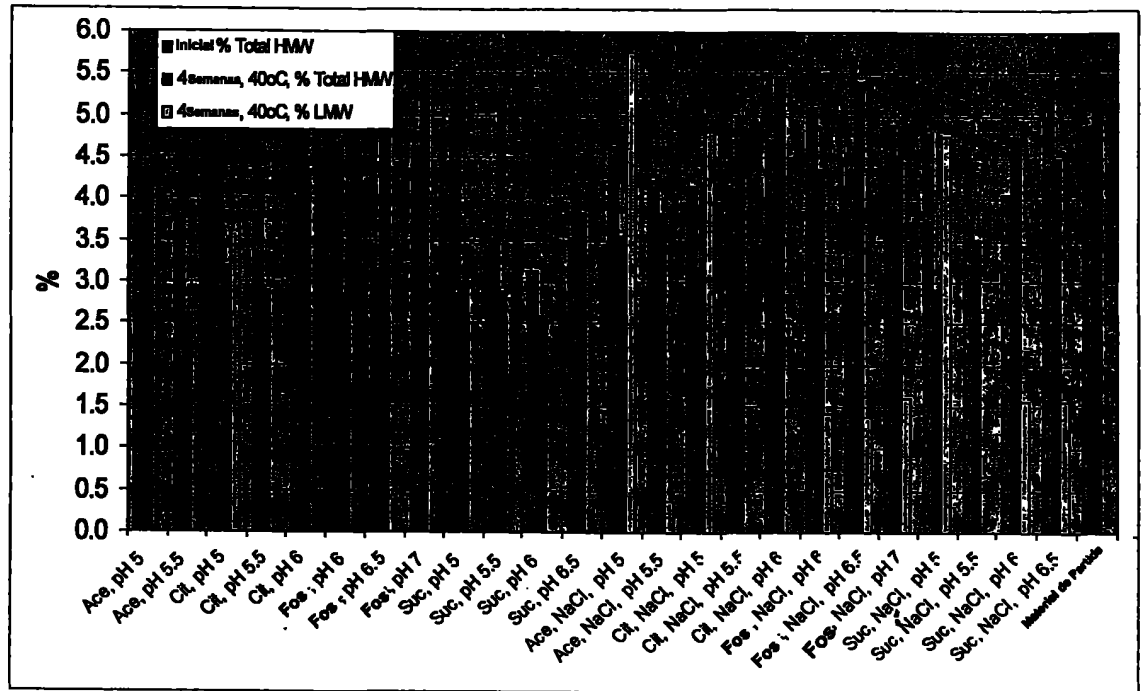


Figura 23A

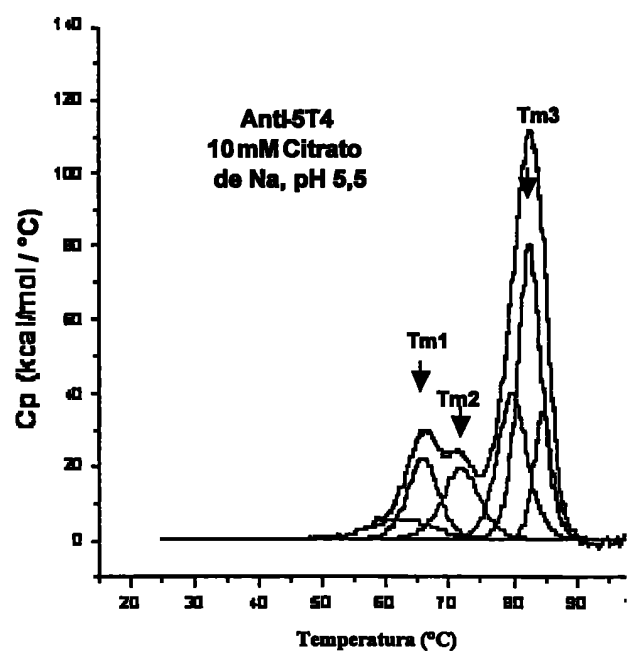


Figura 23B

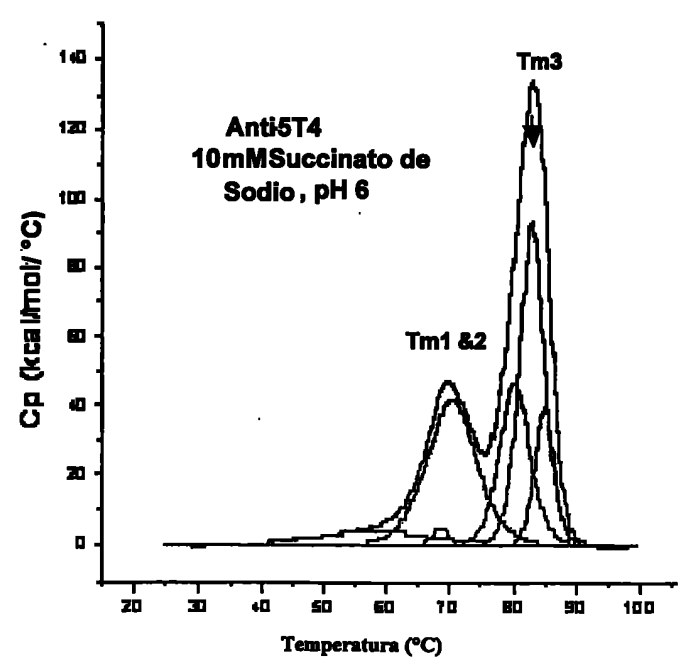


Figura 24A

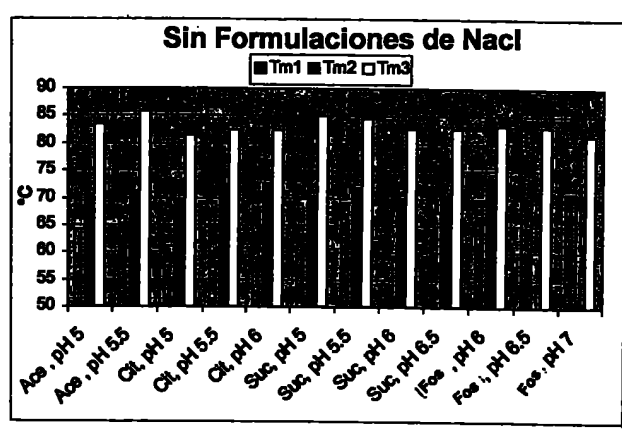


Figura 24B

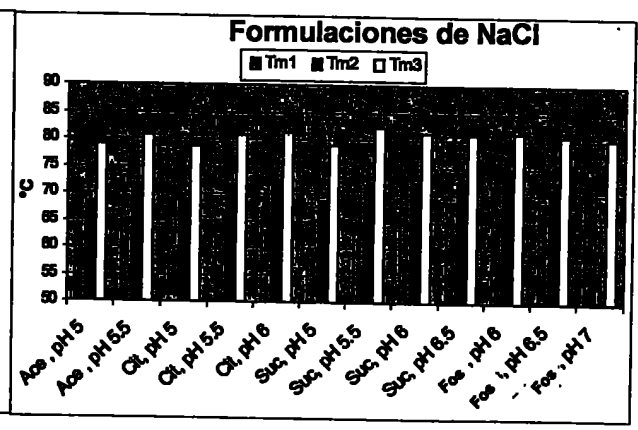


Figura 25

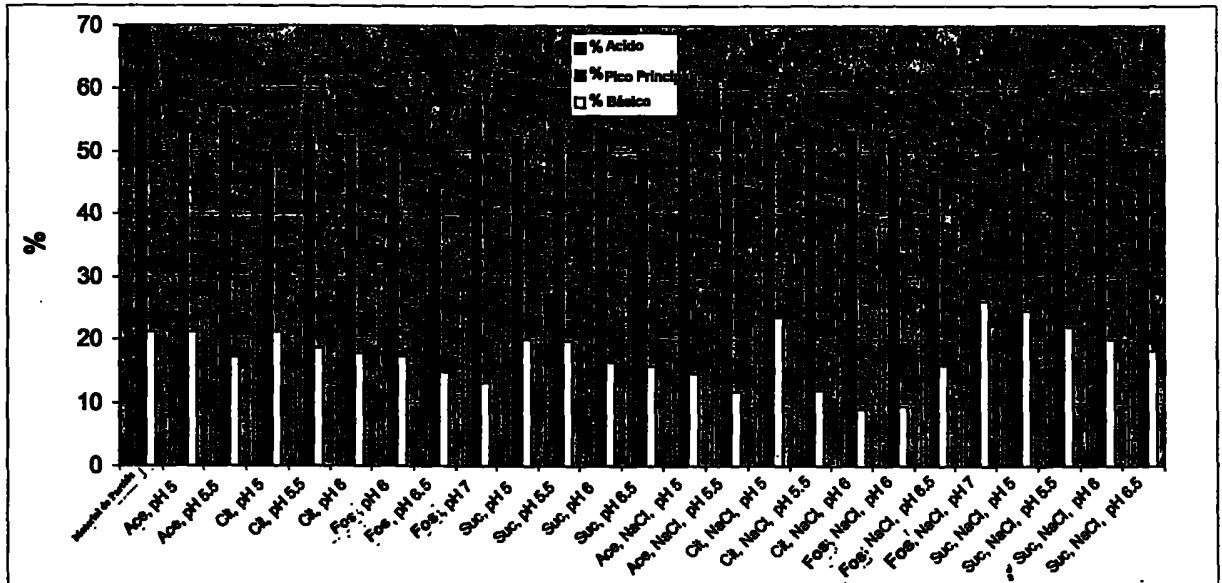


Figura 26A

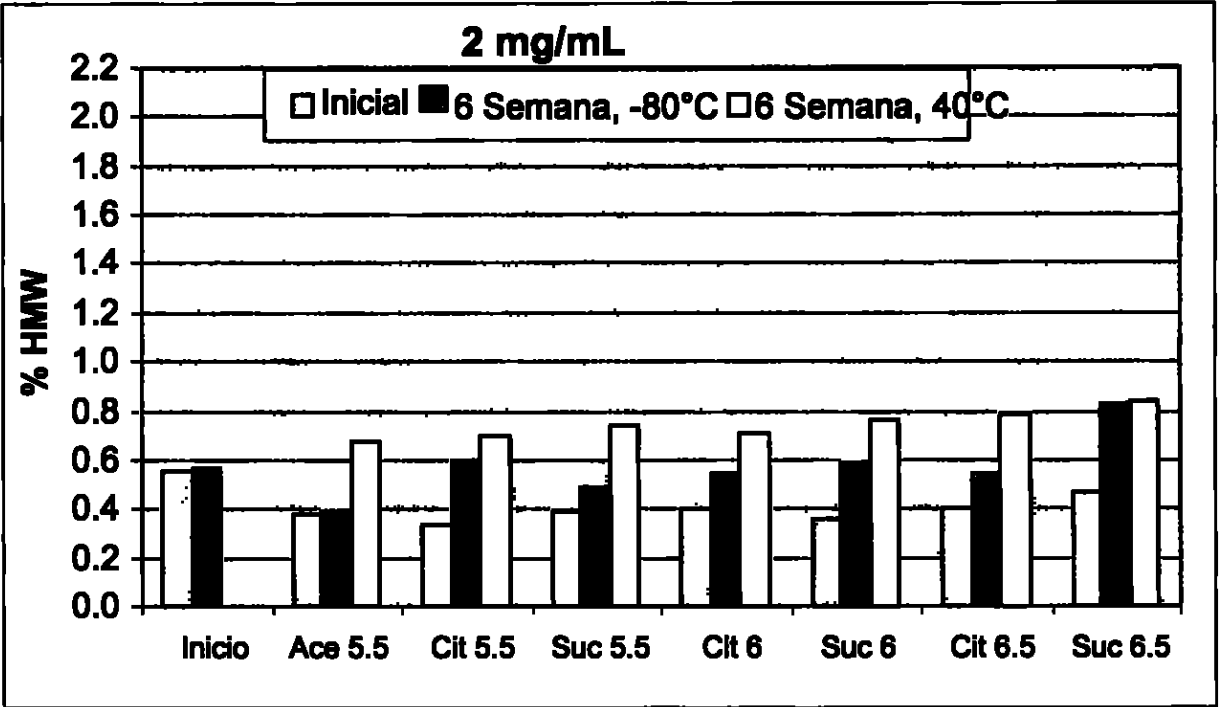


Figura 26B

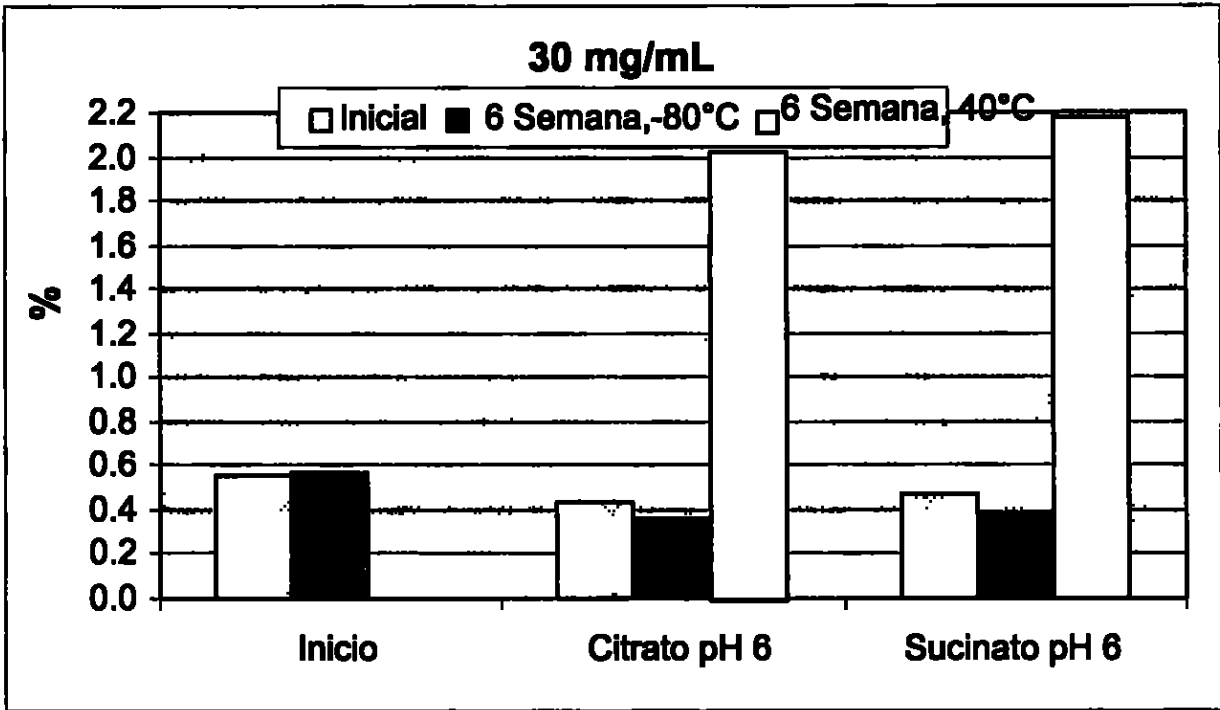


Figura 27A

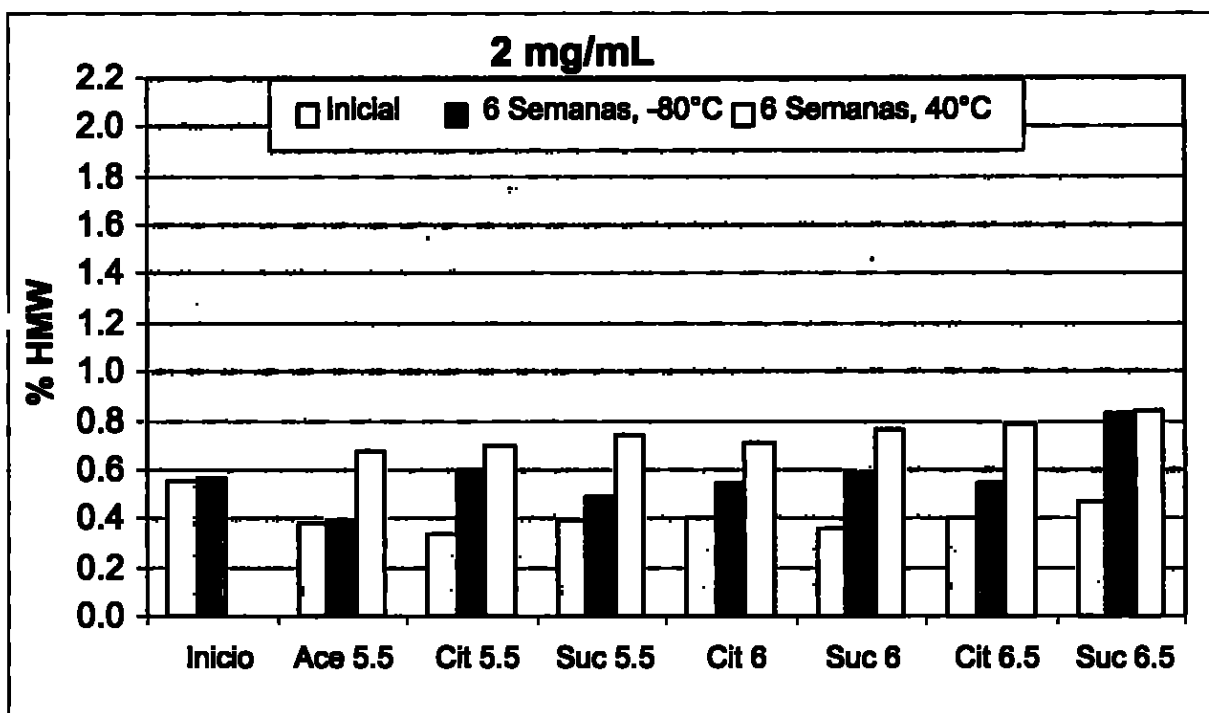


Figura 27B

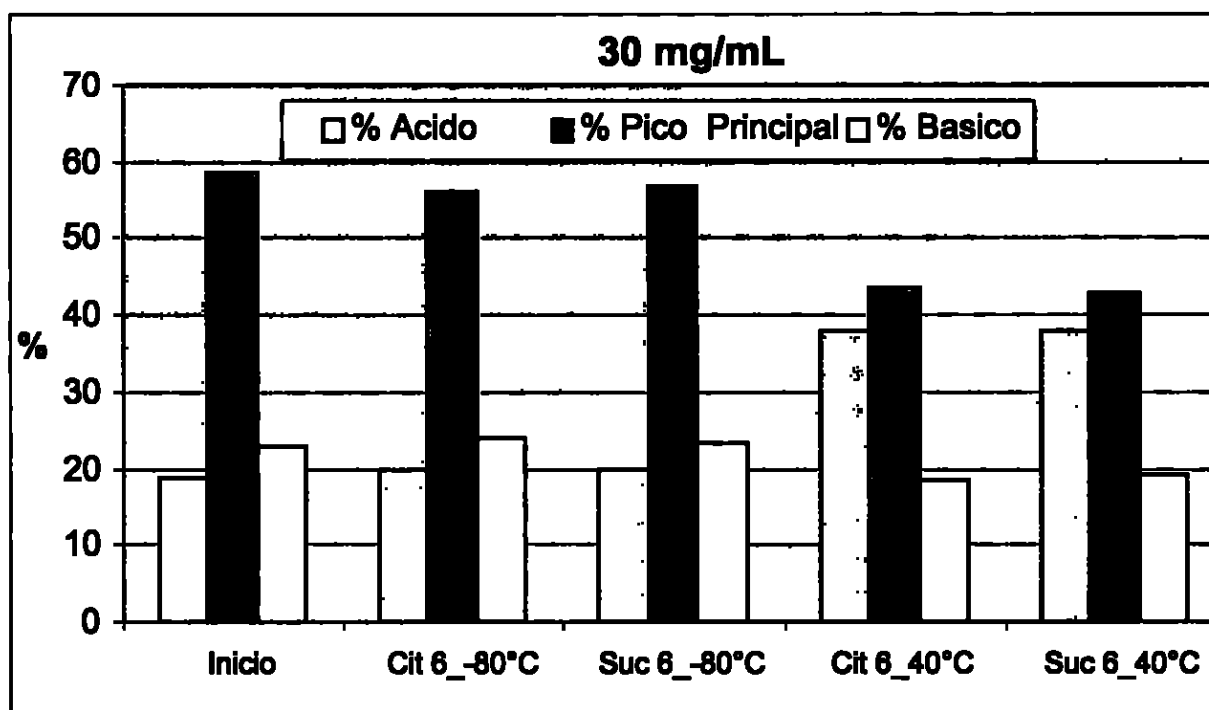
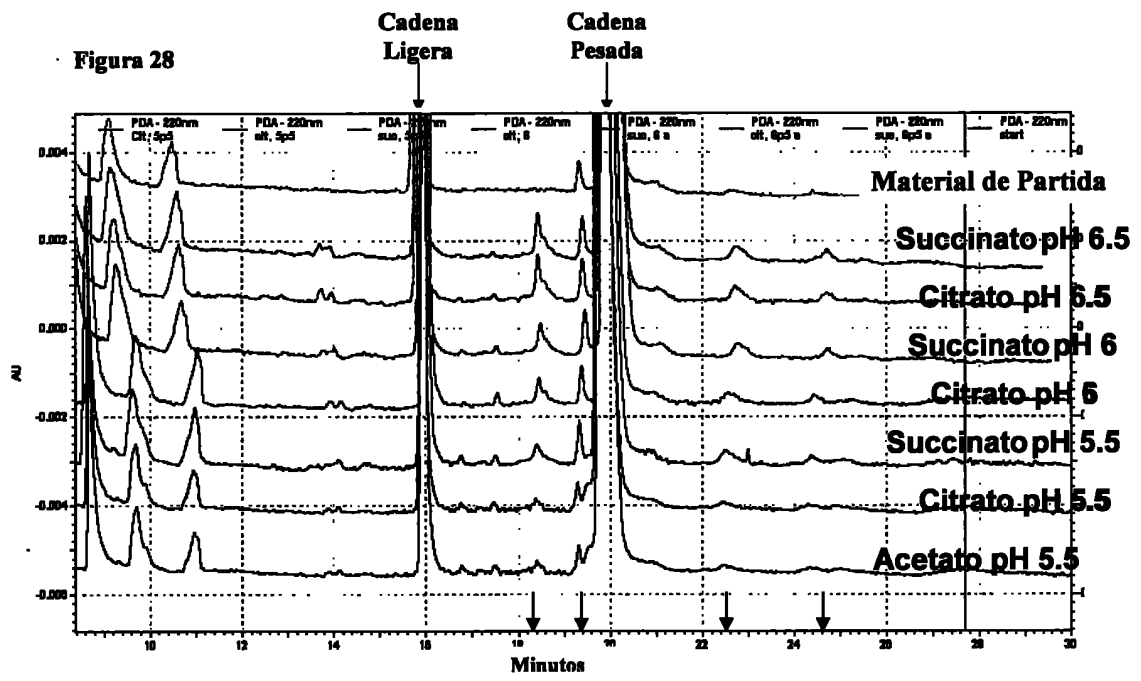


Figura 28



144

Figura 29A

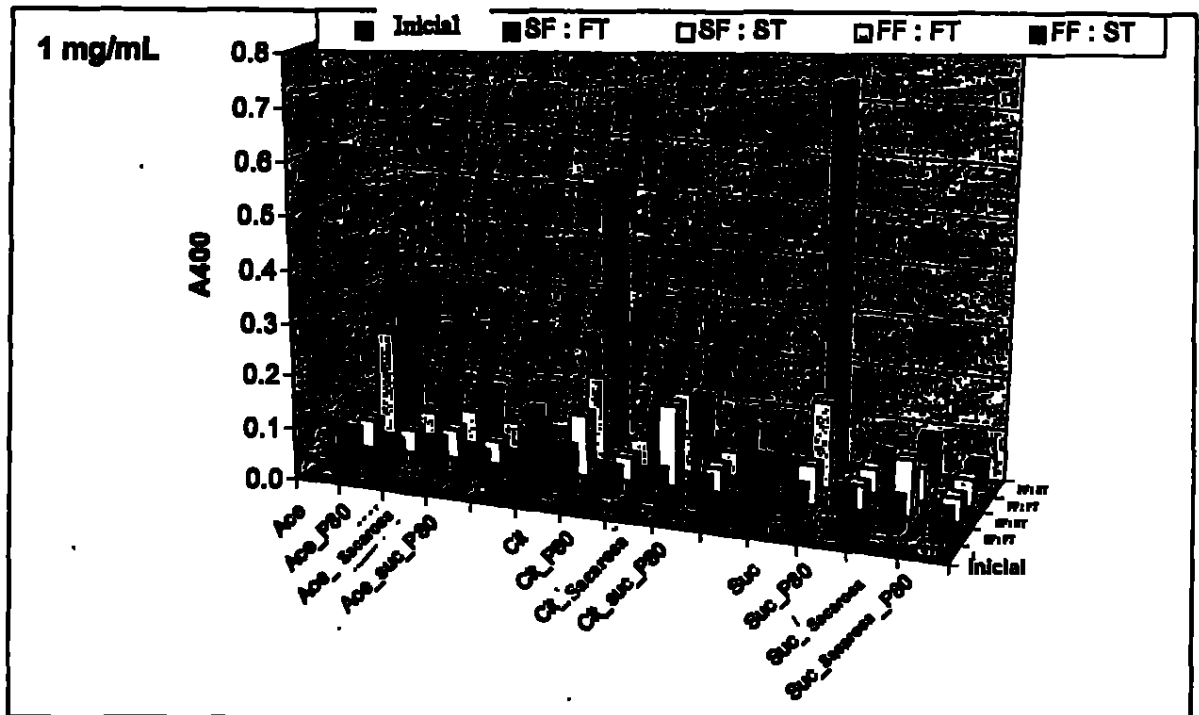


Figura 29B

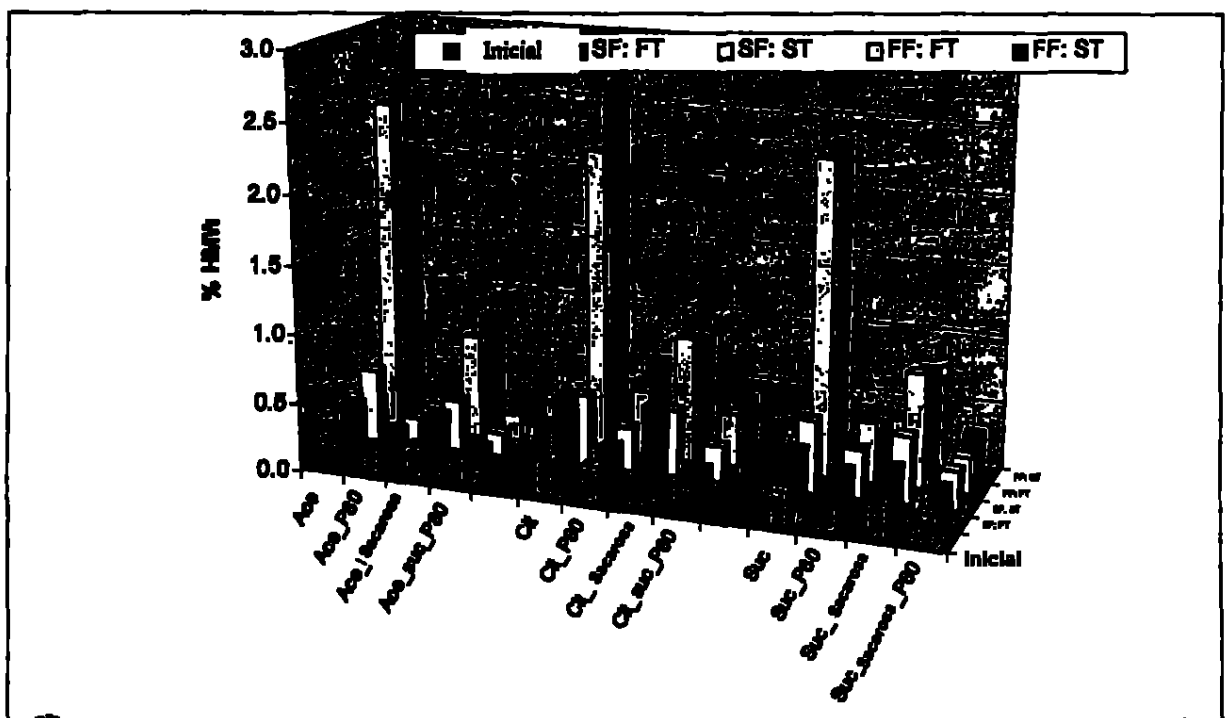


Figura 30A

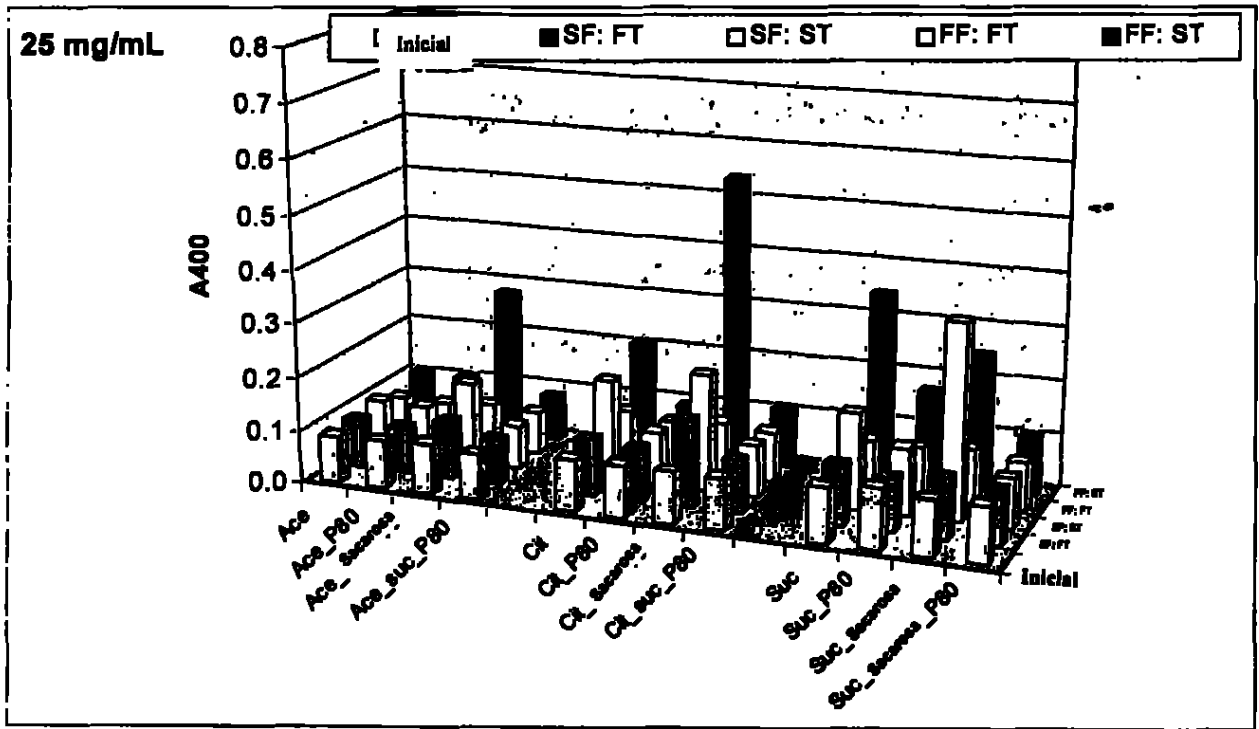


Figura 30B

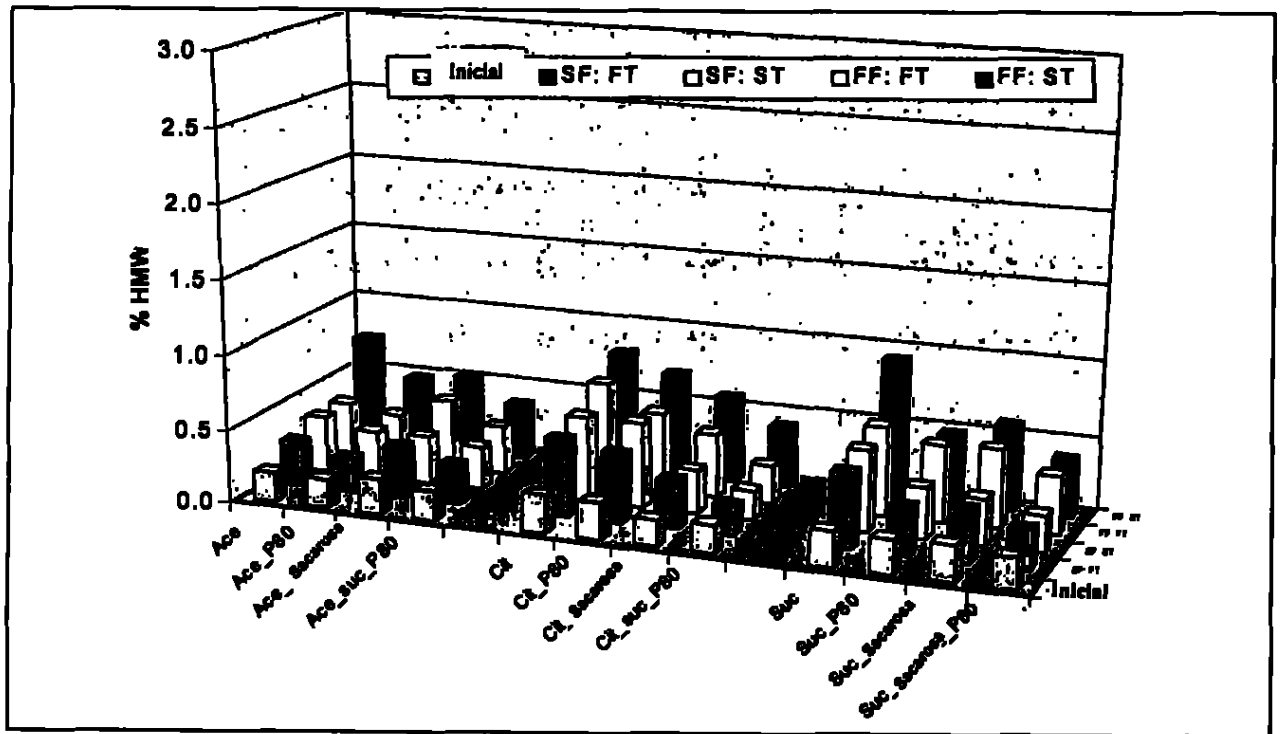
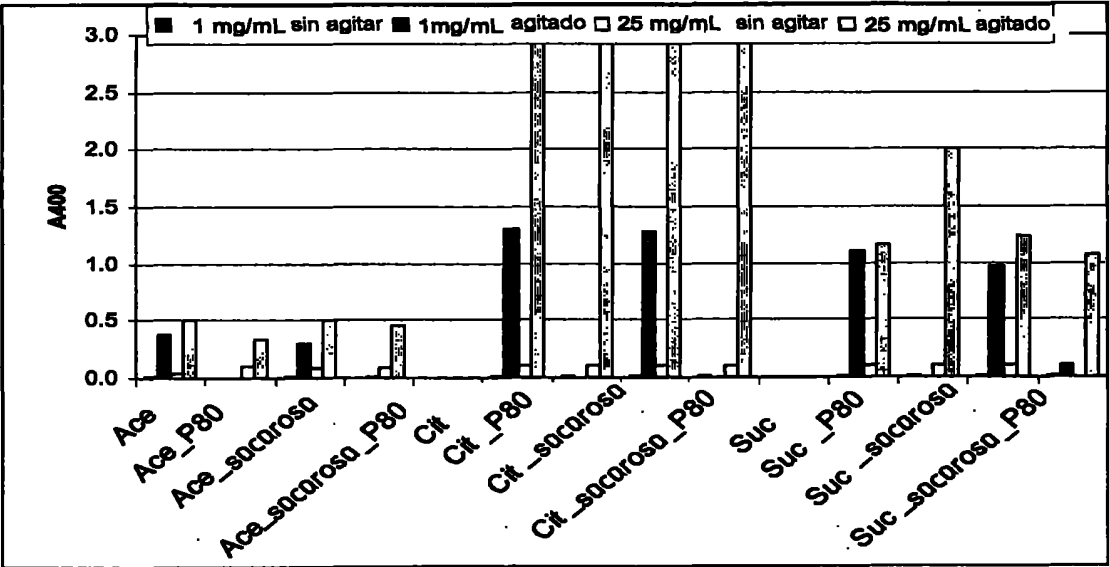
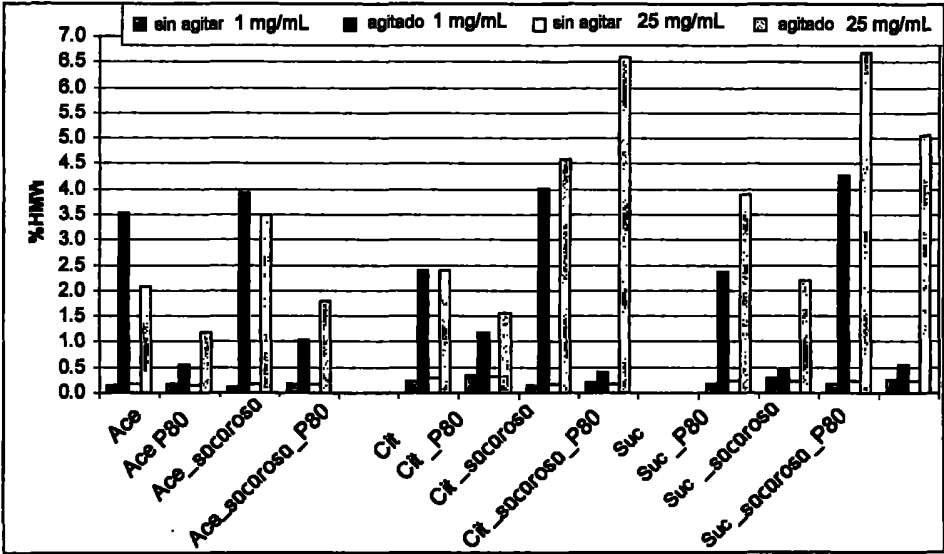


Figura 31A



144

Figura 31B



145

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION [x]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente [x] 1
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [x] 1
- ◆ Descripción de la invención [x] 26
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 112
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas [x] 2

COMPLETA [x]

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

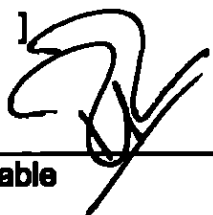
INCOMPLETA []

ESQUEMA DE TRAZADO []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado []
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud []
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado []
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas []

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha _____

Camara 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: Info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia