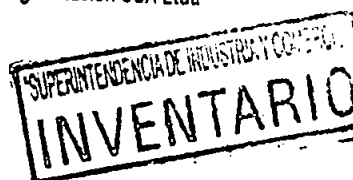




QP



Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD **PCT**
PATENTE DE INVENCION

08-99600

21. EXPEDIENTE No.

54. TÍTULO “MÉTODOS PARA REDUCIR LA AGLOMERACIÓN DE PROTEÍNA”

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

71. SOLICITANTE WYETH

DOMICILIO NUEVA JERSEY, ESTADOS UNIDOS

74. APODERADO ALVARO CORREA ORDÓÑEZ
T.P. 20.281

22. BOGOTÁ, D. C., SEPTIEMBRE 19, 2008

PETITORIO



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-099600- -00000-0000

Fecha: 2008-09-19 16:36:00 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eva: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Follos: 134

ación

FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

20 oct. 2007

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, NJ 07940, Estados Unidos de América

Nacionalidad o Domicilio: Nueva Jersey, Estados Unidos de América

Lugar de Constitución: Delaware, Estados Unidos de América

Teléfono:

Fax:

E-Mail

IDENTIFICACION

☐
☐

C.C.

NIT

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

3

REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

Dirección: Avenida 82 No.10-62 Piso 6

Teléfono: 634 1500

Fax: 376 2211

E-Mail: office.bogota@bakernet.com

IDENTIFICACION

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Cual

Número

79.143.366 de
Usaquén

TP 20.281

4

INVENTOR (ES)

(72)

Nombre: WARNE, Nicholas, William; KANTOR, Angela; CROWLEY, Thomas, Joseph; SOLEY, Erin, Christine; LI, Li; LUKSHA, Nicholas y NEIDHARDT, Edie, Anna
Dirección: 27 Farrwood Drive, Andover, MA 01810, Estados Unidos de América, 118 South Road, Pepperell, MA 01463, Estados Unidos de América, 20 Garden Avenue, Wilmington, MA 01887, Estados Unidos de América, 408 East Merrimack Street, Lowell, MA 01852, Estados Unidos de América, 32 Pokonoket Avenue, Sudbury, MA 01776, Estados Unidos de América, 349 Pleasant Street, Malden, MA 02148, Estados Unidos de América y 70 Baldplate Road, Boxford, MA 01921, Estados Unidos de América, respectivamente
Nacionalidad o Domicilio: Domiciliados en Estados Unidos

5

PCT (85)

Solicitud Internacional No. PCT/US2007/006787

Fecha 19-MAR-07

Publicación Internacional No. WO/2007/109221

Fecha 27-SEP-07

6

Título (54)

MÉTODOS PARA REDUCIR LA AGLOMERACIÓN DE PROTEÍNA

7

Clasificación Internacional (51)

A61K 38/20, A61K 38/37, A61K 39/395, A61K 47/18, C07K 16/28

8

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

20-MAR-06

(31) Número de Solicitud

60/784,130

9

Comprobante de pago No.

08-61899

Fecha 01-AGO-08

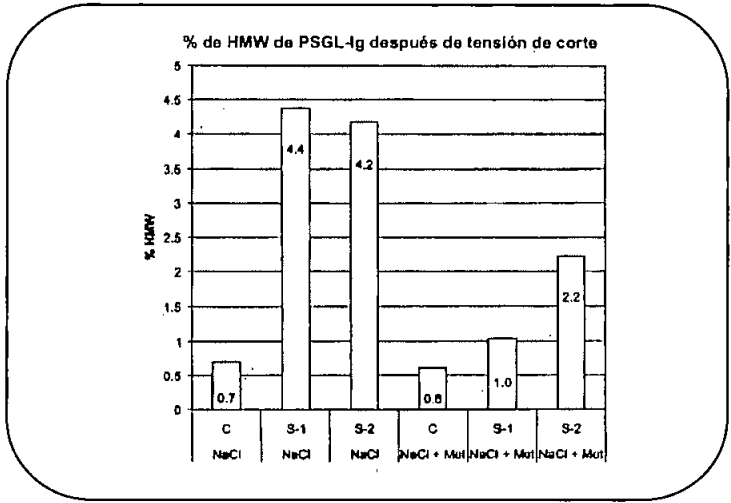
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☒ Poderes, si fuere el caso
- ☐ 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
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 x 12
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- ☒ Otros: Varios solicitud internacional

11

FIGURA CARATERISTICA



12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALVARO CORREA ORDÓÑEZ

FIRMA:

C.C. 79.143.366 de Usaquén

T.P. 20.281

Instrucciones para la presentación de los anexos, ver reverso de esta página

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 08-099600- -00000-0000

Fecha: 2008-09-19 16:36:00 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 134

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 08 - 61,899
FECHA : AGOSTO 1 DE 2008

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
BAKER & MCKENZIE	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	79632243	01/08/2008	28,350,900.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	501,000.00
		TOTAL :	\$ 501,000.00

SON: QUINIENTOS UN MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
27 September 2007 (27.09.2007)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2007/109221 A2

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

Anna [US/US]; 70 Baldplate Road, Boxford, MA 01921 (US).

(21) International Application Number:
PCT/US2007/006787

(74) Agent: SUPERKO, Colleen; Wilmer Cutler Pickering Hale and Dorr LLP, 60 State Street, Boston, MA 02109 (US).

(22) International Filing Date: 19 March 2007 (19.03.2007)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/784,130 20 March 2006 (20.03.2006) 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): WARNE, Nicholas, William [US/US]; 27 Farrwood Drive, Andover, MA 01810 (US). KANTOR, Angela [US/US]; 118 South Road, Pepperell, MA 01463 (US). CROWLEY, Thomas, Joseph [US/US]; 20 Garden Avenue, Wilmington, MA 01887 (US). SOLEY, Erin, Christine [US/US]; 408 East Merrimack Street, Lowell, MA 01852 (US). LI, Li [CN/US]; 32 Pokonoket Avenue, Sudbury, MA 01776 (US). LUKSHA, Nicholas, Gary [US/US]; 349 Pleasant Street, Malden, MA 02148 (US). NEIDHARDT, Edle,

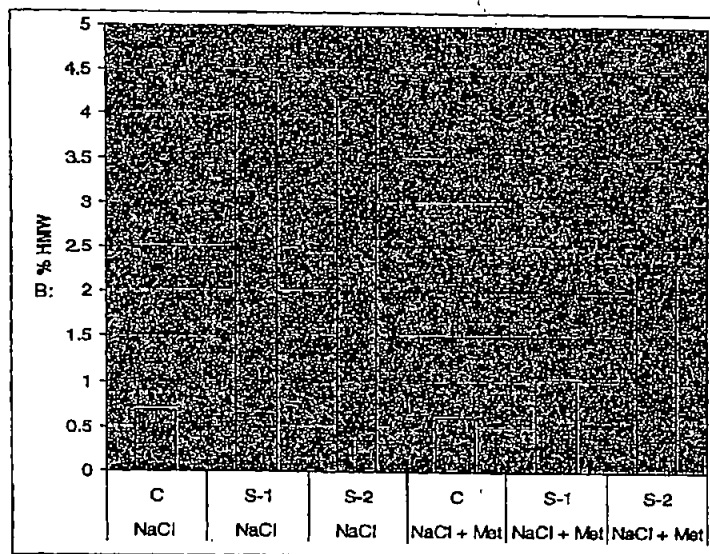
(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BI, BR, BW, BY, BZ, CA, CI, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,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

[Continued on next page]

(54) Title: METHODS FOR REDUCING PROTEIN AGGREGATION

% HMW of PSGL-Ig after shear stress



(57) Abstract: Methods of reducing aggregation of a protein or proteins in a formulation, and protein formulations having reduced aggregation properties are provided. The methods and formulations described herein maintain the biological activity of a protein and increase the shelf life of protein formulations.

00005

WO 2007/109221 A2



Published:

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

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

5

METHODS FOR REDUCING PROTEIN AGGREGATION

CROSS REFERENCE TO RELATED APPLICATIONS

This application claims the benefit of U.S. Provisional Application No. 60/784,130
10 filed March 20, 2006, entitled "Methods for Reducing Protein Aggregation," the contents
of which are hereby incorporated by reference in its entirety.

TECHNICAL FIELD

The field relates to methods of reducing aggregation of proteins and protein
15 formulations that have reduced levels of aggregation.

BACKGROUND

The completion of the human genome project, coupled with the development of
improved methods for protein isolation and purification, have made the large-scale
20 production of protein formulations a reality. In fact, there are more than a hundred
recombinant proteins in Phase I clinical trials, or beyond, and several dozen have
received Food and Drug Administration approval. Formulations that ensure an efficient
and safe delivery of proteins or peptides in a biologically active form are key to the
commercial success of current and future biotechnology products.

25 Unfortunately, proteins possess unique physical and chemical properties, which
create difficulties in formulation and development. Physical and chemical instabilities of
proteins pose significant challenges in developing suitable protein formulations. The
most common physical instability of proteins is protein aggregation and its macroscopic
equivalent, precipitation. The tendency of proteins to aggregate is an especially
30 challenging problem in the biotechnology and pharmaceutical industry where it is
desired to synthesize, process, and store proteins at the highest possible concentrations,
and over long periods of time.

While the mechanisms driving protein aggregation are not completely
understood, the end results are nonetheless undesirable. Aggregate formation by a

000007

5

CLAIMS

What is claimed is:

1. A method for reducing aggregation of a protein in a protein formulation, comprising adding methionine to the formulation to a concentration of about 0.5 mM to about 145 mM, wherein the method results in reduced aggregation of the protein in the formulation compared with the protein in a formulation lacking methionine.
2. The method of claim 1, wherein the protein formulation is a liquid formulation or a freeze dried powder.
3. The method of claim 1, wherein the protein is at a concentration of between about 0.1 mg/ml and about 300 mg/ml.
4. The method of claim 1, wherein the protein formulation comprises a surfactant.
5. The method of claim 1, wherein the protein formulation comprises an amino acid selected from the group consisting of arginine, lysine, aspartic acid, glycine, and glutamic acid.
6. The method of claim 1, wherein the protein formulation comprises a tonicity modifier.
7. The method of claim 1, wherein the protein formulation comprises a sugar.
8. The method of claim 1, wherein the protein formulation further comprises an agent that reduces aggregation of the protein of the formulation.
9. The method of claim 1, wherein protein aggregation is not the result of methionine oxidation.

5

10. The method of claim 1, wherein aggregation of the protein of the formulation is assessed before and/or after adding methionine to the formulation.

11. The method of claim 10, wherein aggregation is assessed by SEC-HPLC, AUC,
10 light scattering, and UV absorbance.

12. The method of claim 1, wherein the aggregation is assessed by % HMW species, and the % HMW species is reduced by about 30% compared with % HMW species in a formulation lacking methionine.

15

13. The method of claim 1, wherein aggregation of the protein of the formulation is assessed between 1 week and 12 weeks after adding methionine to the protein formulation or between 1 month and 36 months after addition of methionine to the protein formulation.

20

14. The method of claim 1, wherein aggregation of the protein of the formulation is assessed after storage of the protein formulation at a temperature between 4°C and 50°C for about 1 week to about 12 weeks after formulating the protein formulation with methionine.

25

15. The method of claim 1, wherein aggregation of the protein of the formulation is assessed after storage of the protein formulation at a temperature between 4°C and 30°C for about 1 month to about 36 months after formulating the protein formulation with methionine.

30

16. The method of claim 1, wherein aggregation of the protein of the formulation is a result of shear stress, storage, storage at elevated temperature, exposure to light, pH, presence of surfactants, and combinations thereof.

- 5 17. The method of claim 1, wherein methionine is added to the formulation to a final concentration of between about 1 mM and 25 mM.
18. The method of claim 1, wherein the formulation has a pH of between about 5.0 and 7.0.
- 10 19. The method of claim 1, wherein the protein formulation comprises a buffer selected from the group consisting of citrate, succinate, histidine, Tris, and combinations thereof.
20. The method of claim 1, wherein the method increases the shelf life of the
15 formulation, or maintains the potency of the formulation.
21. The method of claim 1, wherein the protein lacks methionine residues or contains less than 5 methionine residues.
- 20 22. A method for reducing aggregation of a protein in a protein formulation subjected to shear stress, comprising adding methionine to the formulation to a concentration of about 0.5 mM to about 145 mM, wherein the method results in reduced aggregation of the protein in the formulation compared with the protein in a formulation lacking methionine.
- 25 23. The method of claim 22, wherein the shear stress is the result of shaking, drawing into a syringe and purification procedures, and combinations thereof.
- 30 24. A method of reducing a loss in potency or biological activity of a protein in a protein formulation after storage of the formulation at room temperature for more than a day, comprising adding methionine to the formulation to a concentration of about 0.5 mM to about 145 mM, thereby reducing the loss in potency or biological activity of the protein in the formulation compared with the protein in a formulation lacking methionine.

00010

- 5
25. The method of claim 24, wherein the protein formulation is stored under fluorescent light.
26. The method of claim 24, wherein the protein formulation is stored in the dark for
10 about 1 month.
27. A method for reducing aggregation of a protein in a protein formulation, comprising:
- 15 0.5 mM (i) adding methionine to the formulation to a concentration of about to about 145 mM; and
- (ii) determining the % HMW levels of the protein of the formulation by SEC-HPLC;
- wherein the method results in reduced aggregation of the protein in the formulation compared with the protein in a formulation lacking methionine.
- 20
28. The method of claim 27, wherein the method results in a protein formulation having less than about 5% HMW species as determined by SEC-HPLC.
29. A protein formulation comprising one of an anti-B7.1 antibody, an anti-B7.2
25 antibody, an anti-CD22 antibody, PSGL-Ig and Factor VIII, or a biologically active fragment thereof, and about 0.5 mM to 50 mM methionine.
30. The formulation of claim 29, further comprising 1-150 mM of an amino acid selected from the group consisting of arginine, lysine, aspartic acid, and glutamic acid.
- 30

00011

1/14

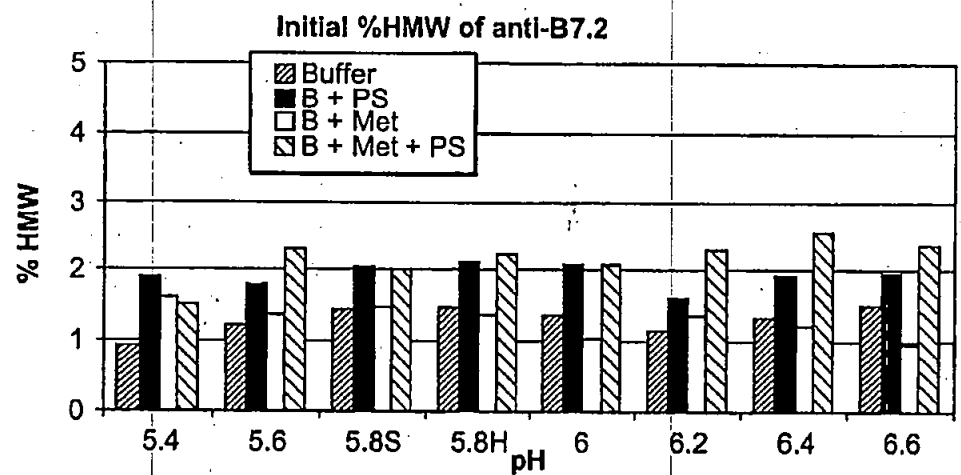


FIG. 1A

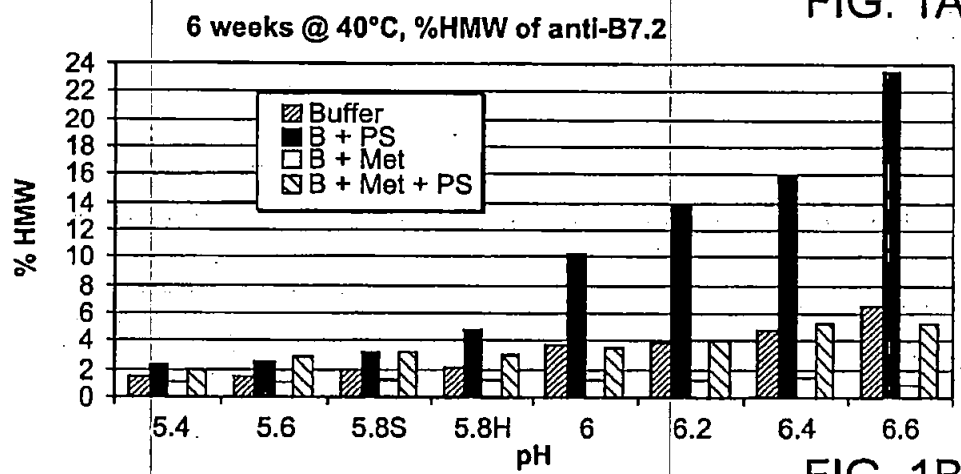


FIG. 1B

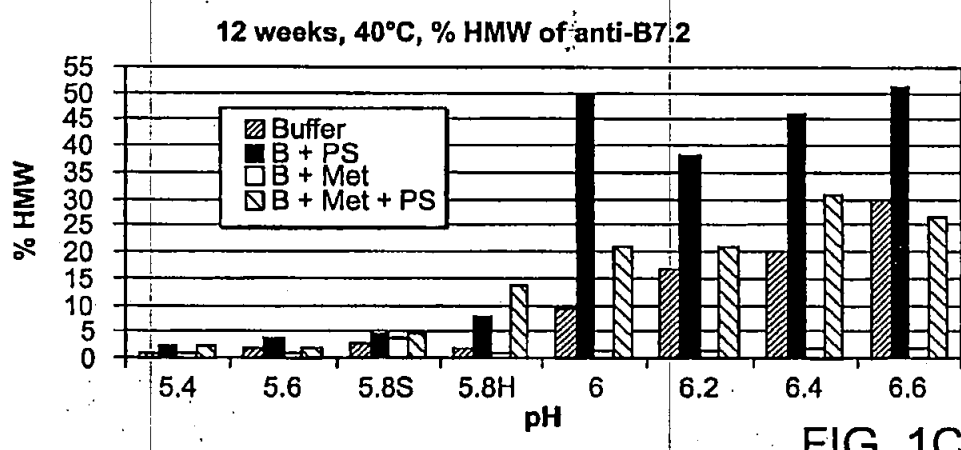


FIG. 1C

98012

2/14

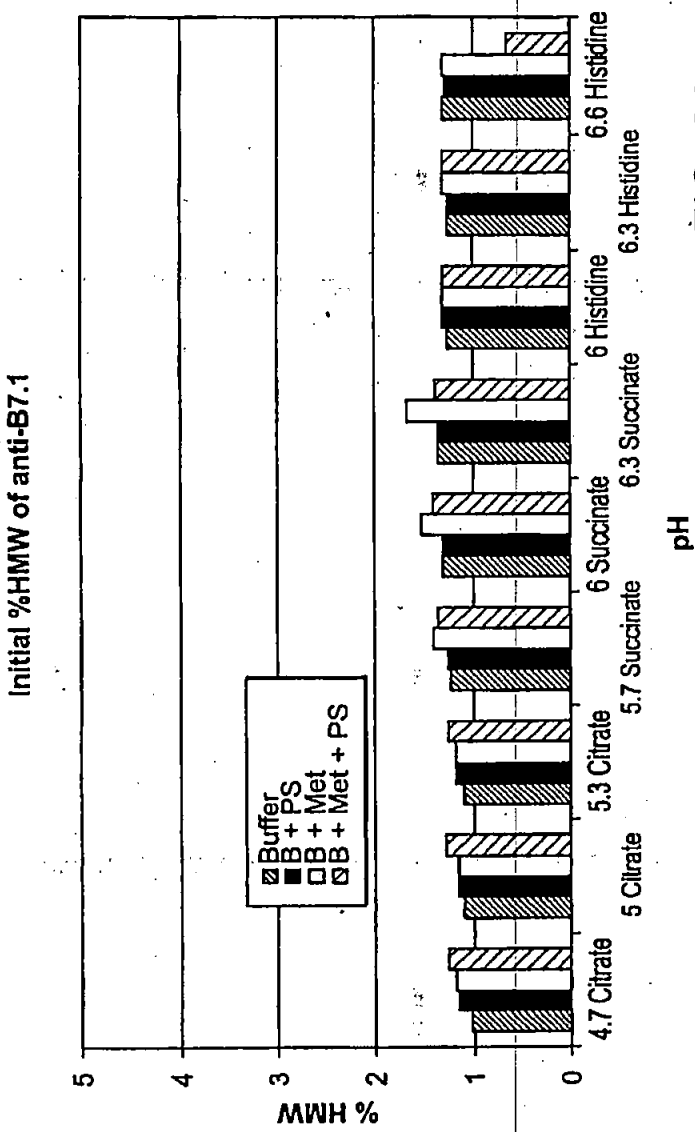


FIG. 2A

00013

3/14

12 weeks @ 40°C, %HMW of anti-B7.1

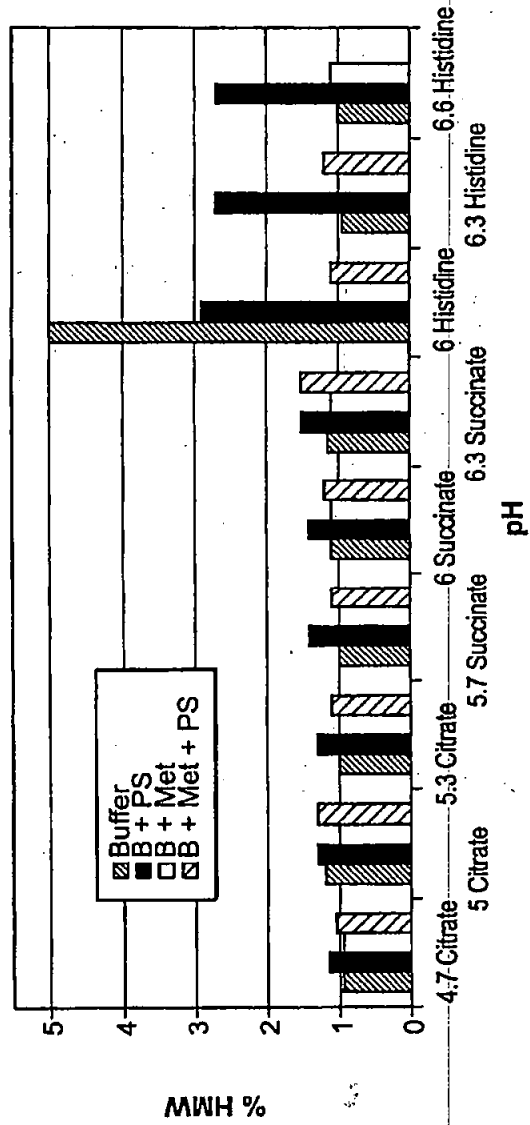


FIG. 2B

98014

4/14

% HMW of anti-CD22 after -80°C Storage

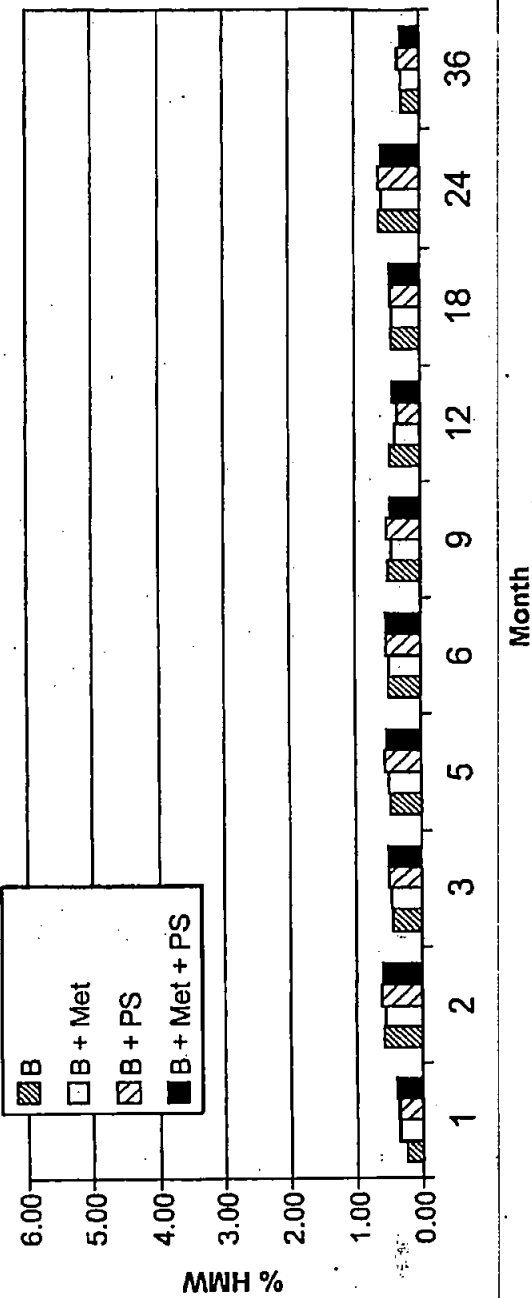
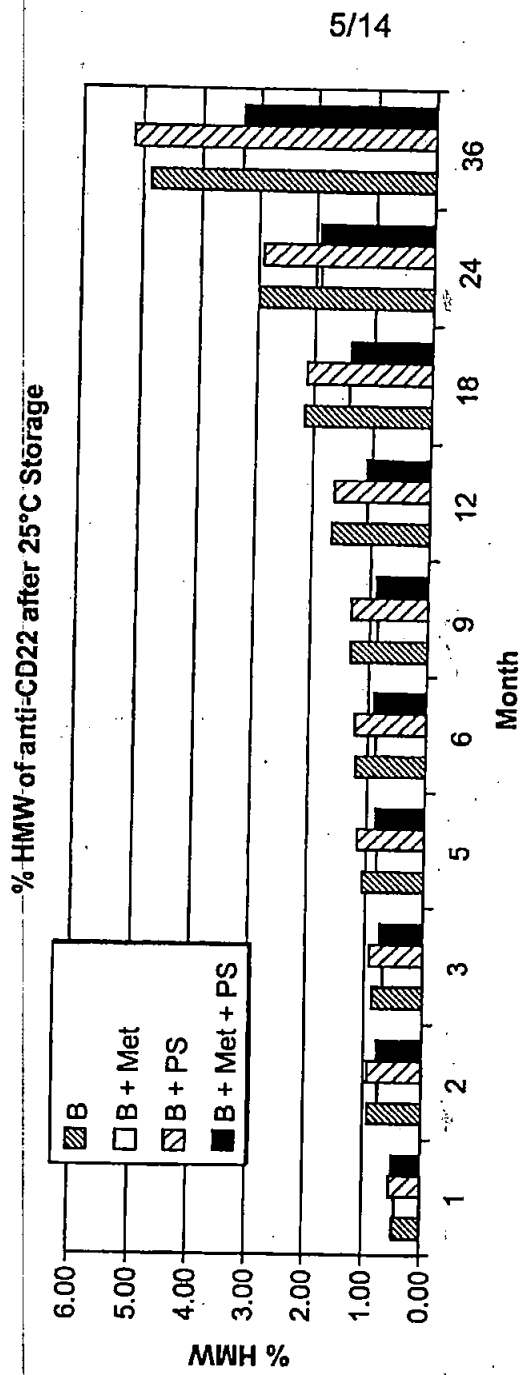


FIG. 3A

03015



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

FIG. 3B

90018

6/14

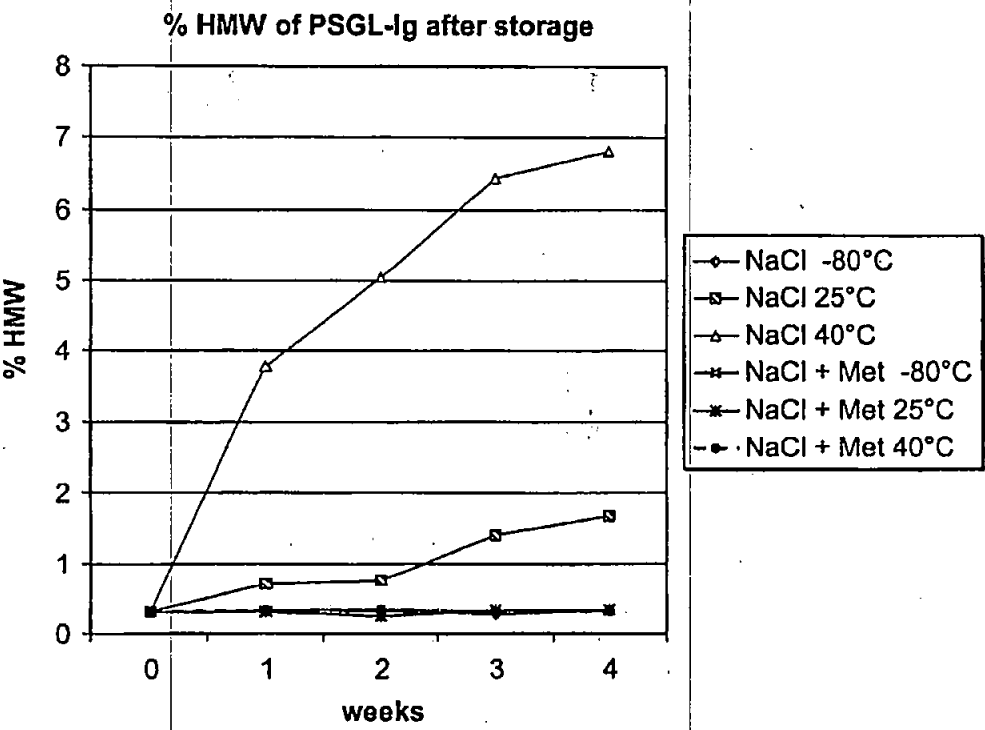


FIG. 4

00017

7/14

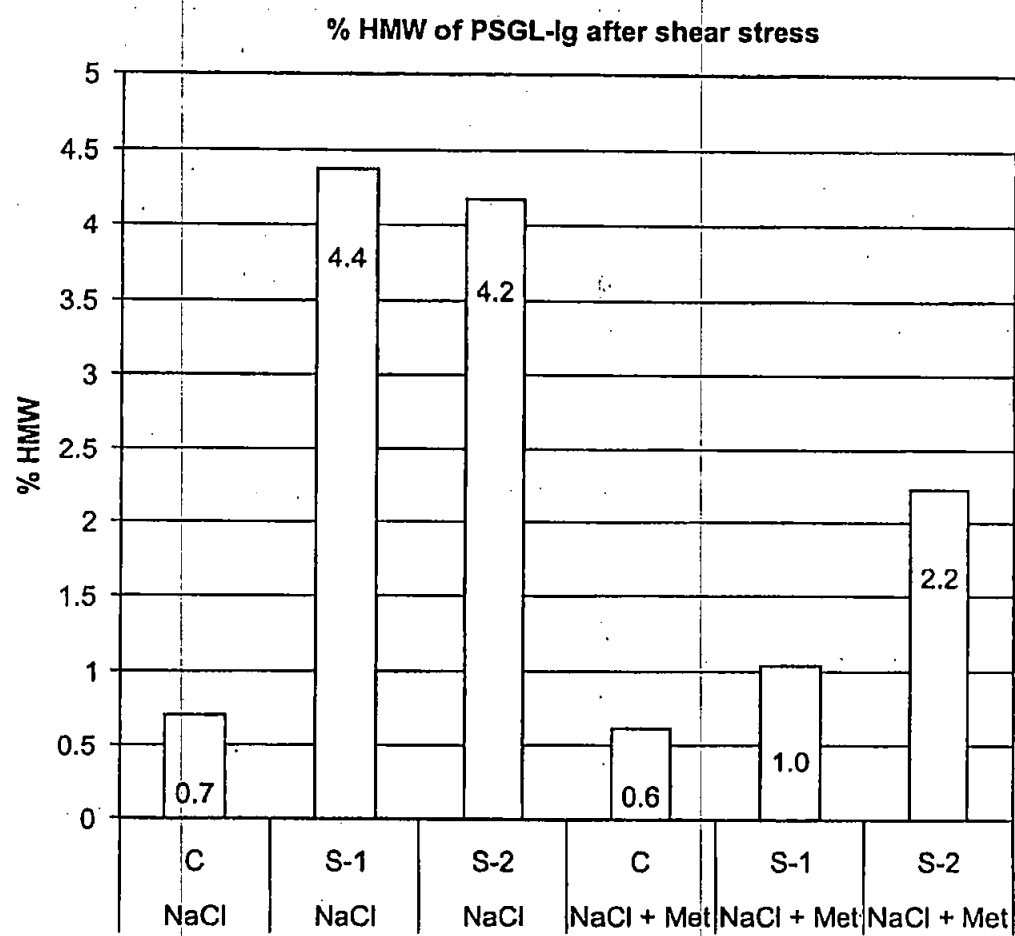


FIG. 5

00018

8/14

Potency of REFRACTO®
After Exposure to Light and Dark Conditions

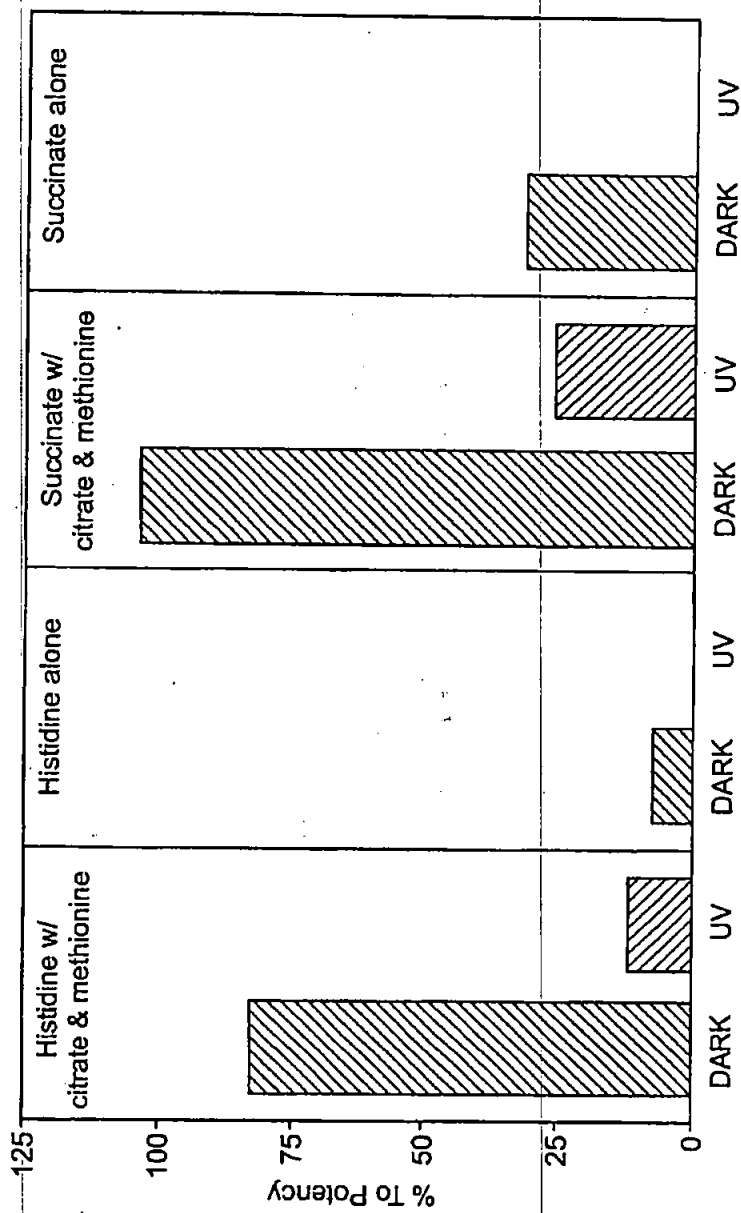


FIG. 6

03079

9/14

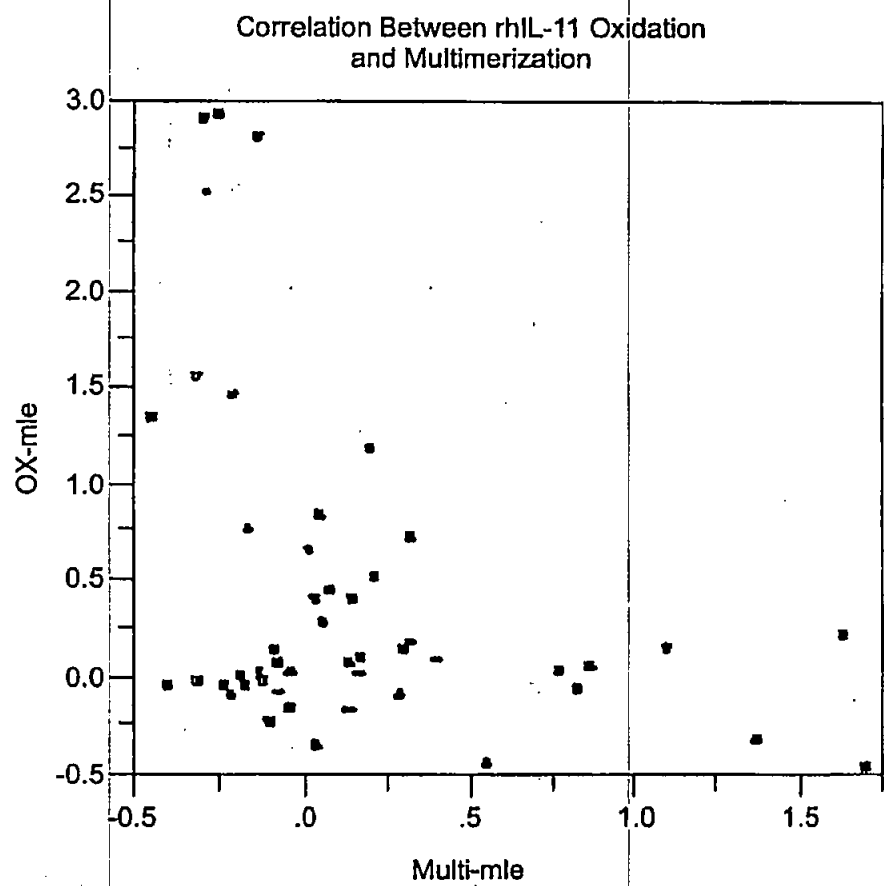


FIG. 7

10/14

Amino Acid Sequence of Anti-B7.1 Antibody

LIGHT CHAIN

Signal Peptide:

-22 MDFHVQIFSF MLISVTVILS SG

h1F1:

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCSVSSSIS SSNLHWYQQK PGKAPKPLIY
51 GTSNLAGGVP SRFSGSGSGT DYTLTISLQ PEDVATYYCQ QWSSYPLTFG
101 QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNE YPREAKVQWK
151 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYLSSTL TLSKADYEKH KVIACEVTHQ
201 GLSSPVTKSF NRGEC

Heavy Chain (SEQ.ID NO:1)

HEAVY CHAIN

Signal Peptide:

-19 MKCSWVIFFL MAVVTGVNS

h1F1:

1 EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKPSGFSNK DYMHWRQA PGQGLEWIGW
51 IDPENGNTLY DPKFQKATI TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREG
101 LFFAYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP
151 EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NEGTQTYTCN

Light Chain

201 VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPFA AAPSVFLFPP KPKDTLMISR

Heavy Chain

251 TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVS
301 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR
351 EEMTKNQVSL TCVKGFIYS DIAVEWESNG QPENNYKTTT PMLDSGGSFF
401 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSP GK

(SEQ ID NO:2)

FIG. 8

03021

11/14

Amino Acid Sequence of Anti-B7.2 Antibody

LIGHT CHAIN

Signal Peptide:

-20 MDSQAQVLIL LLLWVSGTCG

h3D1:

1 DIVLTQSPDS LAVSLGERAT ISCKSSQSLL NSRTRENYLA WYQQKPGQPP
51 KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCTQSYNL
101 YTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

Heavy Chain (SEQ ID NO:3)

HEAVY CHAIN

Signal Peptide:

-19 MGWNCIIFFL VTTATGVHS

h3D1:

1 QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DYAIQWVRQA PGQGLEWIGV
51 INIYYDNTNY NQKFKGKATM TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARAA
101 WYMDYWGQGT LTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP
151 EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN
201 VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPFA AAPSVFLFPP KPKDTLMISR
251 TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVS
301 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR
351 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PMLDSGGSFF
401 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK

Light Chain

Heavy Chain

FIG. 9

(SEQ ID NO:4)

000022

12/14

Amino Acid Sequence of Anti-CD22 Antibody

Heavy Chain of Humanized Anti-CD22 mAbG544

1	MDFGFSLVFL	ALILKGVQCE	VQLVQSGAEV	KKPGASVKVS	CKASGYRFTN
51	YWIHWVRQAP	GQGLEWIGGI	NPGNNYATYR	RKFOGRVTMT	ADTSTSTVYM
101	ELSSLRSED	AVYYCTREGY	GNYGAWFAYW	GQGITLVTVSS	ASTKGPSVFP
151	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
201	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTKT	YTCNVDHKPS	NTKVDKRVES	KYGPPCPPCP
251	APEFLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD
301	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS
351	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE
401	WESNGQPENN	YKTTTPVLDS	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	NVFSCSVMHE
451	ALHNHYTQKS	LSLSLGK		(SEQ ID NO:5)	

Kappa Chain of Humanized Anti-CD22 mAb G544

1	MKLPVRLIVL	LLFWIPASRG	DVQVTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLA
51	NSYGNTFLSW	YLHKPGKAPQ	LLIYGISNRF	SGVPDRFSGS	GS GTDFTLTI
101	SSLQPEDFAT	YYCLQGT HQP	YTFGQGTKVE	IKRTVAAPSV	FIFPPSDEQL
151	KSGTASVVCL	LNNFYPREAK	VQWKVDNALQ	SGNSQESVTE	QDSKDSTYSL
201	SSTLTLSKAD	YEKHKVYACE	VTHQGLSSPV	TKSFNRGEC	
				(SEQ ID NO:6)	

FIG. 10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

03023

FIG. 11A

FIG. 11B

FIG. 11A

Amino Acid Sequence of REFAC[®]TO

1	ATTRYYLGAVELSWDYMQSDDLGELPVDARFPFPRVPKSFPPNTSVVYKKTLL	A1
101	FVEFTDHLFNIAKPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHA	
	VGVSYWKAASEGAEYDDQTSQREKEDDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASD	
201	PI[C]LTYSYLSHVLDLVKDLNSGLIGALLV[C]REGSLAKEKTQTLHKFILLFA	
	VFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG[C]HR	
301	KSVYWHVIGMGTTPPEVHSIFLEGHTFLVRNHRQASLEISPIFTFLTAQTLL	
	MDLGQFLLFCHISSHQHDGMEAYVKVDS[C]PEEPQLRMKNNEEAEDYDDDL	
401	TDSEMDVVRFDNDDNSRSFIQIRSVAKKHPKKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVL	
	APDDRSYKSYLNNGPQRIGRKYKKVRFMAYTDETFKTTREAIQHESGILG	
	PLLYGEVGDTLILIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD	A2
501	FPIILPGEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPR[C]LTRYYSFVNMERDLASGLIGP	
601	LLI[C]YKESVDQQRGNQIMSDKRNVILFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAG	
	VQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDSLQLSV[C]LHEVAYWYILSIGAQTDFLS	
701	VFFSGYTFKHK[MVYEDTLLTFPFSGETVFMSPMENPGLWILGCHNSDFERNR	
	GMTALLKVSS[C]DKNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRSFQNPPVLK	
	RHQR	

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCTNOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 03 July 2007 (03.07.2007)		To: SUPERKO, Colleen Wilmer Cutler Pickering Hale and Dorr LLP 60 State Street Boston, MA 02109 ETATS-UNIS D'AMERIQUE	
Applicant's or agent's file reference 36119.249WO/AM101947			IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2007/006787	International filing date (day/month/year) 19 March 2007 (19.03.2007)		
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 20 March 2006 (20.03.2006)		
Applicant WYETH et al			

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
20 March 2006 (20.03.2006)	60/784,130	US	11 June 2007 (11.06.2007)

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland	Authorized officer Beate Giffo-Schmitt
Facsimile No. +41 22 338 82 70	Facsimile No. +41 22 338 82 70
Form PCT/IB/304 (October 2005)	Telephone No. +41 22 338 74 03

I/DA1VAVYR0

MÉTODOS PARA REDUCIR LA AGLOMERACIÓN DE PROTEÍNA

CAMPO DE LA INVENCION

El campo se refiere a métodos para reducir la
5 aglomeración de proteínas y formulaciones de proteína que
tienen niveles reducidos de aglomeración.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La terminación del proyecto de genoma humano,
10 acoplado con el desarrollo de métodos mejorados para el
aislamiento y purificación de proteínas, han hecho la
producción a gran escala de formulaciones de proteínas una
realidad. En efecto, existen más de un ciento de proteínas
recombinantes en ensayos clínicos Fase I, o más allá, unas
15 varias docenas han recibido la aprobación de la
Administración de Alimentos y Fármacos. Las formulaciones que
aseguran un suministro eficiente y seguro de proteínas o
péptidos en una forma biológicamente activa, son clave para
el éxito comercial de productos de biotecnología actuales y
20 futuros.

Desafortunadamente, las proteínas poseen
propiedades físicas y químicas únicas, las cuales crean
dificultades en la formulación y desarrollo. Las
inestabilidades físicas y químicas de las proteínas, poseen
25 cambios significantes en el desarrollo de formulaciones de

proteínas adecuadas. La inestabilidad física más común de proteínas, es la aglomeración de proteína y su equivalente macroscópico, precipitación. La tendencia de proteínas para aglomerarse es un problema especialmente desafiante en la
5 biotecnología y la industria farmacéutica, en donde se desea sintetizar, procesar y almacenar proteínas a las concentraciones más altas posibles, y sobre periodos prolongados de tiempo.

Mientras los mecanismos que conducen la
10 aglomeración de proteína no son completamente entendidos, los resultados finales son sin embargo, indeseables. La formación de aglomerado por un polipéptido en una composición farmacéutica, puede afectar adversamente, la actividad biológica de tal polipéptido, resultando en pérdida de la
15 eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, las proteínas en un estado aglomerado, pueden ser inmunogénicas y pueden aún, tener efectos tóxicos *in vivo*. Además, la formación de aglomerado puede causar otros problemas durante la administración de la formulación de
20 proteína, tal como bloqueo de jeringas, entubado, membranas o bombas. Por consiguiente, existe una necesidad en la técnica, de métodos para reducir los problemas de aglomeración y desarrollar formulaciones de proteínas que presentan niveles reducidos de aglomeración.

25

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

Esta solicitud se refiere a formulaciones de proteínas que presentan propiedades reducidas de aglomeración y a métodos para elaborar tales formulaciones.

5 En un aspecto, la solicitud se refiere a un método para reducir la aglomeración de una proteína o proteínas en una formulación, agregando metionina a la formulación a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM. El método reduce la aglomeración de proteína o
10 proteínas en la formulación, comparado con el nivel de aglomeración de la misma proteína o proteínas formuladas en una formulación idéntica, excepto que carecen de metionina. En una modalidad específica, el método de agregar metionina a una formulación a una concentración de aproximadamente 0.5 mM
15 hasta aproximadamente 145 mM, reduce la aglomeración de la proteína o proteínas en la formulación, en donde la formulación es sometida a condiciones que promueven o facilitan la aglomeración de proteína, comparada con el nivel de aglomeración de la misma proteína o proteínas formuladas
20 en una formulación idéntica, excepto que carecen de metionina, y se someten a las mismas condiciones que promueven la aglomeración de proteína.

En ciertas modalidades, se agrega metionina a la formulación, a una concentración final de entre
25 aproximadamente 0.5 mM y aproximadamente 50 mM. En

modalidades específicas, se agrega metionina a la formulación final, a una concentración de 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 7.5 mM, 10 mM, 12.5 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, y 45 mM. En ciertas modalidades, el método de agregar metionina a una formulación de proteína a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM, en donde la formulación de proteína es sometida a condiciones que conducen a la aglomeración de proteína, resulta en una formulación que tiene a lo sumo aproximadamente 5%, a lo sumo aproximadamente 4%, a lo sumo aproximadamente 3%, a lo sumo aproximadamente 2%, a lo sumo aproximadamente 1%, o a lo sumo aproximadamente 0.5% de especies de alto peso molecular (APM), medidas por la cromatografía de exclusión de tamaño-cromatografía líquida de alta resolución (CET-CLAR), después que la formulación es sometida a condiciones que promueven la aglomeración de proteína.

En algunas modalidades, el método de agregar metionina a una formulación de proteína a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM, incrementa la vida de anaquel de la formulación de proteína, comparada con la formulación que carece de metionina. En otras modalidades, el método de agregar metionina a una formulación de proteína a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM, mantiene la potencia de la formulación de proteína, comparada con una

formulación que carece de metionina. En ciertas modalidades, el método de agregar metionina a una formulación de proteína a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM (por ejemplo, aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 145 mM), reduce la inmunogenicidad de la formulación de proteína, comparada con una formulación que carece de proteína.

El método es más empleado para proteínas conocidas como aglomerados, o consideradas como agregados, basado en la homología a proteínas que se aglomeran, o basado en datos experimentales que sugieren la probabilidad de aglomeración. En una modalidad, la proteína dentro de una formulación, se aglomera durante el almacenaje. En algunas modalidades, la proteína dentro de una formulación, se aglomera como un resultado de la resistencia al corte. En otras modalidades, la proteína dentro de una formulación, se aglomera como un resultado de temperatura elevada. En otras modalidades, la proteína dentro de una formulación, se aglomera como un resultado de la exposición a luz. En otras modalidades, la proteína dentro de una formulación, se aglomera como un resultado de la presencia de ciertos azúcares, o tensoactivos, en la formulación. La adición de metionina a las formulaciones que son expuestas, o probablemente serán expuestas a tales condiciones, es efectiva en la reducción de formación de aglomerado, con ello, manteniendo la actividad

biológica y potencia de la proteína o proteínas dentro de una formulación.

En algunas modalidades, la aglomeración de la proteína o proteínas de la formulación, se determina antes de
5 agregar metionina a la formulación. En otras modalidades, la aglomeración de la proteína o proteínas de la formulación, se determina después de agregar metionina a la formulación. En todavía modalidades adicionales, la aglomeración de la proteína o proteínas de la formulación, se determina antes y
10 después de agregar metionina a la formulación. La aglomeración de la proteína o proteínas de una formulación, se puede determinar por cualquier método conocido por uno de habilidad ordinaria en la técnica que incluye, pero no se limita a, cromatografía de exclusión de tamaño-cromatografía
15 líquida de alta resolución (CET-CLAR), cromatografía líquida de alta resolución-fase inversa (FI-CLAR), absorbancia de UV, mediciones de velocidad de sedimentación y combinaciones de los mismos. En modalidades específicas, las especies en porcentaje de alto peso molecular (% de APM) en una
20 formulación, que comprenden aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 145 mM de metionina, se reducen por al menos, aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, o 75%, comparadas con % de especies de AMP en la formulación idéntica, excepto que carecen de
25 metionina. En otras modalidades específicas, una formulación

que comprende aproximadamente 1 hasta aproximadamente 145 mM de metionina, tienen a lo sumo aproximadamente 5%, a lo sumo aproximadamente 4%, a lo sumo aproximadamente 3%, a lo sumo aproximadamente 2%, a lo sumo aproximadamente 1%, o a lo sumo aproximadamente 0.5%, de especies de alto peso molecular (APM). La aglomeración de una proteína o proteínas en una formulación, puede ser medida en cualquier tiempo después que la formulación es preparada, ya sea con o sin metionina. En ciertas modalidades, la aglomeración puede ser medida un día después de formular la proteína, entre 1 semana y 12 semanas, o entre 1 mes y 36 meses después de formular la proteína de interés.

En algunas modalidades, la proteína de la formulación es un anticuerpo, una proteína de fusión de inmunoglobulina (Ig), un factor de coagulación, un receptor, un ligando, una enzima, un factor de transcripción, o un fragmento biológicamente activo de cualquiera de estas proteínas. En modalidades específicas, la proteína es un anticuerpo anti-B7.1, un anticuerpo anti-B7.2, un anticuerpo anti-CD22, una proteína de fusión PSGL-Ig, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, o un fragmento biológicamente activo de cualquiera de estas proteínas. En algunas modalidades, la proteína se formula a una concentración desde aproximadamente 0.1 mg/ml hasta aproximadamente 250 mg/ml en la formulación.

En algunas modalidades, la proteína es formulada a una concentración desde aproximadamente 0.1 mg/ml hasta aproximadamente 200 mg/ml en la formulación. En otras modalidades, la proteína se formula a una concentración desde
5 aproximadamente 0.1 mg/ml hasta aproximadamente 100 mg/ml en la formulación. En algunas modalidades, la proteína es formulada a una concentración desde aproximadamente 0.1 mg/ml hasta aproximadamente 10 mg/ml en la formulación. En ciertas modalidades, la proteína es formulada como un líquido o un
10 polvo secado por congelamiento.

En ciertas modalidades, la formulación de proteína comprende un tensoactivo. En modalidades específicas, en tensoactivo es polisorbato-20 o polisorbato-80. En ciertas otras modalidades, la formulación de proteína carece de un
15 tensoactivo. En ciertas modalidades, la formulación de proteína comprende un modificador de la tonicidad. En modalidades específicas, el modificador de tonicidad es cloruro de sodio, manitol, o sorbitol. En ciertas otras modalidades, la formulación de proteína comprende un azúcar.
20 En modalidades específicas, el azúcar es sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol, o xilitol. En ciertas otras modalidades, la formulación de proteína carece de un azúcar. En algunas modalidades, el pH de la formulación está entre aproximadamente 5.0 y 8.0. En otras modalidades, el pH de la
25 formulación está entre aproximadamente 5.8 y 6.6.

En otras modalidades, la formulación de proteína además comprende uno o más agentes que reducen la aglomeración de la proteína de la formulación. En algunas modalidades, el agente que reduce la aglomeración de la proteína de la formulación es un aminoácido. En modalidades específicas, el aminoácido es arginina, lisina, glicina, ácido glutámico o ácido aspártico. En algunas modalidades, el aminoácido se agrega a una formulación de proteína a una concentración desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 300 mM. En algunas otras modalidades, el aminoácido se agrega a una formulación de proteína a una concentración desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 150 mM. En otras modalidades, el agente que reduce la aglomeración de la proteína de la formulación, es una combinación de queladores de metal. En modalidades específicas, los queladores de metal son DTPA, EGTA, y DEF. En algunas modalidades, la concentración de DTPA o EGTA en la formulación de proteína es desde aproximadamente 1 μ M hasta aproximadamente 5 mM. En algunas modalidades, la concentración de DEF en la formulación de proteína es desde aproximadamente 1 μ M hasta aproximadamente 10 mM. En otras modalidades, el agente que reduce la aglomeración de la proteína de la formulación, es un depurador de radical libre, especialmente un depurador de radicales de oxígeno. En modalidades específicas, el depurador de radical libre es

manitol o histidina. En algunas modalidades, la concentración de manitol en la formulación de proteína es desde aproximadamente 0.01% hasta aproximadamente 25%. En algunas modalidades, la concentración de histidina en la formulación de proteína es desde aproximadamente 100 μ M hasta aproximadamente 200 mM. En otras modalidades, el agente que reduce la aglomeración de la proteína de la formulación, es una combinación de un quelador de metal y un depurador de radical libre. En ciertas otras modalidades, el agente que reduce la aglomeración es citrato. En ciertas modalidades, la concentración de citrato en la formulación de proteína es desde aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 25 mM.

En otro aspecto, la solicitud proporciona un método para reducir la aglomeración de una proteína en una formulación, en donde la aglomeración no contiene un residuo de metionina, o contiene menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, ó 2 residuos de metionina, agregando metionina a la formulación a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM. El método resulta en aglomeración reducida de la proteína en la formulación, comparada con la misma proteína en la formulación idéntica, excepto que carece de metionina. En ciertas modalidades, se agrega metionina a la formulación final a una concentración de entre aproximadamente 0.5 mM y aproximadamente 50 mM. En modalidades específicas, se agrega metionina a la formulación

a una concentración final de 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 7.5 mM, 10 mM, 12.5 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM y 45 mM. En otras modalidades, el método de agregar aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM de metionina a una formulación de proteína en donde la proteína no contiene un residuo de metionina, o contiene menos de 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3 ó 2 residuos de metionina, resulta en una formulación que tiene a lo sumo aproximadamente 5%, a lo sumo aproximadamente 4%, a lo sumo aproximadamente 3%, a lo sumo aproximadamente 2%, a lo sumo aproximadamente 1%, o a lo sumo aproximadamente 0.5%, de especies de alto peso molecular (APM).

En otro aspecto, la solicitud proporciona un método para reducir la aglomeración de una proteína en una formulación de proteína, en donde la aglomeración no es causada por oxidación de metionina. El método involucra agregar metionina a la formulación a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM. El método resulta en aglomeración reducida de la proteína en la formulación, comparada con la misma proteína en la formulación idéntica, excepto que carece de metionina. En ciertas modalidades, se agrega metionina a la formulación a una concentración final de entre aproximadamente 0.5 mM y aproximadamente 50 mM. En modalidades específicas, se agrega metionina a la formulación a una concentración final de 0.5

mM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 7.5 mM, 10 mM, 12.5 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM y 45 mM. En otras modalidades, el método de agregar aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM de metionina a una formulación, resulta en una formulación que tiene a lo sumo aproximadamente 5%, a lo sumo aproximadamente 4%, a lo sumo aproximadamente 3%, a lo sumo aproximadamente 2%, a lo sumo aproximadamente 1%, o a lo sumo aproximadamente 0.5%, de especies de alto peso molecular (APM).

En aún otro aspecto, se proporciona un método para reducir la aglomeración de una proteína formulada con un tensoactivo. En ciertas modalidades, el tensoactivo ocasiona que la proteína se aglomere. El método involucra agregar metionina a la formulación a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM. El método resulta en aglomeración reducida de la proteína en la formulación, comparada con la misma proteína en la formulación idéntica, excepto que carece de metionina. En ciertas modalidades, se agrega metionina a la formulación a una concentración final de entre aproximadamente 0.5 mM y aproximadamente 50 mM. En otras modalidades, se agrega metionina a la formulación a una concentración final de 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 7.5 mM, 10 mM, 12.5 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM y 45 mM. En modalidades específicas, el método de agregar aproximadamente 0.5 mM

hasta aproximadamente 145 mM de metionina a una formulación formulada con un tensoactivo, resulta en una formulación que tiene a lo sumo aproximadamente 5%, a lo sumo aproximadamente 4%, a lo sumo aproximadamente 3%, a lo sumo aproximadamente 2%, a lo sumo aproximadamente 1%, o a lo sumo aproximadamente 0.5%, de especies de alto peso molecular (APM).

En un aspecto adicional, el método de agregar metionina a una formulación a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM, reduce la aglomeración de una proteína sometida a resistencia al corte. El método involucra agregar la metionina antes de, al mismo tiempo como, o después que la formulación es sometida a resistencia al corte. El método resulta en reducir la aglomeración de la proteína en la formulación, comparada con la misma proteína en la formulación idéntica, excepto que carece de metionina. En ciertas modalidades, se agrega metionina a una concentración final de entre aproximadamente 0.5 mM y aproximadamente 50 mM. En modalidades específicas, se agrega metionina a la formulación a una concentración final de 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 7.5 mM, 10 mM, 12.5 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM y 45 mM. En algunas modalidades, la resistencia al corte es ocasionada por agitación, sacudimiento, congelación-descongelación, transportación, extracción en una jeringa o procedimientos de purificación. En modalidades específicas, el método de

agregar aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM de metionina a una formulación sometida a resistencia al corte, resulta en una formulación que tiene a lo sumo aproximadamente 5%, a lo sumo aproximadamente 4%, a lo sumo
5 aproximadamente 3%, a lo sumo aproximadamente 2%, a lo sumo aproximadamente 1%, o a lo sumo aproximadamente 0.5%, de especies de alto peso molecular (APM).

En un aspecto todavía adicional, un método de agregar metionina a una formulación a una concentración de
10 aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM, reduce la aglomeración de una proteína expuesta a luz. En ciertas modalidades, se agrega metionina a la formulación a una concentración final de entre aproximadamente 0.5 mM y aproximadamente 50 mM. En modalidades específicas, se agrega
15 metionina a la formulación a una concentración final de 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 7.5 mM, 10 mM, 12.5 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM y 45 mM. En algunas modalidades, la luz es luz fluorescente. En otras modalidades, la luz es luz solar. En modalidades adicionales, la luz es luz UV. El
20 método involucra agregar metionina antes de, al mismo tiempo como, o después de que la formulación es expuesta a la luz. En ciertas modalidades, se agrega metionina antes de y al mismo tiempo como, o después de la exposición de la formulación a la luz. El método de agregar metionina a una
25 formulación a una concentración de aproximadamente 0.5 mM a

aproximadamente 145 mM, resulta en reducción de la aglomeración de la proteína en la formulación comparada con la misma proteína en la formulación idéntica, excepto que carece de metionina. En modalidades específicas, el método de
5 agregar aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM de metionina a una formulación expuesta a la luz, resulta en una formulación que tiene a lo sumo aproximadamente 5%, a lo sumo aproximadamente 4%, a lo sumo aproximadamente 3%, a lo sumo aproximadamente 2%, a lo sumo aproximadamente 1%, o a lo
10 sumo aproximadamente 0.5%, de especies de alto peso molecular (APM).

En otro aspecto, un método de agregar metionina a una formulación a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM, disminuye una pérdida en
15 potencia o actividad biológica de una proteína en una formulación de proteína. El método resulta en reducción de la aglomeración de proteína en la formulación, con ello, manteniendo la potencia o actividad funcional de la proteína. En ciertas modalidades, se agrega metionina a la formulación
20 a una concentración final de entre aproximadamente 0.5 mM y aproximadamente 50 mM. En modalidades específicas, se agrega metionina a la formulación a una concentración final de 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 7.5 mM, 10 mM, 12.5 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM y 45 mM. En modalidades
25 específicas, el método de agregar aproximadamente 0.5 mM

hasta aproximadamente 145 mM de metionina a una formulación, resulta en una formulación que tiene a lo sumo aproximadamente 5%, a lo sumo aproximadamente 4%, a lo sumo aproximadamente 3%, a lo sumo aproximadamente 2%, a lo sumo aproximadamente 1%, o a lo sumo aproximadamente 0.5%, de especies de alto peso molecular (APM).

En un aspecto diferente, la solicitud proporciona formulaciones de proteína que comprenden un péptido/péptidos, una proteína/proteínas, o un péptido/péptidos y una proteína/proteínas, y aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 50 mM de metionina. En modalidades específicas, la metionina se agrega metionina a la formulación a una concentración final de 0.5 mM, 1 mM, 2.5 mM, 5 mM, 7.5 mM, 10 mM, 12.5 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM y 45 mM. En algunas modalidades de este aspecto, la proteína de la formulación es un anticuerpo, una proteína de fusión Ig, un factor de coagulación, un receptor, un ligando, una enzima, un factor de transcripción, o un fragmento biológicamente activo de estas proteínas. En modalidades específicas, la proteína es un anticuerpo anti-B7.1, un anticuerpo anti-B7.2, un anticuerpo anti-CD22, una proteína de fusión PSGL-Ig, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII, o un fragmento biológicamente activo de cualquiera de estas proteínas. En otras modalidades, las proteínas tienen al

menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, de identidad de secuencia de aminoácido a un anticuerpo anti-B7.1, un anticuerpo anti-B7.2, un anticuerpo anti-CD22, una proteína de fusión PSGL-Ig, Factor VIIa, Factor VIII, Factor IX, Factor X, Factor XI, Factor XII, Factor XIII. En algunas modalidades, la formulación comprende un amortiguador. En modalidades específicas, el amortiguador es un amortiguador de histidina, un amortiguador de citrato, un amortiguador de succinato, o un amortiguador Tris. En ciertas modalidades, la formulación tiene un pH de aproximadamente 5.0 hasta aproximadamente 8.8. En otras modalidades, la formulación tiene un pH de aproximadamente 6.0 hasta aproximadamente 7.5. En algunas modalidades, la formulación comprende otro agente que puede reducir la aglomeración de proteínas. La formulación puede adicionalmente, comprender un azúcar, un tensoactivo, un agente de volumen, un crioprotector, un agente estabilizante, un anti-oxidante, o una combinación de estos. En algunas modalidades, el péptido(s)/proteína(s) de la formulación, está a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml y aproximadamente 300 mg/ml en la formulación. En otras modalidades, el péptido(s)/proteína(s) de la formulación, está a una concentración de aproximadamente 0.1 mg/ml y

aproximadamente 10 mg/ml en la formulación. En ciertas modalidades, la proteína es formulada como un líquido, o un polvo secado por congelamiento. En ciertas modalidades, las formulaciones de proteínas se proporcionan como kits. Tales kits pueden incluir amortiguadores, excipientes e instrucciones para uso de las formulaciones de proteínas.

En otro aspecto, la solicitud proporciona métodos de tratamiento, prevención y/o diagnóstico, usando las formulaciones de proteínas descritas en este documento.

10

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1a es una gráfica de barras que representa el porcentaje inicial de especies de alto peso molecular (% de APM) en una formulación de anti-B7.2, formulada en la presencia y ausencia de 10 mM de metionina (Met) y 0.01% de polisorbato-80 (PS) en los niveles de pH indicados.

La Figura 1b es una gráfica de barras que representa el % de especies de APM en una formulación de anti-B7.2, formulada en la presencia y ausencia de 10 mM de metionina (Met) y 0.01% de polisorbato-80 (PS) en los niveles de pH indicados, después de 6 semanas de almacenaje a 40°C.

La Figura 1c es una gráfica de barras que representa el % de especies de APM en una formulación de anti-B7.2, formulada en la presencia y ausencia de 10 mM de

metionina (Met) y 0.01% de polisorbato-80 (PS) en los niveles de pH indicados, después de 12 semanas de almacenaje a 40°C.

La Figura 2a es una gráfica de barras que representa el % de especies de APM en una formulación de anti-B7.2, formulada en los amortiguadores citrato, succinato e histidina (sobre varios intervalos de pH) en la presencia y ausencia de 10 mM de metionina (Met) y 0.01% de polisorbato-80 (PS).

La Figura 2b es una gráfica de barras que representa el % de especies de APM en una formulación de anti-B7.2, formulada en los amortiguadores citrato, succinato e histidina (sobre varios intervalos de pH) en la presencia y ausencia de 10 mM de metionina (Met) y 0.01% de polisorbato-80 (PS), después de 12 semanas de almacenaje a 40°C.

La Figura 3a es una gráfica de barras que representa el % de especies de APM presentes en una formulación de anticuerpo anti-CD22, después de almacenaje por 1 mes hasta 36 meses a -80°C.

La Figura 3b es una gráfica de barras que representa el % de especies de APM presentes en una formulación de anticuerpo anti-CD22, después de almacenaje por 1 mes hasta 36 meses a 25°C.

La Figura 4 es una gráfica que representa el % de especies de APM presentes en una formulación de proteína de

PSGL-Ig, formulada con o sin metionina, después de almacenaje por hasta 4 semanas a -80°C, 25°C y 40°C.

La Figura 5 es una gráfica de barras que representa el % de especies de APM en una formulación de proteína de PSGL-Ig sometidas a resistencia al corte en la presencia (S1- y S-2) o ausencia (C) de metionina.

La Figura 6 es una gráfica de barras que representa la potencia de REFECTO® formulada en amortiguadores de histidina o succinato, con o sin metionina, después de la exposición a condiciones de luz y oscuridad por un periodo de 1 mes.

La Figura 7 es una representación esquemática que muestra la correlación entre la oxidación y multimerización de rhIL-11.

La Figura 8 proporciona las secuencias de aminoácido de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo anti-B7.1. Los enlaces de disulfuro intramolecular predichos, se ilustran por conexiones de los residuos de cisteína involucrados. Las cisteínas esperadas por formar enlaces de disulfuro intramolecular, son subrayadas y se indica la conectividad. Los dos residuos alterados en la porción Fc que reduce la función efectora son enmarcados. El sitio consenso de glicosilación N-ligada, está en *itálicas negritas*.

La Figura 9 proporciona las secuencias de aminoácido de las cadenas ligera y pesada de un anticuerpo

anti-B7.2. Los enlaces disulfuro intramoleculares predichos, se ilustran por conexiones de los residuos de cisteína involucrados. Las cisteínas esperadas para formar enlaces disulfuro intramoleculares, son subrayadas y se indica la conectividad. Los dos residuos alterados en la porción Fc que reduce la función efectora son enmarcados. El sitio consenso de glicosilación N-ligada, está en itálicas negritas.

La Figura 10 proporciona las secuencias de aminoácido de las cadenas pesada y ligera de un anticuerpo anti-CD22. La secuencia subrayada es la secuencia señal y las regiones que determinan la complementariedad se muestran en letras negritas. Se subraya un sitio potencial para la glicosilación N-ligada.

La Figura 11 proporciona la secuencia de aminoácido de REFACTO® (véase, Sandberg H. et al., Structural and Functional Characterization of B-Domain Deleted Recombinant Factor VIII, *Seminars in Hematology*, Vol. 38, No. 2, Suppl. 4, pp 4-12, April 2001).

20

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Recientes avances en biotecnología han proporcionado una amplia variedad de formulaciones de proteínas biológicamente activas, para uso en diagnósticos y terapia. Sin embargo, el desarrollo, producción, suministro, seguridad y estabilidad de tales formulaciones de proteína,

poseen desafíos significantes. Un problema principal con las formulaciones de proteína, es que pueden perder su actividad biológica, como un resultado de la formulación de aglomerados solubles o insolubles. La aglomeración es un estado de proteína degradada, y por lo tanto, minimiza sus resultados en la vida de anaquel incrementada, potencia, o actividad de una formulación de proteína.

Esta solicitud en general, se refiere al descubrimiento de que la adición de la metionina de aminoácido a una formulación de proteína a una concentración final de entre aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM, reduce la aglomeración de la proteína o proteínas en la formulación, con ello, incrementando la vida de anaquel y manteniendo la actividad biológica de la formulación, con relación a las formulaciones de proteínas preparadas sin metionina.

Factores que Afectan la Aglomeración de Proteína

Las proteínas tienen una amplia variedad de usos farmacéuticos, biotécnicos y de investigación. En varias etapas en cualquiera de estos usos, las proteínas pueden aglomerarse. Por "aglomerado", significa una interacción física entre las moléculas de proteína que resultan en la formación de dímeros u oligómeros covalentes o no covalentes, los cuales pueden permanecer solubles, o formar aglomerados

insolubles que precipitan de la solución. El término "proteína", como se usa en este documento, abarca un péptido, un polipéptido, una proteína, y una proteína de fusión. Las proteínas pueden ser elaboradas por métodos recombinantes o
5 sintéticos.

Muchos diferentes factores pueden ocasionar la aglomeración de una proteína en una formulación de proteína. Los procedimientos de purificación y almacenaje típicos, pueden exponer las formulaciones de proteínas a condiciones y
10 componentes que ocasionan que la proteína se aglomere. Por ejemplo, las proteínas en una formulación de proteína, pueden aglomerarse como un resultado de cualquiera o más de los siguientes: almacenaje, exposición a temperaturas elevadas, pH de la formulación, fuerza iónica de la formulación, y la
15 presencia de ciertos tensoactivos (por ejemplo, polisorbato-20 y polisorbato-80) y agentes emulsificantes. El término "durante almacenaje", como se usa en este documento, significa una formulación que una vez preparada, no es usada inmediatamente; preferentemente, después de su preparación,
20 es envasada para almacenaje, ya sea en una forma líquida, en un estado congelado, o en una forma seca para constitución posterior en una forma líquida u otra forma. Por "temperatura elevada", significa cualquier temperatura arriba de la temperatura en la cual la proteína es normalmente almacenada.

25 De manera similar, las proteínas pueden aglomerarse

cuando se exponen a resistencia al corte, tal como, reconstituyendo una pasta de proteína liofilizada en solución, filtración-purificación de una muestra de proteína, congelación-descongelamiento, sacudimiento o transferencia de una solución de proteína vía jeringa. La aglomeración puede también ocurrir como un resultado de interacciones de moléculas de polipéptido en solución y a las interfaces líquido-aire dentro de los viales de almacenaje. Los canales conformacionales pueden ocurrir en polipéptidos adsorbidos a interfaces aire-líquido y sólido-líquido, durante la compresión o extensión de las interfaces que resultan de la agitación durante el transporte. Tal agitación puede ocasionar que la proteína de una formulación se aglomere y finalmente, precipite con otras proteínas adsorbidas.

Además, la exposición de una formulación de proteína a la luz, puede ocasionar que la proteína se aglomere. La exposición a la luz puede crear especies reactivas que facilitan la aglomeración. En algunas modalidades, la luz es luz fluorescente. En otras modalidades, la luz es luz solar. En modalidades adicionales, la luz es luz UV.

Además, el envasado de la formulación de proteína puede impactar la aglomeración de proteína. Niveles rastro de metales (niveles en ppm de cobre, hierro, cobalto, manganeso), pueden lixiviar el envasado del contenedor,

promoviendo a la hidrólisis del enlace amida, y finalmente, resultando en aglomeración de la proteína.

La presente solicitud proporciona métodos y composiciones que reducen la aglomeración de proteínas controlando uno o más de los mecanismos de aglomeración mencionados anteriormente. Esto puede resultar en, por ejemplo, estabilidad mejorada del producto, y mayor flexibilidad en los procesos de manufacturación y condiciones de almacenaje.

10

Métodos para Reducir la Aglomeración de una Proteína en una Formulación de Proteína

Esta solicitud se refiere en general, al descubrimiento de que agregar la metionina de aminoácido a una formulación, puede reducir la aglomeración de una proteína o proteínas en la formulación. La reducción en aglomeración es relativa a una formulación idéntica, excepto que carece de metionina. Para reducir la aglomeración, se agrega metionina a la formulación a una concentración final de entre aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM. Como se usa en esta solicitud, "aproximadamente", significa un valor numérico que tiene un intervalo de $\pm 25\%$ alrededor del valor citado. En algunas modalidades, se agrega metionina a una concentración final de entre aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 10 mM. En otras modalidades, se agrega

20

25

metionina a una concentración final de entre aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 15 mM. En algunas modalidades, se agrega metionina a una concentración final de entre aproximadamente 2.5 mM hasta aproximadamente 10 mM. En algunas modalidades, se agrega metionina a una concentración final de entre aproximadamente 2.5 mM hasta aproximadamente 15 mM. En otras modalidades, se agrega metionina a una concentración final de entre aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 15 mM. En algunas modalidades, se agrega metionina a una concentración final de entre aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 25 mM. En algunas otras modalidades, se agrega metionina a una concentración final de entre aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 25 mM. En ciertas modalidades, se agrega metionina a una concentración final de entre aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 50 mM. En otras modalidades, se agrega metionina a una concentración final de entre aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 100 mM. En ciertas otras modalidades, se agrega metionina a una concentración final de entre aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 145 mM. En aún otras modalidades, se agrega metionina a una concentración final de entre aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 140 mM. En todavía otras modalidades, se agrega metionina a una concentración final de entre aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 135 mM. En todavía modalidades adicionales,

se agrega metionina a una concentración final de entre
aproximadamente 100 mM hasta aproximadamente 125 mM. En
otras modalidades, se agrega metionina a una concentración
final de entre aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 50
5 mM. En algunas modalidades, se agrega metionina a una
concentración final de entre aproximadamente 5 mM hasta
aproximadamente 25 mM. En modalidades específicas, se agrega
metionina a una formulación de proteína a una concentración
final de aproximadamente 0.5 mM, aproximadamente 1 mM,
10 aproximadamente 2 mM, aproximadamente 3 mM, aproximadamente 4
mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM,
aproximadamente 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9
mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 11 mM,
aproximadamente 12 mM, aproximadamente 13 mM, aproximadamente
15 14 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 16 mM,
aproximadamente 17 mM, aproximadamente 18 mM, aproximadamente
19 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 21 mM,
aproximadamente 22 mM, aproximadamente 23 mM, aproximadamente
24 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 26 mM,
20 aproximadamente 27 mM, aproximadamente 28 mM, aproximadamente
29 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 31 mM,
aproximadamente 32 mM, aproximadamente 33 mM, aproximadamente
34 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 36 mM,
aproximadamente 37 mM, aproximadamente 38 mM, aproximadamente
25 39 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 41 mM,

aproximadamente 42 mM, aproximadamente 43 mM, aproximadamente 44 mM, aproximadamente 45 mM, aproximadamente 46 mM, aproximadamente 47 mM, aproximadamente 48 mM, aproximadamente 49 mM, o aproximadamente 50.

5 Con respecto a que ocasiona que una proteína de una formulación se aglomere, la adición de metionina reduce la aglomeración de la proteína o proteínas en la formulación. En ciertas modalidades, la adición de metionina reduce la aglomeración en una formulación ocasionada por almacenaje,
10 exposición a temperaturas elevadas, exposición a luz, exposición a resistencia al corte, la presencia de tensoactivos, pH y condiciones iónicas, y cualquier combinación de los mismos.

 El método descrito anteriormente, puede ser usado
15 para disminuir la aglomeración de proteínas formuladas en una forma líquida o seca. La aglomeración reducida se observa en una formulación líquida, sea almacenada directamente en tal forma para uso posterior, almacenada en un estado congelado y descongelada antes del uso, o preparada en una forma seca,
20 tal como forma liofilizada, secada en aire o secada por rocío, para reconstitución posterior en una forma líquida u otra forma antes del uso.

 El nivel de aglomeración de proteína en una formulación, puede ser medido antes, sustancialmente al mismo
25 tiempo, o después, de la adición de metionina a la

formulación. En ciertas modalidades, el nivel de aglomeración se mide al menos, una vez entre aproximadamente 1 día y aproximadamente 12 semanas después de la adición de metionina a la formulación. En otras modalidades, el nivel de aglomeración se mide al menos, una vez entre aproximadamente 1 mes y aproximadamente 36 meses después de la adición de metionina a la formulación. En ciertas modalidades, los métodos descritos en este documento, resultan en una reducción de 5%, aproximadamente 10%, aproximadamente 15%, aproximadamente 20%, aproximadamente 25%, aproximadamente 30%, aproximadamente 35%, aproximadamente 40%, aproximadamente 45%, aproximadamente 50%, aproximadamente 55%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 85%, o aproximadamente 90% de % de especies de APM, comparado con las formulaciones que carecen de metionina. En modalidades específicas, el método de agregar entre aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 145 mM de metionina a una formulación de proteína, resulta en la formulación que tiene a lo sumo aproximadamente 5%, a lo sumo aproximadamente 4%, a lo sumo aproximadamente 3%, a lo sumo aproximadamente 2%, a lo sumo aproximadamente 1%, o a lo sumo aproximadamente 0.5%, de especies de APM. En otras modalidades específicas, el método de agregar entre aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 145 mM de

metionina a una formulación de proteína, resulta en la formulación que tiene aproximadamente 5%, aproximadamente 4%, aproximadamente 3%, aproximadamente 2%, aproximadamente 1%, o aproximadamente 0.5% de especies de APM. En otras
5 modalidades, el método de agregar entre aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 145 mM de metionina a una formulación de proteína, resulta en una formulación que tiene entre aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 5% de especies de APM.

10 La formulación de proteína puede además, comprender uno o más agentes que reducen la aglomeración de la proteína de la formulación. En algunas modalidades, el agente que reduce la aglomeración de la proteína de la formulación es un aminoácido. En modalidades específicas, el aminoácido es
15 arginina, lisina, glicina, ácido glutámico o ácido aspártico. En algunas modalidades, el aminoácido se agrega a una formulación de proteína a una concentración desde aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 200 mM. En algunas modalidades, el aminoácido se agrega a una
20 formulación de proteína a una concentración desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 100 mM. En algunas otras modalidades, el aminoácido se agrega a una formulación de proteína a una
25 el aminoácido se agrega a una formulación de proteína a una

concentración desde aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 50 mM. En aún otras modalidades, el aminoácido se agrega a una formulación de proteína a una concentración desde aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 25 mM. El agente que reduce la aglomeración de la proteína de la formulación, también puede ser una combinación de queladores de metal. En modalidades específicas, los queladores de metal son DTPA, EGTA y DEF. En algunas modalidades, la concentración de DTPA o EGTA en la formulación de proteína, es desde aproximadamente 1 μ M hasta aproximadamente 10 mM, desde aproximadamente 1 μ M hasta aproximadamente 5 mM, desde aproximadamente 10 μ M hasta aproximadamente 10 mM, 50 μ M hasta aproximadamente 5 mM, o desde aproximadamente 75 μ M hasta aproximadamente 2.5 mM. En algunas modalidades, la concentración de DEF en la formulación de proteína es desde aproximadamente 1 μ M hasta aproximadamente 10 mM, desde aproximadamente 1 μ M hasta aproximadamente 5 mM, desde aproximadamente 10 μ M hasta aproximadamente 1 mM, o desde aproximadamente 20 μ M hasta aproximadamente 250 μ M. El agente que reduce la aglomeración de la proteína de la formulación, puede también ser un depurador de radical libre, especialmente un depurador de radicales de oxígeno. En modalidades específicas, el depurador de radical libre es manitol o histidina. En algunas modalidades, la concentración de manitol en la formulación de

proteína es desde aproximadamente 0.01% hasta aproximadamente 25%, desde aproximadamente 0.1% hasta aproximadamente 25%, desde aproximadamente 0.5% hasta aproximadamente 15%, o desde aproximadamente 1% hasta aproximadamente 5%. En algunas
5 modalidades, la concentración de histidina en la formulación de proteína es desde aproximadamente 10 μ M hasta aproximadamente 200 mM, desde aproximadamente 100 μ M hasta aproximadamente 200 mM, desde aproximadamente 500 μ M hasta aproximadamente 100 mM, o desde aproximadamente 15 mM hasta
10 aproximadamente 35 mM. En otras modalidades, el agente que reduce la aglomeración de la proteína de la formulación, es una combinación de un quelador de metal y un depurador de radical libre. En algunas modalidades, el agente que reduce la aglomeración de una proteína o proteínas en una
15 formulación, es citrato. En ciertas modalidades, la concentración de citrato en la formulación de proteína es desde aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 50 mM, desde aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 25 mM, desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 35 mM, desde
20 aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 25 mM, o desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 10 mM.

Método para Valorar Niveles de Aglomeración de Proteína

Se puede usar un número de diferentes métodos
25 analíticos para detectar la presencia y niveles de

aglomerados en una formulación de proteína. Estos incluyen, pero no se limitan a, electrofóresis en gel de poliacrilamida nativo (PAGE), electrofóresis en gel de poliacrilamida-dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE), electrofóresis en gel capilar (CGE), cromatografía de exclusión de tamaño (CET), ultracentrifugación analítica (AUC), fraccionamiento de flujo de campo (FFF), detección de dispersión de luz, velocidad de sedimentación, espectroscopia UV, calorimetría de exploración diferencia, turbidimetría, nefelometría, microscopio, cromatografía de exclusión de tamaño-cromatografía líquida de alta resolución (CET-CLAR), cromatografía líquida de alta resolución-fase inversa (FI-CLAR), espectroscopia de masa en serie de ionización por electrorrocío (ESI-EM), y TI-CLAR/ESI-EM en serie. Estos métodos pueden ser usados ya sea solos, o en combinación.

Un problema común con las formulaciones de proteínas es la acumulación irreversible de aglomerados con tiempo, temperatura, o resistencia al corte. Típicamente, cuando los aglomerados precipitan, forman partículas grandes que son fáciles de detectar. Los aglomerados solubles no covalentes, más pequeños, sin embargo, los cuales son a menudo precursores para precipitar partículas grandes, son más difíciles de detectar y cuantificar. De este modo, métodos para detectar y cuantificar aglomeración de proteínas en una formulación de proteína, necesitan basarse en la clase

de aglomerado a ser valorado.

Entre los métodos mencionados, los métodos sugeridos para determinar la presencia y/o cantidades de aglomerados covalentes, solubles, en una formulación de proteína son: CET/dispersión de luz, SDS-PAGE, CGE, FI-CLAR/ESI-EM, FFF y AUC. Los métodos sugeridos para determinar la presencia y/o cantidades de aglomerados no covalentes, solubles, en una formulación de proteína son CET, PAGE, SDS-PAGE, CGE, FFF, AUC y dispersión de luz dinámica. Los métodos sugeridos para determinar la presencia y/o cantidades de aglomerados no covalentes, insolubles en una formulación de proteína son: espectroscopia UV, turbidimetría, nefelometría, microscopio, AUC y dispersión de luz dinámica.

15 Proteínas

Cualquier proteína susceptible a aglomeración, que incluye anticuerpos, proteínas de fusión de inmunoglobulina, factores de coagulación, receptores, ligandos, enzimas, factores de transcripción o fragmentos biológicamente activos de los mismos, pueden ser protegidos por métodos y composiciones de esta solicitud. La fuente o manera en la cual la proteína se obtiene o produce (por ejemplo, sea aislada de células o fuentes de tejido por un esquema de purificación apropiado, producidas por técnicas de ADN recombinante, o químicamente sintetizadas usando técnicas estándares de

síntesis peptídicas), es inmaterial al método mostrado por esta solicitud. Por consiguiente, una amplia variedad de proteínas nativas, sintéticas y/o recombinantes, que incluyen, proteínas quiméricas y/o de fusión, pueden ser
5 protegidas de aglomerados por los métodos y composiciones de esta solicitud.

La proteína de interés a ser formulada incluye, pero no se limita a, proteínas tales como, PSGL-Ig; GPIb-Ig; GPIIbIIIa-Ig; IL-13R-Ig; IL-21R-Ig; Factor VIIa; Factor VIII; 10 Factor VIIIc; Factor IX; Factor X; Factor XI; Factor XII; Factor XIII; factor del tejido; factor von Willebrands; factores anti-coagulación tales como Proteína C; factor natriurético atrial; mioestatina/GDF-8; interleucinas (ILs), por ejemplo, IL-1 a IL-15; hormona de crecimiento humano y 15 hormona de crecimiento bovino; factor de liberación de la hormona de crecimiento; hormona paratiroides; hormona estimulante de la tiroides; uricasa; bicunina; oxidasa de bilirrubina; subtilisina; lipoproteínas; α -1-antitripsina; cadena A de insulina; cadena B de insulina; proinsulina; 20 hormona estimulante del folículo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; tensoactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, tal como urocinasa o activador del plasminógeno de tipo tejido (t-PA); bombazina; trombina; plasmina, miniplasmina; microplasmina; factor α y β de 25 necrosis del tumor; encefalinasa; RANTES (células T reguladas

en activación normalmente expresadas y secretadas); proteína inflamatoria del macrófago humano; (MIP-1- α); albúmina de suero tal como albúmina de suero humano; sustancia que inhibe al mulerian; cadena A de relaxina; cadena B de relaxina; pro-relaxina; péptido asociado con la gonadotropina de ratón; DNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); factor de crecimiento placentar (PIGF); receptores para las hormonas o factores de crecimiento; una integrina; proteína A ó D; factores reumatoides; un factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado óseo (BDNF), neurotrofina-3, 4, 5, ó 6 (NT-3, NT-4, NT-5 ó NT-6), o un factor de crecimiento del nervio tal como NGF- β , factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento del fibroblasto tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento de transformación (TGF) tal como TGF- α y TGF- β , que incluye TGF- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, TGF- β 4, o TGF- β 5; factor I y II de crecimiento similar a la insulina, (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-1 (IGF-I cerebral); proteínas de enlace al factor de crecimiento similar a la insulina; proteínas CD tales como CD2, CD3, CD4, CD8, CD9, CD19, CD20, CD22, CD28, CD34, y CD45; eritropoyetina (EPO); trombopoyetina (TPO); factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón tal como interferón- α , β y γ ; factores estimuladores de la colonia (CSF), por ejemplo, M-

CSF, GM-CSF y G-CSF; dismutasa de superóxido; receptores de células T; elementos de la familia del receptor HER tales como el receptor EGF, receptor HER2 HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular tales como LFA-1, VLA-4, ICAM-1 y VACM; 5 IgE; antígenos del grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); factor acelerador de la descomposición (DAF); un antígeno viral tal como proteínas gag VIH, env, pol, tat, o rev; receptores de homing; adresinas; inmunoaderinas; y fragmentos biológicamente 10 activos o variantes de cualquiera de los polipéptidos listados anteriormente.

El término "fragmento biológicamente activo", significa un fragmento de una proteína que retiene al menos, una de las funciones de la proteína a partir de la cual se 15 deriva. Un fragmento biológicamente activo de un anticuerpo incluye un fragmento de enlace al antígeno del anticuerpo; un fragmento biológicamente activo de un receptor incluye un fragmento del receptor que puede todavía enlazarse a su ligando; un fragmento biológicamente activo de un ligando 20 incluye tal porción de un ligando que puede todavía enlazarse a su receptor; y un fragmento biológicamente activo de una enzima incluye tal porción de la enzima que todavía puede catalizar una reacción catalizada por la enzima de longitud completa. En ciertas modalidades, un fragmento 25 biológicamente activo retiene al menos, aproximadamente 25%,

03933

50%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, o 95% de la función de la proteína a partir de la cual se deriva. La función de una proteína se puede ensayar por métodos bien conocidos (por ejemplo, pruebas de interacciones de anticuerpo-antígeno, pruebas de interacciones ligando-receptor, pruebas de actividad enzimática, pruebas de actividad transcripcional, o pruebas de interacciones de ADN-proteína).

En ciertas modalidades, la proteína a ser formulada es un anticuerpo. El anticuerpo puede ser originado en, y enlazado a, cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente. En ciertas modalidades específicas, los anticuerpos incluyen un anticuerpo anti-B7.1, un anticuerpo anti-B7.2, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-mioestatina (por ejemplo, Solicitud Estadounidense No. 60/752,660), un anticuerpo anti-IL-11, un anticuerpo anti-IL-12 (por ejemplo, Solicitud Estadounidense No. 60/752,660), y un anticuerpo anti-IL-13 (por ejemplo, Solicitud Estadounidense No. 60/752,660). En otras modalidades específicas, los anticuerpos incluyen un anticuerpo que tiene al menos, aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99%, de identidad de secuencia de aminoácido a un anticuerpo anti-B7.1, un anticuerpo anti-B7.2, un anticuerpo anti-CD22, un anticuerpo anti-mioestatina

(por ejemplo, Solicitud Estadounidense No. 60/752,660), un anticuerpo anti-IL-11, un anticuerpo anti-IL-12 (por ejemplo, Solicitud Estadounidense No. 60/752,660), o un anticuerpo anti-IL-13 (por ejemplo, Solicitud Estadounidense No. 60/752,660), y retiene la capacidad para enlazarse a sus antígenos respectivos. La identidad de secuencia de aminoácido entre dos proteínas, puede ser medida de conformidad con los métodos estándares (véase por ejemplo, Pearson and Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444-2448, 1998; George, D.G. et al., in Macromolecular Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications, pps. 127-149, Alan R. Liss, Inc. 1988; Feng and Doolittle, *Journal of Molecular Evolution* 25:351-360, 1987; Higgins and Sharp, *CABIOS* 5:151-153, 1989; y los varios programas BLAST del NCBI, NLM, Bethesda, MD).

El término "anticuerpo" como se usa en este documento, incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, composiciones de anticuerpos con especificidades poliepítopes, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos, u otras preparaciones purificadas de anticuerpos y anticuerpos recombinantes. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos completos, por ejemplo, de cualquier isotipo (IgG, IgA, IgE, IgM, etc.), o fragmentos de los mismos, los cuales se enlazan al antígeno de interés. En ciertas modalidades, el anticuerpo a ser formulado es un anticuerpo

que tiene el isotipo IgG.

Los anticuerpos recombinantes incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos monoclonales quiméricos y humanizados, que comprenden porciones tanto humanas como no humanas, anticuerpos de cadenas únicas y anticuerpos multi-
5 específicos. Un anticuerpo quimérico es una molécula en la cual, diferentes porciones se derivan de diferentes especies animales, tales como aquellas que tienen una región variable derivada de un anticuerpo monoclonal murina y una región
10 constante de inmunoglobulina humana. Los anticuerpos de cadenas únicas tienen un sitio de enlace al antígeno y consiste de un polipéptido único. Anticuerpos multi-
15 específicos son moléculas de anticuerpo que tienen al menos dos sitios de enlace al antígeno que se enlazan específicamente a diferentes antígenos. Los anticuerpos
pueden ser fragmentados usando técnicas convencionales y fragmentos seleccionados para enlace al antígeno de interés. Preferiblemente, un fragmento de anticuerpo comprende el
20 antígeno de enlace y/o la región variable de un anticuerpo intacto. De este modo, el término de fragmento de anticuerpo incluye segmentos de porciones proteolíticamente desdobladas o recombinantemente preparadas de una molécula de anticuerpo
que son capaces de enlazarse selectivamente a ciertas proteínas. Ejemplos no limitantes de tales fragmentos
25 proteolíticos y/o recombinantes incluyen, Fab, F(ab')₂, Fab',

Fd, Fv, dAb, un CDR aislado, y anticuerpos de cadena única (scFv) que contienen un dominio VL y/o VH unido por un enlazador peptídico. Los scFV pueden ser covalentemente o no covalentemente ligados para formar anticuerpos que tienen dos
5 o más sitios de enlace.

En algunas modalidades, el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado. El término "anticuerpo monoclonal humanizado", como se usa en este documento, es un anticuerpo monoclonal a partir de una fuente no humana
10 (recipiente), que ha sido alterado por contener al menos, uno o más de los residuos de aminoácidos encontrados en el anticuerpo monoclonal humano equivalente (donador). En ciertas modalidades, los anticuerpos humanizados tienen una o más regiones que determinan la complementariedad (CDR), a
15 partir de las especies no humanas y una región de estructura de una molécula de inmunoglobulina humana. Un "anticuerpo monoclonal completamente humanizado", es un anticuerpo monoclonal de una fuente no humana, que ha sido alterado para contener todos los residuos de aminoácido encontrados en la
20 región que se enlaza al antígeno, del anticuerpo monoclonal humano equivalente. Los anticuerpos humanizados pueden también comprender residuos que no se encuentran en ya sea en el anticuerpo del recipiente o el anticuerpo donador. Estas modificaciones pueden ser elaboradas para además, refinar y
25 optimizar la funcionalidad de anticuerpos. El anticuerpo

humanizado puede también, comprender opcionalmente al menos, una porción de una región constante de inmunoglobulina humana (Fc).

En algunas modalidades, la proteína a ser formulada es una proteína de fusión. En una modalidad, la proteína de fusión es una proteína de fusión de inmunoglobulina (Ig). Una proteína de fusión Ig es una proteína que comprende una porción no de Ig enlazada a una porción Ig que se deriva de la región constante de una inmunoglobulina. En una modalidad específica, la proteína de fusión comprende la región constante de cadena pesada IgG. En otra modalidad, la proteína de fusión comprende una secuencia de aminoácido que corresponde a la articulación, regiones CH2 y CH3 de inmunoglobulina Cγ1 humana. Ejemplos no limitantes de proteínas de fusión Ig incluyen PSGL-Ig (véase, Patente Estadounidense No. 5,827,817), GPIb-Ig (véase, WO 02/063003), GPIIbIIIa-Ig, IL-13R-Ig (véase, Patente Estadounidense No. 6,268,480), THFR-Ig (véase, WO 04/008100), IL-21R-Ig, CTLA4-Ig y VCAM2D-IgG. Son bien conocidos en la técnica métodos para elaborar proteínas de fusión (por ejemplo, Patentes Estadounidenses Nos. 5,516,964; 5,225,538; 5,428,130; 5,514,582; 5,714,147; 6,136,310; 6,887,471; y 6,482,409). En algunas modalidades, las proteínas de la formulación incluyen proteínas de fusión que tienen al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%,

al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%,
al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99%
de identidad de secuencia de aminoácido para PSGL-Ig (véase,
Patentes Estadounidense No. 5,827,817), GPIb-Ig (véase, WO
5 02/063003), GPIIbIIIa-Ig, IL-13R-Ig (véase, Patente
Estadounidense No. 6,268,480), TNFR-Ig (véase, WO 04/008100),
IL-21R-Ig, CTLA4-Ig y VCAM2D-IgG, y la cual retiene su
capacidad para enlazar sus ligados respectivos.

La formulación puede contener más de una proteína
10 necesaria para el tratamiento, diagnóstico de, un trastorno o
enfermedad particular. La(s) proteína(s) adicional(es) se
eligen porque tienen actividades complementarias a las otras
proteínas en la formulación, y no afectan adversamente a las
otras proteínas en la formulación. Además, la formulación de
15 proteína puede también contener sustancias no de proteína que
son de uso en la utilidad final de la formulación de
proteína. Por ejemplo, se puede agregar sacarosa para mejorar
la estabilidad y solubilidad de la proteína en solución; y se
puede agregar histidina para proporcionar capacidad
20 amortiguadora apropiada.

En ciertas modalidades, la proteína a ser formulada
es esencialmente pura y/o esencialmente homogénea (es decir,
sustancialmente libre de proteínas contaminantes, etc.). El
término proteína "esencialmente pura" significa una
25 composición que comprende al menos aproximadamente 90% en

peso de la fracción de proteína, preferiblemente al menos aproximadamente 95% en peso de la fracción de proteína. El término proteína "esencialmente homogénea" significa una composición que comprende al menos aproximadamente 99% en peso de la fracción de proteína, excluyendo la masa de varios estabilizadores y agua en solución.

Las proteínas a ser formuladas pueden también ser conjugadas con una citotoxina, un agente terapéutico o un ión de metal radioactivo. En una modalidad, la proteína que es conjugada es un anticuerpo o fragmento del mismo. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que es perjudicial para las células. Ejemplos no limitantes incluyen, caliqueamicina, taxol, citocalisina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colquicina, doxorubicina, daunorubicina, antracina, diona de dihidroxi, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, puromicina y análogos, u homólogos de los mismos. Agentes terapéuticos incluyen, pero no se limitan a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina y decarbazina de 5-fluorouracilo), agente de alquilación (por ejemplo, mecloretamina, tioepa, clorambucilo, melfalan, carmustina (BSNU) y lumustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan,

dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP), cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina, bleomicina, mitramicina y antramicina) y agentes anti-mitóticos (por ejemplo, vincristina y vinblastina). Son bien conocidos en el arte, técnicas para conjugar tales porciones a proteínas.

Formulaciones

10 La composición de una formulación se determina por consideración de varios factores que incluyen, pero no se limitan a: la naturaleza de las proteínas (por ejemplo, receptor, anticuerpo, proteínas de fusión Ig, enzima, etc.); la concentración de la proteína; el intervalo de pH deseado; 15 cómo se almacena la formulación de proteína; el periodo que la formulación de proteína es almacenada; y si y cómo la formulación de proteína es administrada a un paciente.

Concentración de la Proteína en la Formulación

20 La concentración de la proteína en la formulación es dependiente del uso final de la formulación de proteína. Las concentraciones de proteína en las formulaciones descritas en este documento son generalmente entre aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, por 25 ejemplo, entre aproximadamente 0.5 mg/ml y aproximadamente 25

mg/ml, entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 25
mg/ml, entre aproximadamente 10 mg/ml y aproximadamente 100
mg/ml, entre aproximadamente 25 mg/ml y aproximadamente 100
mg/ml, entre aproximadamente 50 mg/ml y aproximadamente 100
5 mg/ml, entre aproximadamente 75 mg/ml y aproximadamente 100
mg/ml, entre aproximadamente 100 mg/ml y aproximadamente 200
mg/ml, entre aproximadamente 125 mg/ml y aproximadamente 200
mg/ml, entre aproximadamente 150 mg/ml y aproximadamente 200
mg/ml, entre aproximadamente 200 mg/ml y aproximadamente 300
10 mg/ml, y entre aproximadamente 250 mg/ml y aproximadamente
300 mg/ml.

Las formulaciones de proteína se pueden usar para
propósitos terapéuticos. Por lo tanto, la concentración de la
proteína en una formulación se determina en base a
15 proporcionar la proteína en una dosificación y volumen que es
tolerado por, y de valor terapéutico para, el paciente. Si la
formulación de proteína es administrada por inyección de
volumen pequeño, la concentración de proteína dependerá del
volumen de inyección (usualmente 1.0-1.2 ml). Las terapias a
20 base de proteína usualmente requieren varias dosificaciones
mg/kg por semana, por mes, o por varios meses. Por lo tanto,
si una proteína es proporcionada a 2-3 mg/kg de peso corporal
del paciente, y un promedio de peso del paciente 75 kg, 150-
225 mg de la proteína será necesaria para ser suministrada en
25 un volumen de inyección de 1.0-1.2 ml, o el volumen necesario

a ser incrementado para ajustar una concentración de proteína inferior.

Amortiguadores

5 El término "amortiguador" como se usa en este documento, incluye aquellos agentes que mantienen el pH de la solución en un intervalo deseado. El pH de una formulación como se describe en este documento es generalmente entre aproximadamente pH 5.0 hasta aproximadamente 9.0, por ejemplo, aproximadamente pH 5.5 hasta aproximadamente 6.5, aproximadamente pH 5.5 hasta aproximadamente 6.0, aproximadamente pH 6.0 hasta aproximadamente 6.5, pH 5.5, pH 6.0, o pH 6.5. En general, es usado un amortiguador que puede mantener una solución a pH 5.5 hasta 6.5. Ejemplos no limitantes de amortiguadores que se pueden usar en una formulación descritos en este documento incluyen, histidina, succinato, gluconato, tris(trometamol), Bis-Tris, MOPS, ACES, BES, TES, HEPES, EPPS, etilendiamina, ácido fosfórico, ácido maleico, fosfato, citrato, ácido 2-morfolinetansulfónico (MES), fosfato de sodio, acetato de sodio y cacodilato. Histidina es un amortiguador que es preferido en formulaciones que son administradas por inyección subcutánea, intramuscular o peritoneal. La concentración del amortiguador es entre aproximadamente 5 mM y 30 mM. En una modalidad, el amortiguador de una formulación es histidina a una

concentración de aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 20 mM.

Excipientes

5 Además de la proteína, metionina y amortiguador, una formulación como se describe en este documento puede también contener otras sustancias. Estas sustancias incluyen, pero no se limitan a, crioprotectores, lioprotectores, tensoactivos, agentes que otorgan volumen, antioxidantes y
10 agentes estabilizadores. En una modalidad, una formulación de proteína descrita en este documento incluye un excipiente seleccionado del grupo que consiste de un crioprotector, un lipoprotector, un tensoactivo, un agente que otorga volumen, un antioxidante, un agente estabilizador y combinaciones de
15 los mismos.

 El término "crioprotector" como se usa en este documento, incluye agentes los cuales proporcionan estabilidad para la proteína contra tensión inducida por congelamiento, siendo preferencialmente excluida de la
20 superficie de la proteína. Los crioprotectores pueden también ofrecer protección durante el secado primario y secundario y almacenaje del producto por tiempo prolongado. Ejemplos no limitantes de crioprotectores incluyen azúcares, tales como sacarosa, glucosa, trehalosa, manitol, manosa y lactosa;
25 polímeros, tales como dextrano, almidón de hidroxietilo y

polietilen glicol; tensoactivos, tales como polisorbatos (por ejemplo, PS-20 o PS-80); y aminoácidos, tales como glicina, arginina, leucina y serina. Se usa en general, un crioprotector que presenta baja toxicidad en sistemas biológicos. El crioprotector, incluido en la formulación, se agrega a la concentración final de entre aproximadamente 1% y aproximadamente 10% (peso/volumen). En una modalidad, el crioprotector es sacarosa a una concentración de entre aproximadamente 0.5% y aproximadamente 10% (peso/volumen).

10 En una modalidad, se agrega un lipoprotector a una formulación descrita en este documento. El término "lipoprotector" como se usa en este documento, incluye agentes que proporcionan estabilidad a la proteína durante la liofilización o proceso de deshidratación (ciclos de liofilización primario y secundario), proporcionando una matriz de cristal amorfa, y que se une con la proteína a través de enlace de hidrógeno, reemplazando las moléculas de agua que son removidas durante el proceso de secado. Esto ayuda a mantener la conformación de proteína, degradación de proteína minimizada durante el ciclo de liofilización, y mejorar la estabilidad del producto por tiempo prolongado. Ejemplos no limitantes de lipoprotectores incluyen azúcares, tales como sacarosa o trehalosa; un aminoácido, tal como glutamato monosódico, glicina o histidina no cristalina; una metilamina, tal como betaína; una sal liotrópica, tal como

sulfato de magnesio; un poliol, tal como alcoholes de alta azúcar o trihídricos, por ejemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilol, sorbitol y manitol; propilen glicol; polietilen glicol; plurónicos y combinaciones de los mismos. La cantidad de lipoprotector agregado a una formulación es en general, una cantidad que no conduce a una cantidad inaceptable de degradación/aglomeración de la proteína cuando la formulación de proteína es liofilizada. En donde el lipoprotector es un azúcar (tal como sacarosa o trehalosa) y la proteína es un anticuerpo, ejemplos no limitantes de concentraciones de lipoprotectores en la formulación de proteína son aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 400 mM, y preferiblemente aproximadamente 30 mM hasta aproximadamente 300 mM, y más preferiblemente aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 100 mM.

En ciertas modalidades, se puede incluir un tensoactivo en la formulación. El término "tensoactivo" como se usan en este documento, incluye agentes que reducen la tensión superficial de un líquido por adsorción a la interfaz aire-líquido. Ejemplos de tensoactivos incluyen, sin limitación, tensoactivos no iónicos, tales como polisorbato (por ejemplo, polisorbato 80 o polisorbato 20); poloxámeros (por ejemplo, poloxámeros 188); TritonTM; dodecil sulfato de sodio (SDS); laurel sulfato de sodio; actil glicósido de sodio; lauril-sulfobetaína, miristil-sulfobetaína, linoleil-

sulfobetaína, estearil-sulfobetaína, lauril-sarcosina, miristil-sarcosina, linoleil-sarcosina, estearil-sarcosina, linoleil-betaína, miristil-betaína, cetil-betaína, lauroamidopropil-betaína, cocamidopropil-betaína, 5 linoleamidopropil-betaína, miristamidopropil-betaína, palmidopropil-betaína, isostearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo), miristamidopropil-, palmidopropil- o isostearamidopropil-dimetilamina; metil cocoilo sódico o metil ofeilo de sodio-aurato; y las series 10 de MonaquatTM (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polietilen glicol, polipropil glicol y copolímeros de etilen y propilen glicol (por ejemplo, pluronics, PF68). La cantidad de tensoactivo agregado es tal que mantiene aglomeración de la proteína reconstituida en un nivel aceptable como en 15 probado, usando por ejemplo, SEC-CLAR para determinar el porcentaje de especies APM o especies BPM, y minimiza la formación de partículas después de la reconstitución de un liofilato de una formulación de proteína descrita en este documento. Por ejemplo, el tensoactivo puede estar presente 20 en una formulación (líquida, o antes de la reconstitución de un liofilato) en una cantidad de aproximadamente 0.001 hasta aproximadamente 0.5%, por ejemplo aproximadamente 0.05 hasta aproximadamente 0.3%.

En algunas modalidades, se incluye un agente que 25 proporciona volumen en la formulación. El término "agente que

proporciona volumen" como se usa en este documento, incluye agentes que proporcionan la estructura del producto liofilizado que interactúa directamente con el producto farmacéutico. Además de proporcionar una pasta farmacéuticamente elegante, los agentes que proporcionan volumen pueden también impartir cualidades útiles con respecto a modificar la temperatura de colapso, proporcionar protección de congelación-descongelamiento, y mejorar la estabilidad de proteína durante un tiempo prolongado de almacenaje. Ejemplos no limitantes de agentes que proporcionan volumen incluyen manitol, glicina, lactosa y sacarosa. Agentes que proporcionan volumen pueden ser cristalinos (tales como glicina, manitol, o cloruro de sodio) o amorfos (tales como dextrano, almidón de hidroxietilo) y son generalmente usados en formulaciones de proteína en una cantidad de 0.5% hasta 10%.

Otros excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, tales como aquellos descritos en Remington's Pharmaceuticals Sciences 16ava edición, Osol, A. Ed. (1980) pueden también ser incluidos en una formulación de proteína descritas en este documento, siempre que las características deseadas de la formulación no tengan efectos adversos. Como se usa en este documento, "portador farmacéuticamente aceptable" significa cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, revestimientos, agentes

antibacterianos y antifúngicos, agentes que retrasan la absorción e isotónicos, compatibles con administración farmacéutica. Es bien conocido en la técnica el uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas.

5 Portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos a receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen: agentes amortiguadores adicionales; preservativos; co-solventes; antioxidantes; que incluyen ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como

10 EDTA; complejos de metales (por ejemplo, complejos de proteína Zn); polímeros biodegradables, tales como poliésteres; contraiones que forman sales, tales como sodio, alcoholes de azúcar polihídricos; aminoácidos, tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina,

15 lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, y treonina; azúcares orgánicos o alcoholes de azúcar, tales como lactitol, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioininitosa, mioininitol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitales (por ejemplo, inositol),

20 polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatona, ácido tióctico, tioglicolato sódico, tioglicerol, α -monotioglicerol, y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular, tales como albúmina de suero humano, albúmina de suero bovino, gelatina u otras

25 inmunoglobulinas; y polímeros hidrofílicos, tales como

polivinilpirrolidona.

Métodos de Almacenaje

Una formulación de proteína descrita en este documento, puede ser almacenada por cualquier método conocido por uno de habilidades en la técnica. Ejemplos no limitantes incluyen, congelación, liofilización y secado por rocío de la formulación de proteína.

En algunos casos, las formulaciones de proteínas son congeladas para almacenaje. Por consiguiente, es deseable que la formulación sea relativamente estable bajo tales condiciones, que incluyen, bajo ciclos de congelación-descongelación. Un método para determinar la adecuabilidad de una formulación, es someter una formulación de muestra por al menos dos, por ejemplo, tres hasta diez ciclos de congelación (en, por ejemplo, -20°C ó -80°C), y descongelación (por ejemplo, por descongelación rápida a temperatura ambiente o descongelación lenta en hielo), determinando la cantidad de especies de bajo peso molecular (BPM) y/o especies de APM o especies de APM presentes en la muestra antes del procedimiento de congelación-descongelación. Un incremento en las especies de BPM o APM, indica estabilidad disminuida de una proteína almacenada como parte de la formulación. Se puede usar cromatografía líquida de alta resolución de exclusión de tamaño (CET-CLAR), para determinar la presencia

de especies de BPM y APM.

En algunos casos, las formulaciones de proteína pueden ser almacenadas como un líquido. Por consiguiente, es deseable que la formulación líquida pueda ser relativamente adecuada bajo tales condiciones, que incluyen, varias temperaturas. Un método para determinar la adecuabilidad de una formulación, es almacenar la formulación de muestra a varias temperaturas (tales como 2-8, 15, 20, 25, 30, 34, 40 y 50°C) y monitorear la cantidad de especies de APM y/o BPM que se acumulan con el tiempo. A cantidades más pequeñas de especies de BPM y/o APM que se acumulan con el tiempo, mejor la condición de almacenaje para la formulación. Adicionalmente, el perfil de carga de la proteína puede ser monitoreado por cromatografía líquida de alta resolución-intercambio catiónico (CEX-CLAR).

Alternativamente, las formulaciones pueden ser almacenadas después de la liofilización. El término "liofilización" como se usa en este documento, se refiere a un proceso por el cual el material a ser secado es primero congelado, seguido por remoción del hielo o solvente congelado por sublimación en un ambiente a vacío. Se puede incluir in excipiente (por ejemplo, lipoprotector) en las formulaciones que son liofilizadas, para mejorar la estabilidad del producto liofilizado después del almacenaje. El término "formulación reconstituida" como se usa en este

00081

documento, se refiere a una formulación que ha sido preparada disolviendo una formulación de proteína liofilizada en un diluyente, de manera tal que la proteína es dispersada en el diluyente. El término "diluyente", como se usa en este documento, es una sustancia que es farmacéuticamente aceptable (segura y no tóxica para administración a un humano), y es empleada para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida después de la liofilización. Ejemplos no limitantes de diluyentes incluyen, agua estéril, agua bacterioestática para inyección (ABPI), una solución amortiguada de pH (por ejemplo, salina amortiguada con fosfato), solución salina estéril, solución Ringer, solución de dextrosa o solución acuosa de sales y/o amortiguadores.

Probar una formulación para la estabilidad del componente de proteína de la formulación después de la liofilización, es útil para determinar la adecuabilidad de una formulación. El método es similar a aquel descrito anteriormente para congelación, excepto que la formulación de muestra es liofilizada en lugar de congelada, reconstituida usando un diluyente, y la formulación reconstituida es probada para determinar la presencia de especies de BPM y/o especies de APM. Un incremento en las especies de BPM o APM en la muestra liofilizada, comparado con una formulación de muestra correspondiente que no fue liofilizada, indica

estabilidad disminuida en la muestra liofilizada.

En algunos casos, una formulación es secada por atomización y después almacenada. Para secado por atomización, una formulación líquida es aerosolizada en la presencia de una corriente de gas seco. El agua es removida de las gotitas de formulación en la corriente del gas, resultando en partículas secas de la formulación del fármaco. Los excipientes pueden ser incluidos en la formulación (i) para proteger la proteína durante la deshidratación del secado por atomización, (ii) proteger la proteína durante el almacenaje después del secado por atomización, y/o (iii) dar las propiedades de solución adecuadas para aerosolización. El método es similar a aquel descrito anteriormente para congelación, excepto que la formulación de la muestra es secada por atomización en lugar de congelarla, reconstituida en un diluyente, y la formulación reconstituida es probada para determinar la presencia de especies de BPM y/o especies de APM. Un incremento en especies de BPM o APM en la muestra secada por atomización, comparado con una formulación de muestra correspondiente que no fue liofilizada, indica estabilidad disminuida en la muestra secada por atomización.

Métodos de tratamiento

Las formulaciones descritas en este documento, son empleadas como composiciones farmacéuticas en el tratamiento

y/o prevención de una enfermedad o trastorno en un paciente en necesidad del mismo. El término "tratamiento", se refiere a tanto tratamiento médico como mediciones profilácticas o preventivas. El tratamiento incluye la aplicación o

5 administración de la formulación de proteína al cuerpo, un tejido aislado, o célula de un paciente, quien tiene una enfermedad/trastorno, un síntoma de una enfermedad/trastorno, o una predisposición hacia una enfermedad/trastorno, con el propósito de curar, sanar, atenuar, distender, remediar,

10 aliviar, mejorar o afectar la enfermedad, el síntoma de la enfermedad, o la predisposición hacia la enfermedad. Aquellos "en necesidad del tratamiento", incluyen aquellos ya con el trastorno, así como también aquellos en los cuales el trastorno es prevenido. El término "trastorno" es cualquier

15 condición que podría beneficiarse del tratamiento con la formulación de proteína descrita en este documento. Este incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, que incluyen aquellas condiciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Ejemplos no limitantes de

20 trastornos a ser tratados en este documento incluyen, trastornos de sangrado, trombosis, leucemia, linfoma, linfoma no Hodgkin, enfermedades autoinmunes, trastornos de coagulación, hemofilia, rechazo al trasplante, trastornos inflamatorios, enfermedad cardíaca, trastornos de espasmos

25 musculares, alergias, cánceres, distrofia muscular,

sarcopenia, caquexia, diabetes Tipo II, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, psoriasis, artritis psoriática, asma, dermatitis, rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, eosinofilia, fibrosis, y exceso de producción de moco.

Administración

Las formulaciones de proteínas descritas en este documento, pueden ser administradas a un sujeto en necesidad del tratamiento usando métodos conocidos en la técnica, tal como por bolo o infusión única o múltiple sobre un periodo prolongado de tiempo en una manera adecuada, por ejemplo, inyección o infusión por rutas subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intraarterial, intralesional o intraarticular, administración tópica, transmucosal, transdérmica, rectal, inhalación o por medios de liberación sostenida o de liberación extendida. Si la formulación de proteína ha sido liofilizada, el material liofilizado es primero reconstituido en un líquido apropiado antes de la administración. El material liofilizado puede ser reconstituido en por ejemplo, agua bacterioestática para inyección (ABPI), salina fisiológica, salina amortiguada de fosfato (PBS), o la misma formulación que ha sido de la proteína antes de la liofilización.

Se pueden preparar composiciones parenterales en

una forma de dosificación unitaria para facilidad de administración y uniformidad de dosificación. "Forma de dosificación unitaria" como se usa en este documento, se refiere a unidades físicamente discretas, adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a ser tratado; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo, calculada para producir el efecto terapéutico deseado, en asociación con el portador farmacéutico seleccionado.

10 En el caso de un método de inhalación, tal como inhalador de dosis medida, el dispositivo es diseñado para suministrar una cantidad apropiada de la formulación. Por administración por inhalación, los compuestos son suministrados en la forma de un atomizador en aerosol a partir de un recipiente presurizado o dispensador que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas, tal como dióxido de carbono, o un nebulizador. Alternativamente, se puede proporcionar una forma de dosificación inhalada como un polvo seco, usando un inhalador en polvo seco.

20 La formulación de proteína puede también ser atrapada en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial por ejemplo, por microcápsulas de gelatina o hidroximetilcelulosa y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de suministro de fármaco coloidal (por ejemplo,

liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Tales técnicas son descritas en Remington's Pharmaceutical Sciences 18ava., edición.

5 Las preparaciones de liberación sostenida de las formulaciones de proteína descritas en este documento, también pueden ser preparadas. Ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen, matrices semipermeables de polímeros hidrofóbicos sólidos que
10 contienen la formulación de proteína. Ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato), o poli(vinilalcohol)), poliláctidos, copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, copolímeros de acetato de
15 etilen-vinilo no degradable, ácido glicólico-ácido láctico degradables y ácido poli-D-(-)-3-hidroxibutírico. Las formulaciones de liberación sostenidas de las proteínas descritas en este documento, pueden ser desarrolladas usando polímero de ácido poliláctico-coglicólico (PLGA), debido a su
20 biocompatibilidad y amplio rango de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico, pueden ser más fácilmente separados dentro del cuerpo humano. Sin embargo, la degradabilidad de este polímero, se puede ajustar desde meses a años, dependiendo de
25 su peso y composición molecular. Las composiciones

liposomales pueden también ser usadas para formular las proteínas o anticuerpos descritos en este documento.

Dosificación

5 La eficacia terapéutica y toxicidad de una formulación, se puede determinar por procedimientos farmacéuticos conocidos en la técnica usando, por ejemplo, cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, determinando el LD₅₀ (la dosis letal al 50% de la población) y
10 la ED₅₀ (la dosis terapéuticamente efectiva en 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos terapéuticos y tóxicos, es el índice terapéutico, y puede expresarse como la relación LD₅₀/ED₅₀.

 Los datos obtenidos a partir de los ensayos de
15 cultivo celular y estudios animales, pueden ser usados en la formulación de un intervalo de dosificaciones para uso en humanos. Las dosificaciones de tales formulaciones en general, caen dentro de un intervalo de concentraciones de circulación que incluye el ED₅₀ con poca o ninguna toxicidad.
20 La dosificación puede variar dentro de este intervalo, dependiendo de la forma de dosificación empleada y la ruta de administración utilizada. Para cualquier formulación usada en el método de la invención, la dosis terapéuticamente efectiva puede ser estimada inicialmente a partir de los ensayos de
25 cultivos celulares. Una dosis puede ser formulada en modelos

animales para lograr un intervalo de concentración de plasma de circulación que incluye el IC_{50} (es decir, la concentración del compuesto de prueba el cual logra una inhibición máxima media de síntomas), como se determina en el cultivo celular.

- 5 Tal información puede ser usada para determinar más exactamente las dosis empleadas en humanos. Se pueden medir los niveles de plasma, por ejemplo, por cromatografía líquida de alta resolución.

La dosificación apropiada de la proteína de la
10 formulación, dependerá del tipo de enfermedad a ser tratada, la severidad y curso de la enfermedad, si el agente es administrado para propósitos preventivos o terapéuticos, terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta al agente, y la discreción del especialista que
15 atiende. Una formulación es suministrada en general, de manera tal que las dosificaciones son entre aproximadamente 0.1 mg de proteína/kg de peso corporal hasta aproximadamente 100 mg de proteína/kg de peso corporal.

Para que la formulación sea usada para
20 administración *in vivo*, debe ser estéril. La formulación puede ser proporcionada estéril por filtración a través de las membranas de filtración estéril, previo a, o después de, la formulación de un líquido o liofilización y reconstitución. Las composiciones terapéuticas de este
25 documento, en general, son colocadas en un contenedor que

23989

tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa, o vial que tiene un tapón que se puede perforar por una aguja de inyección hipodérmica.

5 Artículos de Manufactura

En otra modalidad, se proporciona un artículo de manufactura, el cual contiene una formulación descrita en este documento, y preferiblemente, proporciona instrucciones para su uso. El artículo de manufactura comprende un
10 contenedor adecuado para contener la formulación. Contenedores adecuados incluyen sin limitación, botellas, viales (por ejemplo, viales de cámara dual), jeringas (por ejemplo, jeringas de cámara única o dual), tubos de prueba, nebulizadores, inhaladores (por ejemplo, inhaladores de dosis
15 medidas o inhaladores en polvo seco), o depósitos. El contenedor puede ser formado de una variedad de materiales, tales como vidrio, metal o plástico (por ejemplo, policarbonato, poliestireno, polipropileno). El contenedor mantiene la formulación y la etiqueta en, o asociada con, y
20 el contenedor puede indicar direcciones para reconstitución y/o uso. La etiqueta además, puede indicar que la formulación es útil o propuesta para administración subcutánea. El contenedor que mantiene la formulación puede ser un vial de usos múltiples, el cual permite administraciones repetidas
25 (por ejemplo, desde 2-6 administraciones) de la formulación.

El artículo de manufactura puede además, comprender un segundo contenedor que comprende un diluyente adecuado (por ejemplo, WFI, NaCl al 0.9%, ABPI, salina amortiguada de fosfato). Cuando el artículo de manufactura comprende una versión liofilizada de una formulación de proteína, el mezclado de un diluyente con la formulación liofilizada proporcionará una concentración final de proteína en la formulación reconstituida de en general, al menos 20 mg/ml. El artículo de manufactura puede además, incluir otros materiales deseables a partir de un punto de vista del usuario y comercial, que incluye, otros amortiguadores, diluyentes, filtros, agujas, jeringas e insertos de envasado con instrucciones de uso.

Todos los artículos de periódicos, patentes, solicitudes de patentes y otras publicaciones referenciadas en esta solicitud, están incorporadas por referencia en su totalidad. Si existe algún conflicto entre los contenidos de la presente solicitud y cualquier material incorporado por referencia, se entiende que rige a esta solicitud.

La invención será más completamente entendida por referencia a los siguientes ejemplos. No deben, sin embargo, ser contruidos como limitantes del alcance de la invención.

00001

EJEMPLOSEjemplo 1

5 Efecto de Metionina en la Aglomeración de Proteína en una
 Formulación de Anticuerpo anti-B7.2 Sometido a Almacenaje a
 Temperatura Elevada

 Este ejemplo ilustra la capacidad de metionina para
reducir la aglomeración de una proteína en una formulación de
proteína. Específicamente, los experimentos descritos abajo,
10 fueron dirigidos para probar los efectos de metionina en la
agregación de anticuerpos anti-B7.2 (IgG₂, cadena ligera κ ,
véase Figura 9) en una formulación de anticuerpo anti-B7.2
sometida a almacenaje a 40°C. El B7.2 es un ligando co-
estimulador que es expresado en células B, las cuales
15 pueden interactuar con las moléculas de la superficie T, CD28
y CTLA-4.

 El efecto de agregar metionina en la aglomeración
de anticuerpo anti-B7.2 formulado como un líquido a varios
niveles de pH, se examinó durante un periodo de 12 semanas
20 durante el cual, la formulación se almacenó a 40°C. El
anticuerpo anti-B7.2 se formuló a 1 mg/ml a varios niveles de
pH en la presencia y ausencia de 10 mM de metionina y
polisorbato-80 al 0.01%. Los niveles de aglomeración fueron
medidos inicialmente, en la semana 6, y en la semana 12,
25 midiendo el porcentaje de especies de alto peso molecular (%)

de APM) en las formulaciones en estos puntos de tiempo por CET-CLAR. Un incremento en % de APM es indicativo de aglomeración.

Los niveles iniciales en % de APM de cada
5 formulación, fueron aproximadamente los mismos (~1-2% véase, Figura 1a). Después de 6 y 12 semanas de almacenaje a 40°C, sin embargo, el % de APM se incrementó en las formulaciones que carecen de metionina, especialmente en las muestras que contienen polisorbato-80 y carecen de metionina y se formulan
10 a niveles de pH que varían desde 6.0 hasta 6.6 (véase, Figuras 1b y 1c). La presencia de metionina en la formulación, mantiene el % de APM cerca de los niveles iniciales en las muestras sin polisorbato-80. Aunque hubo un incremento en la aglomeración de proteína en muestras que
15 contienen tanto polisorbato-80 como metionina, comparadas con las muestras que contienen metionina pero carecen de polisorbato-80, los niveles de aglomeración de proteína fueron significativamente inferiores que en las muestras que contienen polisorbato-80 pero carecen de metionina (véase
20 Figuras 1b y 1c).

En resumen, estos experimentos muestran que la metionina reduce la aglomeración de anticuerpo anti-B7.2 en una formulación sometida a temperaturas elevadas tanto en la presencia como ausencia de polisorbato-80.

25

03003

Ejemplo 2Efecto de Metionina en la Aglomeración de Proteína en una
Formulación de Anticuerpo anti-B7.1 Sometido a Temperatura
Elevada

5 Este ejemplo ilustra además, la capacidad de
metionina para reducir la aglomeración de una proteína en una
formulación de proteína. Los experimentos descritos abajo, se
dirigen a probar los efectos de metionina en la agregación de
anticuerpos anti-B7.2 (IgG₂, cadena ligera K, véase Figura 8)
10 en una formulación de anticuerpo anti-B7.2 sometida a
almacenaje a 40°C. El B7.2 es un ligando co-estimulatorio que
es expresado en células B, las cuales pueden interactuar con
las moléculas de la superficie T, CD28 y CTLA-4.

El efecto de agregar metionina en la aglomeración
15 de anticuerpo anti-B7.1 formulado como un líquido a varios
niveles de pH, se examinó durante un periodo de 12 semanas
durante el cual, las muestras se almacenaron a 40°C. El
anticuerpo anti-B7.1 se formuló a 1 mg/ml a varios niveles de
pH en la presencia y ausencia de 10 mM de metionina y
20 polisorbato-80 al 0.01%. Los niveles de aglomeración fueron
medidos inicialmente, en la semana 6, y en la semana 12,
midiendo el porcentaje de especies de alto peso molecular (%
de APM) en las formulaciones en estos puntos de tiempo por
CET-CLAR.

25 Los niveles iniciales en % de APM de cada

formulación, fueron aproximadamente los mismos (~1% véase, Figura 2a). El almacenaje de la formulación de anticuerpo anti-B7.1 por 12 semanas a 40°C en la presencia de polisorbato-80 y que carece de metionina, resultó en un
5 incrementó menor en el % de APM en el intervalo de pH de 4.7-6.3 en citrato y amortiguadores de succinato (véase, Figura 2b). Un incremento más significativo en % de APM, resultó en el intervalo de pH de 6-6.6 en amortiguador de histidina (véase, Figura 2b). La adición de metionina a las
10 formulaciones de proteína, disminuyó el % de niveles de APM. Esto fue más claramente visto en el caso de anticuerpo anti-B7.1 formulado en el amortiguador de histidina y polisorbato-80: metionina mantiene el % de niveles de APM a un mínimo de 1.2% después de 12 semanas a 40°C.

15 En resumen, estos experimentos muestran que la metionina reduce la aglomeración de anticuerpo anti-B7.1 en una formulación almacenada a 40°C, tanto en la presencia como ausencia de polisorbato-80.

20

Ejemplo 3

Efecto de Metionina en Aglomeración de Proteína en una Formulación de Anticuerpo anti-CD22 Sometida a Almacenaje de Largo Término

Este experimento se dirigió para probar el efecto
25 de agregar metionina en una aglomeración de proteína en una

formulación de anticuerpo anti-CD22 (véase, Figura 10). El CD22 es una célula B de 135 kD restringida de sialoglicoproteína que se enlaza a oligosacáridos que contienen 2-6 residuos de ácido siálico ligado, y se expresa en la superficie de células B, durante etapas posteriores de diferenciación. Parece jugar un papel en la activación de células B y actúa como una molécula de adhesión. El CD22 y anti-CD22, son considerados útiles en el tratamiento de leucemia, linfoma, linfoma no Hodgkin, y ciertas condiciones autoinmunes.

Se formularon 25-26 mg/ml de anti-CD22 (IgG₄, cadena ligera K), como un líquido en 10 mM de amortiguador de succinato, a pH 6. Estas formulaciones también contienen ya sea uno o ambos de 10 mM de metionina y polisorbato-80 al 0.01%. Las formulaciones anti-CD22 resultantes, se almacenaron a 25°C u -80°C de entre 1 mes y 36 meses, y % de niveles de APM en las formulaciones, se valoraron por CET-CLAR.

El % de niveles de APM de todas las formulaciones almacenadas a -80°C, fue aproximadamente el mismo (~0.5%) (véase, Figura 3a). Por el contrario, el almacenaje con el tiempo a 25°C, resultó en un incremento en el % de niveles de APM (véase Figura 3b). Este incremento fue sustancialmente disminuido si la metionina estuvo presente en la formulación. Notablemente, las formulaciones de anti-CD22 formuladas con

polisorbato-80 y metionina, generaron aproximadamente el mismo % de especies de APM como muestras formuladas con metionina pero que carecen de polisorbato-80.

Estos datos indican que la metionina disminuye la aglomeración de proteína de una formulación de anticuerpo anti-CD22 en almacenaje a largo término, tanto en la presencia o ausencia de polisorbato-80.

Ejemplo 4

Efecto de Metionina en Aglomeración de Proteína en una Formulación de PSGL-Ig Sometida a Almacenamiento a Altas Temperaturas

Este ejemplo proporciona otra ilustración de la capacidad de metionina para prevenir la aglomeración en proteínas y, particularmente, en proteínas de fusión. Este experimento se dirige a probar el efecto de agregar metionina en una aglomeración de proteína en una formulación de proteína de fusión de inmunoglobulina-ligando 1 de la glicoproteína P-selectina (PSGL-Ig). La PSGL-1 es un homodímero de 240 kDa que consiste de dos cadenas de polipéptidos de 120 kDa que son constitutivamente expresados en todos los leucocitos. La PSGL-Ig se encuentra principalmente, en las puntas del microvilli. La PSGL-Ig puede enlazarse a P-selectina en el endotelio cuando se decora con azúcares apropiados.

Los efectos de metionina en la aglomeración de la proteína de fusión del ligando Ig de glicoproteína P-selectina (PSGL-Ig), se examinaron a varias temperaturas. La PSGL-Ig se formuló como una formulación líquida en 10 mM de Tris, 150 mM de NaCl, polisorbato-80 al 0.005%, a pH 7.5 en la presencia y ausencia de 10 mM de metionina. Las muestras se almacenaron a -80°C, 25°C y 40°C y se evaluaron por % de APM durante un periodo de 4 semanas por CET-CLAR.

Los niveles iniciales de % de APM en todas las muestras, fueron similares y permanecieron sin cambio en las muestras almacenadas a -80°C, con respecto a la presencia o ausencia de metionina (véase Figura 4). El almacenaje a 25°C y 40°C, resultó en aglomeración incrementada con el tiempo; sin embargo, tal agregación se redujo en las muestras formuladas con metionina.

Ejemplo 5

Efecto de Metionina en Aglomeración de Proteína en una Formulación de PSGL-Ig Sometida a Resistencia al Corte

Este ejemplo ilustra que la metionina reduce la aglomeración de proteínas sometidas a resistencia al corte.

La proteína de fusión PSGL-Ig se formuló como un líquido en 10 mM de Tris, 150 mM de NaCl, polisorbato-80 al 0.005%, pH 7.5 en la presencia y ausencia de 10 mM de metionina. Las formulaciones resultantes fueron ya sea

dejadas sin sacudir o sometidas a sacudimiento a 250 rpm por 96 horas.

Las muestras no sacudidas que contienen o que carecen de metionina, tienen % de niveles de APM muy similares (0.6 y 0.7%) (véase Figura 5). Por el contrario, las muestras sacudidas que carecen de metionina contienen % de APM elevado (4.2% y 4.4%). La adición de metionina a las formulaciones que fueron sometidas a sacudimiento, resultó en un decremento en el % de niveles de APM a 1.0 y 2.2%.

Estos datos muestran que la metionina reduce la aglomeración de proteínas sometidas a resistencia al corte.

Ejemplo 6

Efecto de Metionina en la Aglomeración de Proteína de una Formulación de Proteína REFACTO® Almacenada en la Oscuridad

Este experimento proporciona aún otro ejemplo de la capacidad de metionina para prevenir la aglomeración en proteínas y, particularmente, en proteínas recombinantes. Para ilustrar además, REFACTO® (véase, Figura 11), una proteína recombinante del factor VIII que se usa para corregir las deficiencias del factor VIII, se usó en este experimento.

Los efectos de metionina en la estabilidad de REFACTO®, se examinaron durante un estudio de estabilidad de 1 mes. Se formuló REFACTO® como un líquido a aproximadamente

250 IU/ml en 20 mM de amortiguador de histidina. Algunas de estas formulaciones contienen 4 mM de cloruro de calcio y 310 mM de cloruro de sodio, y Tween-80 al 0.02%. El pH de la formulación fue 6.5. Las muestras fueron almacenadas en la oscuridad a temperatura ambiente por aproximadamente 1 mes. Las muestras de control se formularon como anteriormente y se almacenaron a -80°C. La formación de aglomerado se valoró por CET-CLAR.

En las muestras de control, con respecto a la presencia de metionina y citrato, el % de niveles de APM permaneció igual (véase, Tabla 1). En las formulaciones de amortiguador de histidina sin metionina y citrato, el % de APM fue 26-27% después de 1 mes de almacenamiento en la oscuridad, indicando un alto nivel de aglomeración. En las formulaciones amortiguadoras de histidina que contienen metionina y citrato, sin embargo, la aglomeración se redujo durante el mismo periodo de tiempo, con un % de APM de solamente 7-8%.

20

25

80100

Tabla 1

Almacenaje	[Amortiguador]	[Metionina + Citrato]	% de APM
Control (Almacenado a -80°C)	20 mM de reactivo grado Histidina	ninguno	1.1
oscuridad	20 mM de reactivo grado Histidina	ninguno	26.6
Control (almacenado a -80°C)	20 mM de reactivo grado Histidina	10 mM de Metionina + 10 mM de Citrato	0.9
oscuridad	20 mM de reactivo grado Histidina	10 mM de Metionina + 10 mM de Citrato	7.9
Control (almacenado a -80°C)	20 mM de USP grado Histidina	ninguno	0.0
oscuridad	20 mM de USP grado Histidina	ninguno	25.8
Control (almacenado a -80°C)	20 mM de USP grado Histidina	10 mM de Metionina + 10 mM de Citrato	0.0
oscuridad	20 mM de USP grado Histidina	10 mM de Metionina + 10 mM de Citrato	7.7

Ejemplo 7

Efecto de Metionina en la Aglomeración de Proteína de una
Formulación de Proteína REFACTO® Almacenada Bajo Luz
Fluorescente

En esta serie de experimentos, los efectos de metionina en la fragmentación de REFACTO® que se expuso a luz fluorescente, fueron examinados durante un periodo de 1 mes.

Se formuló REFACTO® como un líquido a aproximadamente 250 IU/ml en 20 mM de histidina o 20 mM de amortiguador de succinato. Algunas de estas formulaciones también contienen 10 mM de metionina y 10 mM de citrato.

Todas las formulaciones contienen 4 mM de cloruro de calcio y 310 mM de cloruro de sodio, y 0.02% de Tween-80. El pH de las formulaciones fue 6.5. Las muestras fueron almacenadas a temperatura ambiente por aproximadamente 1 mes bajo luz fluorescente, y la formación de aglomerados se valoró por CET-CLAR. Las muestras de control se formularon como anteriormente y se almacenaron a -80°C.

En las muestras de control, con respecto a la presencia de metionina y citrato, el % de niveles de APM permaneció sin cambio a 0% de APM (véase, Tabla 2). En las formulaciones amortiguadas con USP de grado histidina, sin metionina y citrato, el % de APM fue de 21% después de 1 mes de almacenaje bajo luz fluorescente, indicando un alto nivel de aglomeración. En formulaciones amortiguadoras de USP de grado histidina que contienen metionina y citrato, sin embargo, la aglomeración se redujo sobre el mismo periodo de tiempo, con un % de APM de solamente aproximadamente 2%.

De manera similar, en formulaciones amortiguadas de succinato que carecen de metionina y citrato, el % de APM fue 25%, mientras las formulaciones amortiguadas de succinato que contienen metionina y citrato, tienen solamente 9% de APM (véase, Tabla 3).

De este modo, metionina y citrato disminuyen la aglomeración de REFACTO® formulado en amortiguadores de histidina o succinato y almacenados bajo luz fluorescente,

comparados con REFACTO® formulado sin metionina y citrato.

Tabla 2

5

10

15

Almacenaje	[Amortiguador]	[Metionina + Citrato]	% de APM
Control (almacenado a -80°C)	20 mM de USP grado Histidina	ninguno	0.0
Luz	20 mM de USP grado Histidina	ninguno	21.2
Control (almacenado a -80°C)	20 mM de USP grado Histidina	10 mM de Metionina + 10 mM de citrato	0.0
Luz	20 mM de USP grado Histidina	10 mM de Metionina + 10 mM de citrato	1.7
Control (almacenado a -80°C)	20 mM de reactivo grado succinato	ninguno	1.1
Luz	20 mM de reactivo grado succinato	ninguno	24.7
Control (almacenado a -80°C)	20 mM de reactivo grado succinato	10 mM de Metionina + 10 mM de citrato	1.0
Luz	20 mM de reactivo grado succinato	10 mM de Metionina + 10 mM de citrato	9.2

Ejemplo 8

Efecto de Metionina en Potencia de REFACTO®

20

25

Los efectos de metionina en la potencia de REFACTO® que fueron ya sea mantenidos en la oscuridad o expuestos a luz fluorescente, se examinaron sobre un periodo de 1 mes. REFACTO® se formuló como un líquido a aproximadamente 250 IU/ml en 20 mM de histidina ó 20 mM de amortiguador de succinato. Algunas de estas formulaciones también contienen

10 mM de metionina y 10 mM de citrato. Las muestras fueron expuestas a condiciones de luz fluorescentes o de oscuridad por 1 mes a temperatura ambiente.

5 REFACTO® sufre una gran pérdida de potencia en las soluciones amortiguadas formuladas sin metionina y citrato después de 1 mes de almacenaje a temperatura ambiente en ya sea, muestras expuestas a luz fluorescente (véase, Figura 6). REFACTO® almacenado en la oscuridad en la presencia de metionina, no sufre efectos perjudiciales en potencia, mientras 10 REFACTO® almacenado bajo luz fluorescente en la presencia de metionina, sufre de alguna pérdida en potencia, pero todavía retiene una potencia superior que las muestras almacenadas sin metionina, lo cual resulta en una completa pérdida de potencia.

15

Ejemplo 9

La Oxidación Disminuye la Multimerización de rhIL-11

Este experimento se dirige a probar el efecto de adición de metionina en la multimerización de IL-11.

20

Cuatrocientos viales fueron llenados a mano a 0.1 mg/ml con sustancia de fármaco IL-11 humano recombinante (rhIL-11) (1.0 ml lleno en un vial de entubado de 5 ml) y liofilizado usando un ciclo de liofilización estándar por rhIL-11. Doscientos viales que contienen rhIL-11 formulados 25 con 10 mM de NaPO₄, 300 mM de glicina, pH 7.0, y los

restantes se formularon con 10 mM de NaPO₄, 300 mM de glicina, 10 mM de metionina, pH 7.0. Se usaron cuatro diferentes tapones de 13 mm como cierres de contenedores. Cada tipo de tapón se usó en 100 viales. Los tapones se enjuagaron, hirvieron y después se sometieron a autoclave. La mitad de los tapones entonces se secó por 16 horas a 100°C. Los viales se colocaron en estabilidad acelerada a corto término a 4°C, 40°C y 50°C por dos y cuatro semanas. Los viales fueron ensayados a T=0 y a 2 y 4 semanas por formación de oxidación y multímero de Met⁵⁸. Se usó FI-CLAR (baja carga), para determinar el grado de oxidación de Met⁵⁸ en rhIL-11, mientras el CET-CLAR se usó para monitorear la generación de multímero rhIL-11.

Se construyó un trazo inicial para probar cualquier correlación directa entra la oxidación y multimerización (véase, Figura 7). Estos datos muestran que cuando los niveles de oxidación son altos, los niveles de multímeros son bajos, y que cuando los niveles de oxidación son bajos, los niveles de multímeros son altos.

Estos datos indican que la oxidación y multimerización de rhIL-11, parece que ocurre bajo circunstancias opuestas. Cuando los parámetros son optimizados para minimizar la oxidación de rhIL-11, se incrementa la multimerización.

REIVINDICACIONES

Habiéndose descrito la invención como antecede, se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes reivindicaciones:

5

1. Un método para reducir la aglomeración de una proteína en una formulación de proteína que comprende agregar metionina a la formulación a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM, en donde
10 el método resulta en aglomeración reducida de la proteína en la formulación comparada con la proteína en una formulación que carece de metionina.

2. El método de la reivindicación 1, en donde la
15 formulación de proteína es una formulación líquida, o un polvo secado por congelamiento.

3. El método de la reivindicación 1, en donde la proteína está a una concentración de entre aproximadamente
20 0.1 mg/ml y aproximadamente 300 mg/ml.

4. El método de la reivindicación 1, en donde la formulación de proteína comprende un tensoactivo.

25 5. El método de la reivindicación 1, en donde la

formulación de proteína comprende un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de arginina, lisina, ácido aspártico, glicina y ácido glutámico.

5 6. El método de la reivindicación 1, en donde la formulación de proteína comprende un modificador de tonicidad.

7. El método de la reivindicación 1, en donde la
10 formulación de proteína comprende azúcar.

8. El método de la reivindicación 1, en donde la formulación de proteína además comprende un agente que reduce la aglomeración de la proteína de la formulación.

15 9. El método de la reivindicación 1, en donde la aglomeración de proteína no es el resultado de la oxidación de metionina.

20 10. El método de la reivindicación 1, en donde la aglomeración de la proteína de la formulación se valora antes y/o después de agregar metionina a la formulación.

11. El método de la reivindicación 10, en donde la
25 aglomeración se valora por CET-CLAR, AUC, dispersión de luz y

absorbancia UV.

12. El método de la reivindicación 1, en donde la la
aglomeración se valora por % de especies de APM, y el % de
5 especies de APM se reduce por aproximadamente 30%, comparado
con el % de especies de APM en una formulación que carece de
metionina.

13. El método de la reivindicación 1, en donde la
10 aglomeración de la proteína de la formulación se valora entre
1 semana y 12 semanas después de la adición de metionina a la
formulación de proteína o entre 1 mes y 36 meses después de
la adición de metionina a la formulación de proteína.

14. El método de la reivindicación 1, en donde la
15 aglomeración de la proteína de la formulación se valora
después del almacenaje de la formulación de proteína a una
temperatura entre 4°C y 50°C por aproximadamente 1 semana
hasta aproximadamente 12 semanas, después de elaborar la
20 formulación de proteína con metionina.

15. El método de la reivindicación 1, en donde la
aglomeración de la proteína de la formulación se valora
después del almacenaje de la formulación de proteína a una
25 temperatura entre 4°C y 30°C por aproximadamente 1 mes hasta

aproximadamente 36 meses, después de elaborar la formulación de proteína con metionina.

16. El método de la reivindicación 1, en donde la la
5 aglomeración de la proteína de la formulación es un resultado de resistencia al corte, almacenaje, almacenaje a temperatura elevada, exposición a luz, pH, presencia de tensoactivos y combinaciones de los mismos.

10 17. El método de la reivindicación 1, en donde la metionina se agrega a la formulación a una concentración final de entre aproximadamente 1 mM y 25 mM.

15 18. El método de la reivindicación 1, en donde la formulación tiene un pH de entre aproximadamente 5.0 y 7.0.

19. El método de la reivindicación 1, en donde la formulación de proteína comprende un amortiguador
seleccionado del grupo que consiste de citrato, succinato,
20 histidina, Tris y combinaciones de los mismos.

20. El método de la reivindicación 1, en donde el método incrementa la vida de anaquel de la formulación, o mantiene la potencia de la formulación.

25

21. El método de la reivindicación 1, en donde la formulación de proteína no contiene residuos de metionina o contiene menos de 5 residuos de metionina.

5 22. Un método para reducir la aglomeración de una proteína en una formulación de proteína sometida a resistencia al corte, que comprende agregar metionina a la formulación a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM, en donde el método resulta en
10 aglomeración reducida de la proteína en la formulación comparada con la proteína en una formulación que carece de metionina.

23. El método de la reivindicación 22, en donde la
15 resistencia al corte es el resultado de sacudimiento, extracción en una jeringa y procedimientos de purificación, y combinaciones de los mismos.

24. Un método para reducir una pérdida en potencia o
20 actividad biológica de una proteína en una formulación de proteína después del almacenaje de la formulación a temperatura ambiente por más de un día, que comprende agregar metionina a la formulación a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM, con ello
25 reduciendo la pérdida en potencia o actividad biológica de la

proteína en la formulación comparada con la proteína en una formulación que carece de metionina.

25. El método de la reivindicación 24, en donde la
5 formulación de proteína se almacena bajo luz fluorescente.

26. El método de la reivindicación 24, en donde la formulación de proteína se almacena en la oscuridad por aproximadamente 1 mes.

10

27. Un método para reducir la aglomeración de una proteína en una formulación de proteína, que comprende:

(i) agregar metionina a la formulación a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente
15 145 mM; y

(ii) determinar el % de niveles de APM de la proteína de la formulación por CET-CLAR;

en donde el método resulta en aglomeración reducida de la proteína en la formulación comparada con la proteína en
20 una formulación que carece de metionina.

28. El método de la reivindicación 27, en donde el método resulta en una formulación de proteína que tiene menos de aproximadamente 5% de especies de APM como se determina
25 por CET-CLAR.

03111

29. Una formulación de proteína que comprende uno de un anticuerpo anti-B7.1, un anticuerpo anti-B7.2, un anticuerpo anti-CD22, PSGL-Ig y Factor VIII o un fragmento del mismo biológicamente activo y aproximadamente 0.5 mM hasta 50 mM de metionina.

30. La formulación de la reivindicación 29, que además comprende 1-150 mM de un aminoácido seleccionado del grupo que consiste de arginina, lisina, ácido aspártico y ácido glutámico.

15

20

RESUMEN DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a métodos para
5 reducir la aglomeración de una proteína o proteínas en una
formulación y formulaciones de proteínas que tienen
propiedades de aglomeración reducidas. Los métodos y
formulaciones descritas en este documento, mantienen la
actividad biológica de una proteína e incrementan la vida de
10 anaquel de las formulaciones de proteína.

15 BOGDMS-128179.DOC

03113

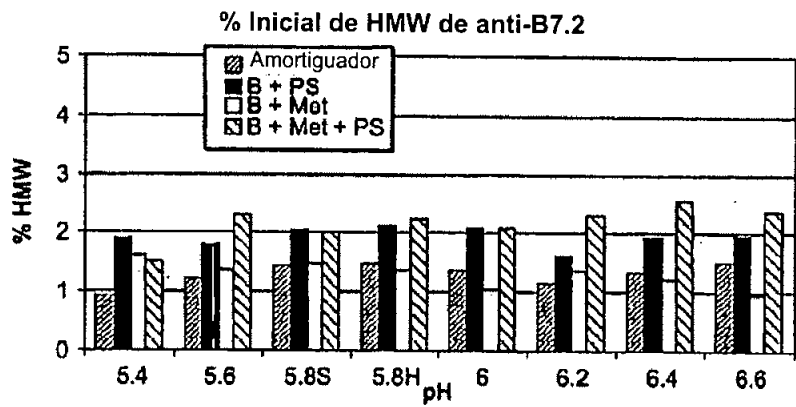


FIG. 1A

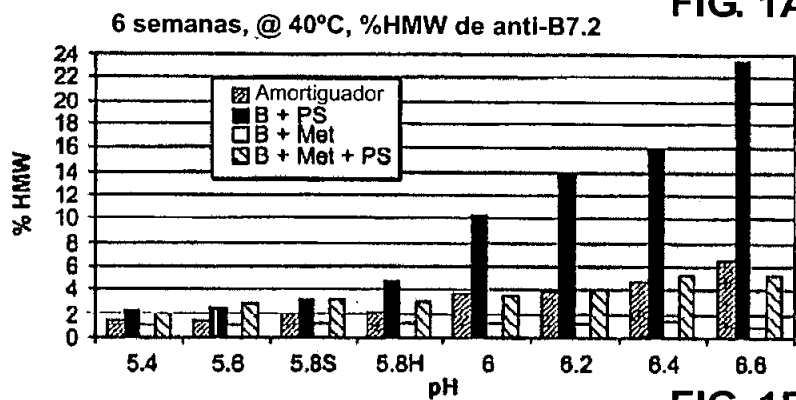


FIG. 1B

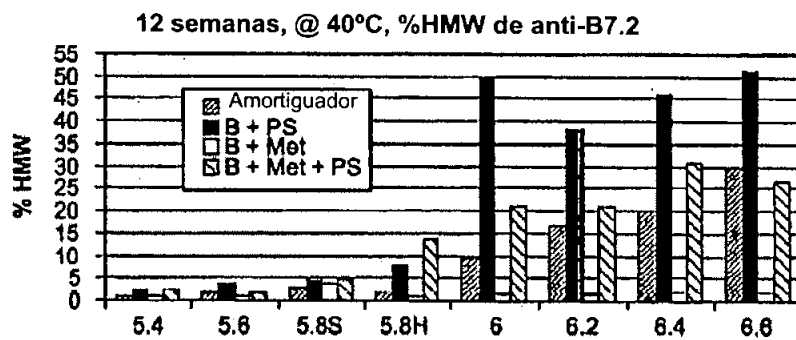


FIG. 1C

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

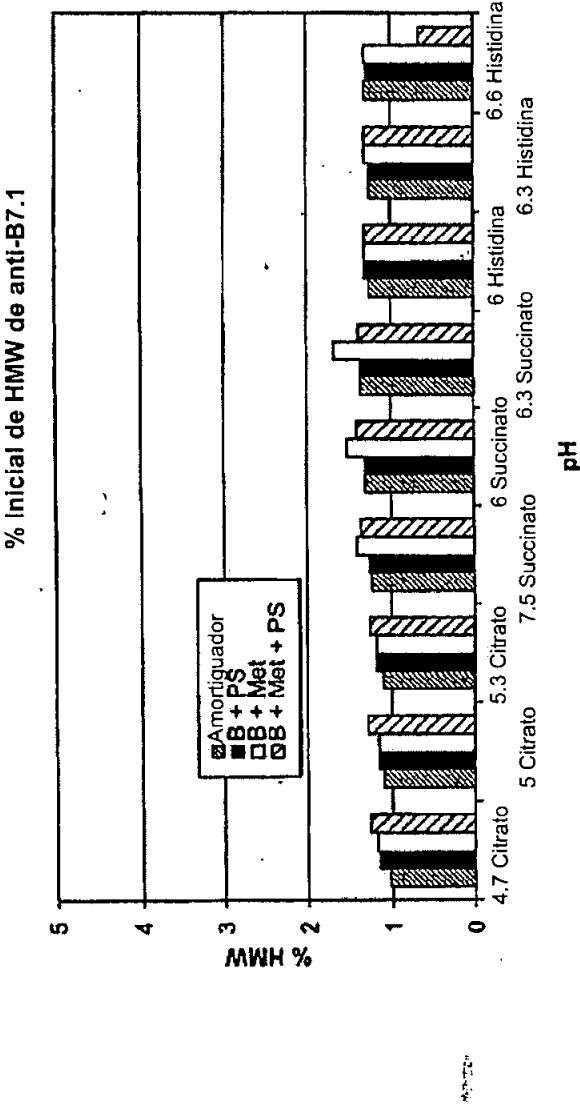


FIG. 2A

00115

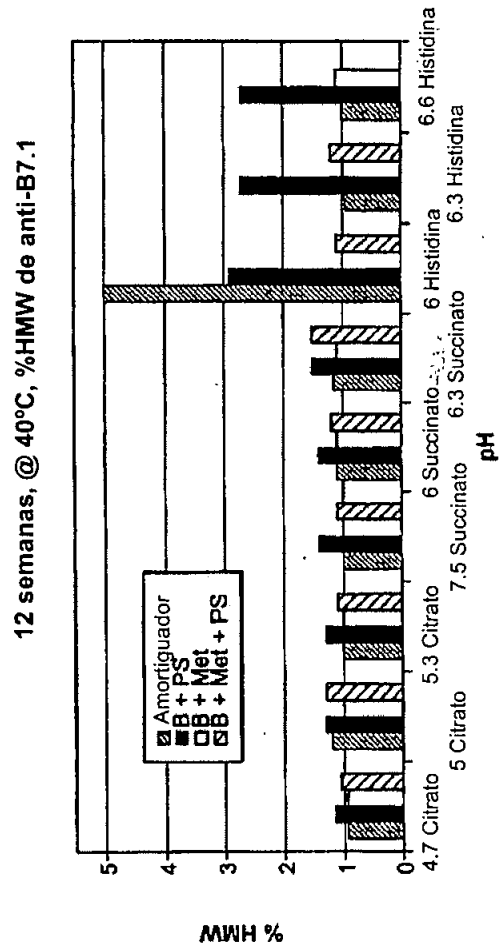


FIG. 2B

03116

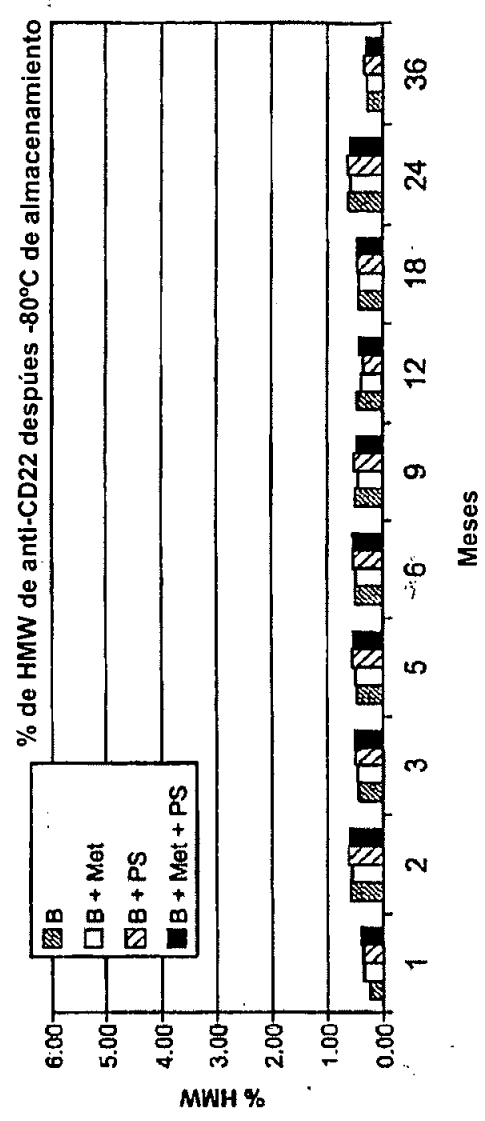


FIG. 3A

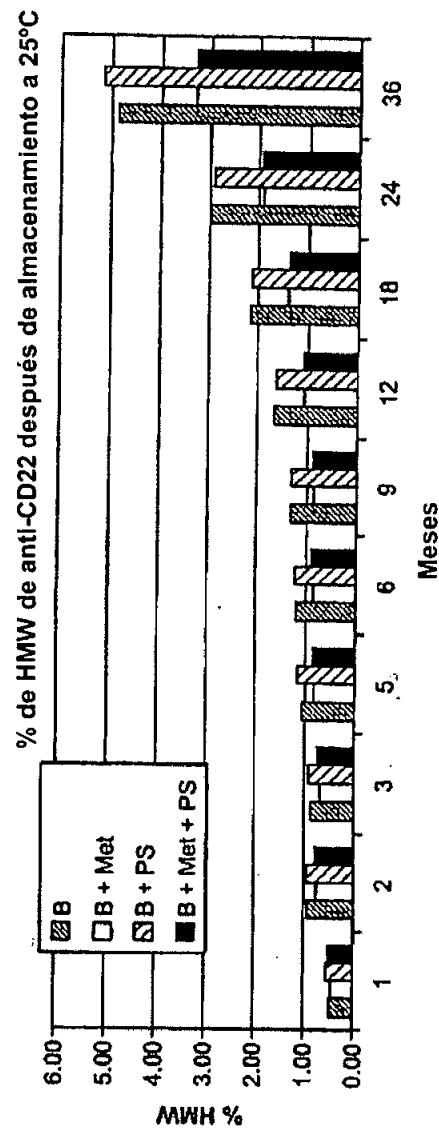


FIG. 3B

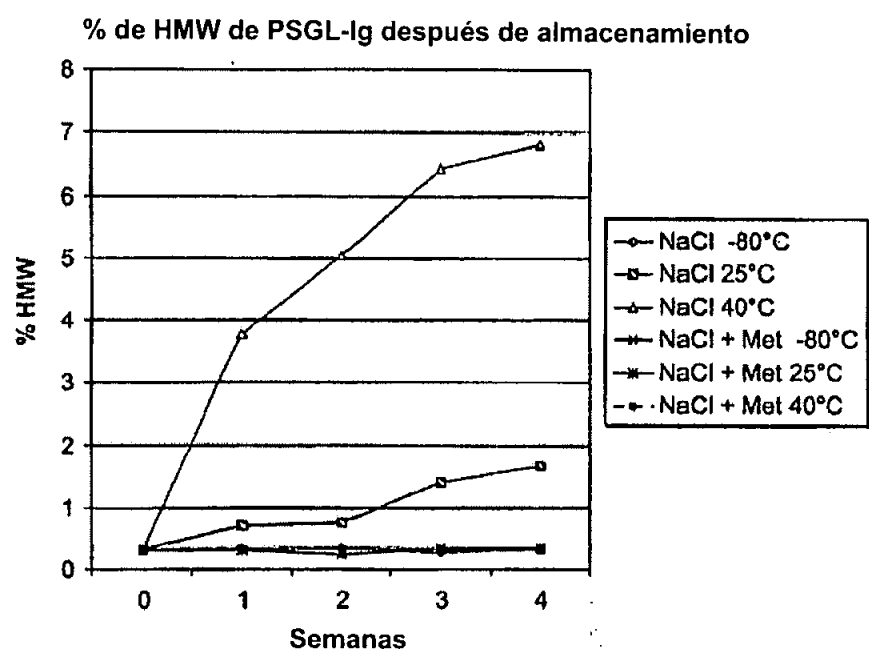


FIG. 4

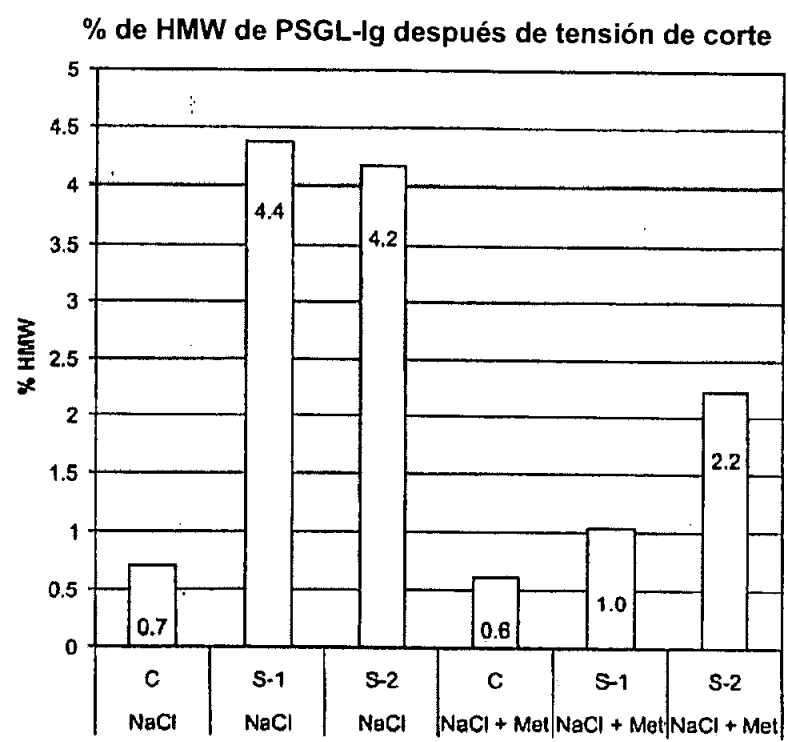


FIG. 5

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

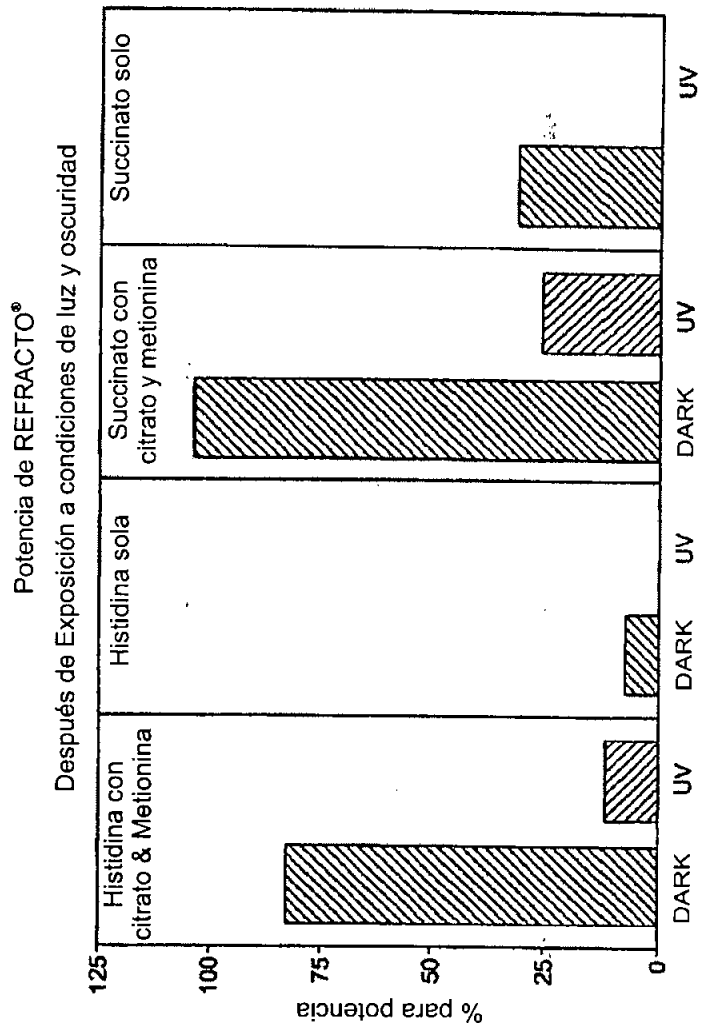


FIG. 6

Secuencia de Aminoácido de Anticuerpo Anti-B7.1

Cadena Liviana

Péptido de señal :

-22 MDFHVQIFSF MLISVTVILS SG

h1F1:

1 DIQMTQSPSS LSASVGDRVIT ITCVSSSSIS SSNLHWYQOK PGKAPKPLIY
51 GTSNLASGVP SRFSGSGSGT DYTLTISLQ PEDVATYYCQ QWSSYPLTFG
101 QGTKVEIKRT VAAPSVFIFP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPREAKVQWK
151 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSL TLISKADYKHKVYACEVTHQ
201 GLSSPVTKSF NRGEC

→ Cadena Pesada (SEQ.ID NO:1)

Cadena Pesada

Péptido de señal :

-19 MKCSWVIFFL MAVVTGVNS

h1F1:

1 EVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKPSGFSNK DYIMHWVRQA PGQGLEWIGW
51 IDPENGNTLY DPKFQKATI TADTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREG
101 LEFAYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP
151 EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVWTVPS NFGTQTYTCN
201 VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPFCPAPF APSVFLFPP KPKDTLMISR
251 TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRWVS
301 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGPPE PQVYTLPPSR
351 EEMTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PMLDSDGSFF
401 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK

Cadena Liviana ←

→ Cadena pesada

FIG. 8 (SEQ ID NO:2)

HOJA SUSTITUTA (REGLA 26)

Secuencia de Aminoácido de Anticuerpo Anti-B7.2

Cadena Liviana

Péptido de señal :

-20 MDSQAQVLIL LLLWVSGTCG

h3D1:

1 DIVLTQSPDS LAVSLGERAT ISCKSSQSLL NSRTRENYLA WYQQKPGQPP
51 KLLIYWASTR ESGVPDRFSG SGSGTDFTLT ISSLQAEDVA VYYCTQSYNL
101 YTFGQGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK
151 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYISL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE
201 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC

→ Cadena Pesada (SEQ ID NO:3)

Cadena Pesada

Péptido de señal :

-19 MGWNCIIFFL VTTATGVHS

h3D1:

1 QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYTFT DYAIQWVRQA PGQGLEWIGV
51 INIYYDNTNY NQKPKGKATM TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARAA
101 WYMDYWGQGT LVTVSSASTK GPSVFPLAPC SRSTSESTAA LGCLVKDYFP
151 EPVTVSWNSG ALTSGVHTFP AVLQSSGLYS LSSVVTVPSS NFGTQTYTCN
201 VDHKPSNTKV DKTVERKCCV ECPPCPAPFA APSVLEFPP KPKDTLMISR
251 TPEVTCVVVD VSHEDPEVQF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ FNSTFRVVS
301 LTVVHQDWLN GKEYKCKVSN KGLPAPIEKT ISKTKGQPRE PQVYTLPPSR
351 EEMTKNQVSL TCLVKGFPYS DIAVEWESNG QPENNYKTP PMLDSGDSFF
401 LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK

Cadena Liviana ←

→ Cadena pesada

FIG. 9

(SEQ ID NO:4)

Secuencia de Aminoácido de Anticuerpo Anti-CD22

Cadena Pesada de mAbG544 Anti-CD22 humanizada

1	<u>MDFGFSLVFL</u>	<u>ALILKGVQCE</u>	VQLVQSGAEV	KKPGASVKVS	CKASGYRFTN
51	YWIHWVRQAP	QGGLEWIGGI	NPGNNYATYR	RKFQGRVTMT	ADTSTSTVYM
101	ELSSLRSEDT	AVYYCTREGY	<u>GNYGANFAYW</u>	GQGLTVTVSS	ASTKGPSVFP
151	LAPCSRSTSE	STAALGCLVK	DYFPEPVTVS	WNSGALTSGV	HTFPAVLQSS
201	GLYSLSSVVT	VPSSSLGTKT	YTCNVDHKPS	NTKVDKRVES	KYGPPCPPCP
251	APEFLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSQED	PEVQFNWYVD
301	GVEVHNAKTK	PREEQFNSTY	RVSVLTIVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPS
351	SIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSQEEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE
401	WESNGQPENN	YKTPPVLDL	DGSFFLYSRL	TVDKSRWQEG	NVFSCSVMHE
451	ALHNHYTQKS	LSLSLGK	(SEQ ID NO:5)		

Cadena Kappa de mAb G544 anti-CD22 humanizada

1	<u>MKLPVRLVL</u>	<u>LLFWIPASRG</u>	DVQVTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRSSQSLA
51	NSYGNITFLSW	YLHKPGKAPQ	LLIYGISNRF	SGVPDRFSGS	SGTDFTLTI
101	SSLQPEDFAT	YYCLQGTHQF	YTFGQGTKVE	IKRTVAAPSV	FIFPPSDEQL
151	KSGTASVVCL	LNHFYPREAK	VQWKVDNALQ	SGNSQESVTE	QDSKDYSTSL
201	SSTLTLSKAD	YEKHKVYACE	VTHQGLSSPV	TKSFNRGEC	(SEQ ID NO:6)

88128

FIG. 11A
FIG. 11B

FIG. 11

FIG. 11A

Secuencia de aminoácido de REFACTO°

1	ATRRYYLGAVELSWDYMQSDLGELPVDAREFPPRPVPSFPFNTSVVYKKTLL	A1
101	FVEFTDHLFNIAPRPPWMGLLGPTIQAEVYDTVVITLKNMASHPVSLHA	
	VGVSYYKASEGAEYDDQTSQREKEDKVFPGGSHTYVWQVLKENGPMASD	
201	PI[CL]TYSYLSHVDLVKDLNSGLIGALLV[CR]EGSLAKEKTQTLHKFILLFA	
	VFDEGKSWHSETKNSLMQDRDAASARAWPKMHTVNGYVNRSLPGLIG[CH]R	
301	KSVYWHVIGMGTTPEVHSIFLEGHTFLVR[NH]RQASLEISPIFTLTAQTLL	
	MDLGQELLFCHISSHQHDGMEAYVKVDS[CF]EEPQLRMKNNEEAEDYDDDL	
401	TDSEMDVVRFDDDDNSPSFIQIRSVAKKHPKTWVHYIAAEEEDWDYAPLVL	
	APDDRSYKSQYLNNGPQRIGRKYKKVREMAYTDETFKTREAIQHESGILG	
501	PLLYGEVGDTLIIIFKNQASRPYNIYPHGITDVRPLYSRRLPKGVKHLKD	A2
	FPI[LP]GEIFKYKWTVTVEDGPTKSDPR[CL]TRYSSSFVNMERDLASGLIGP	
601	LLI[CY]KESVDQQRGNQIMSDKRNVLFSVFDENRSWYLTENIQRFLPNPAG	
	VQLEDPEFQASNIMHSINGYVFDLSL[CL]LHEVAYWYILSIGAQTDFLS	
701	VFFSGYTFKHK[MV]YEDTLTLFPESGETVFMSPENPGLWILGCHNSDFRNR	
	GMTALLKVSS[CD]KNTGDYEDSYEDISAYLLSKNNAIEPRFSQNPPVLK	
	RHQR	

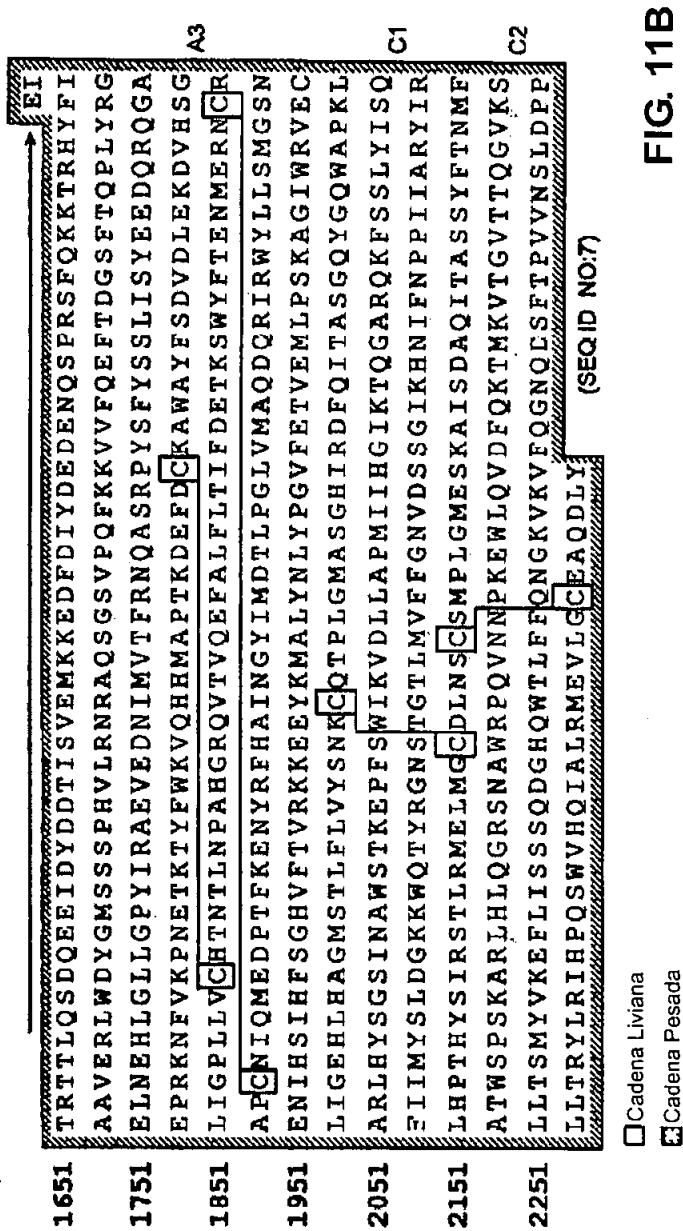


FIG. 11B

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 446/08 de un documento escrito en inglés, el cual para su identificación se sella con el sello del Traductor. Esta es una Traducción Oficial efectuada el día 4 de agosto de 2008 por la Sra. María Teresa Lara, c.c. 41.568.055 de Bogotá, Traductora Oficial según Resolución No. 01016 del 2 de octubre de 1998, expedida por el Ministerio de Justicia.

=====

Poder otorgado por WYETH para su representación en relación con asuntos de propiedad industrial en Colombia. Certificación notarial suscrita por Michelle L. McGowan, Notario Público del estado de Nueva Jersey, y legalizaciones subsiguientes.

EL PODER Y LA CERTIFICACIÓN NOTARIAL NO SE TRADUCEN POR ENCONTRARSE EN INGLÉS Y ESPAÑOL EN EL DOCUMENTO ORIGINAL.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE OCTUBRE DE 1998

(Fdo.) Michelle L. McGowan

[Sello] MICHELLE L. MCGOWAN
Notario Público, Estado de Nueva Jersey
No. 2108903
Habilitada en el Condado de Morris
La comisión expira el 9 de febrero de 2011

(Sello notarial
en relieve)

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
2. Este documento público ha sido firmado por: Michelle L. McGowan
3. actuando en calidad de: Notario Público de Nueva Jersey
4. lleva el sello/timbre de: Michelle L. McGowan, Notario

COMO NOTARIA ONCE (E) DE ESTE
CIRCULO HAGO CONSTAR QUE ESTA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL
ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
19 SET 2008
BOGOTA, D.C. - COLOMBIA
MONICA ZULMA BAUTISTA NAVARRO
NOTARIA ONCE (11) E.

128

CERTIFICADO

5. en Trenton, Nueva Jersey
6. el día 28 de julio de 2008
7. por R. David Rousseau, TESORERO DE NUEVA JERSEY
8. No. A334737
9. Sello/Timbre:
10. Firma

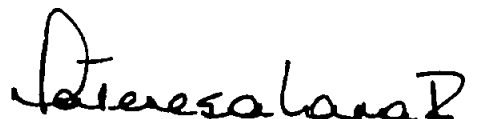
(Sello del Estado
de Nueva Jersey)

(Fdo.) R. David Rousseau

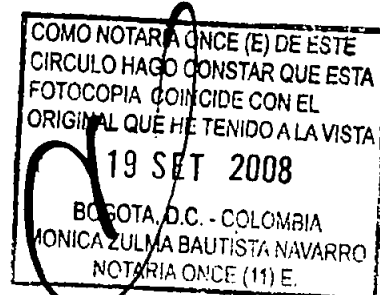
=====

La anterior es traducción fiel y completa del documento en referencia, de la cual se deja copia en este archivo para su confrontación.

MARIA TERESA LARA R.
TRADUCTORA OFICIAL
RESOLUCION No. 01016
DE OCTUBRE DE 1998



María Teresa Lara R.
c.c. 41.568.055 de Bogotá
Traductora Oficial según
Resolución No. 01016 del
2 de octubre de 1998, del
Ministerio de Justicia



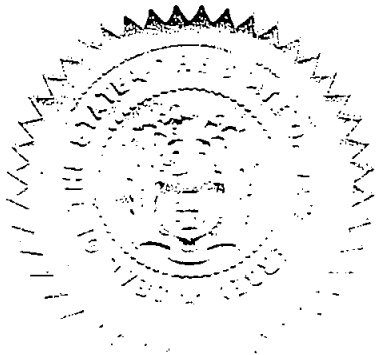
APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

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

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 28TH DAY OF JULY 2008
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO. A334737
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



COMO NOTARIA ONCE (E) DE ESTE
CIRCULO HAGO CONSTAR QUE ESTA
FOTOCOPIA CONCIDE CON EL
ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
19 SET 2008
BOGOTA, D.C. - COLOMBIA
MONICA ZULMA BAUTISTA NAVARRO
NOTARIA ONCE (11) E.

POWER OF ATTORNEY

The undersigned,

WYETH

with offices at

**Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America**

declares that it hereby grants to

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ and/or
OLGA GEORGETTE OTERO and/or
RICARDO METKE and/or
JUAN PABLO CONCHA**

all members of the law firm Baker & McKenzie Colombia S.A., with domicile at Av. 82 No. 10 - 62, 6Th floor, of Bogotá D. C., Colombia, and for so long as they remain members of the law firm, a full and sufficient Power of Attorney to obtain the protection of my (our) industrial property for which purpose I (we) authorize the said attorneys to represent me (us) before administrative, and judicial authorities or persons, in all matters concerning the following: a) obtainment of patents, including filing of assignments, change of name or address, and at my (our) specific direction, voluntary cancellation, defending and filing of oppositions, cancellations, annulment and criminal actions, and in general the civil, criminal, and administrative processes relating to those rights.

I hereby ratify all lawful actions previously taken on behalf of this company by the aforementioned attorneys with respect to the mentioned matters.

Done and subscribed in

On the 25th day of July, 2008

Gale F. Matthews
Assistant Secretary

Signature of the person issuing the Power

PODER DE ABOGADO

La abajo firmada,

WYETH

con oficinas en

**Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América**

declara por el presente que otorga a

**ALVARO CORREA-ORDOÑEZ y/o
OLGA GEORGETTE OTERO y/o
RICARDO METKE y/o
JUAN PABLO CONCHA**

todos miembros de la firma de abogados Baker & McKenzie Colombia S.A., con domicilio en la Av. 82 No. 10 - 62 Piso 6 en Bogotá D. C., Colombia, y hasta tanto ellos continúen siendo miembros de la firma, poder amplio y suficiente para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad industrial a, cuyo efecto autorizo (amos) a los dichos apoderados para que me (nos) representen ante autoridades o personas del orden administrativo y judicial, en todo lo concerniente a los siguientes asuntos: a) Obtención de patentes, incluyendo presentación de traspasos, cambio de nombre o dirección y bajo mi (nuestra) expresa(s) instrucción(es), cancelación voluntaria, defensa y presentación de oposiciones, cancelaciones, nulidades, y en general procesos civiles, penales, administrativos relacionados con estos derechos.

Igualmente, ratifico todo lo actuado en derecho hasta el momento en nombre de esta compañía por cualquiera de los mencionados apoderados en los casos mencionados.

Dado y firmado en

A los 25 días del mes de julio de 2008

Gale F. Matthews
Subsecretario

Firma de la persona que firma el Poder
COMO NOTARIA ONCE (E) DE ESTE
CIRCULO HAGO CONSTAR QUE ESTA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL
ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
12 SET 2008
BOGOTA, D.C. - COLOMBIA
MONICA ZULMA BAUTISTA NAVARRO
NOTARIA ONCE (11) E.

NOTARIAL CERTIFICATION

On this 25th day of July
2008, the undersigned Notary

CERTIFIES

1. That Gale F. Matthews

set his hand on the foregoing document.

2. That the grantor is to me personally known and that he/she has legal capacity to execute the instrument.

3. That the grantor has executed the foregoing document as

Assistant Secretary

of the judicial person **WYETH**

4. That the judicial person **WYETH**
having its home office in

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
United States of America

is duly organized, has present legal existence and that the purposes for which the power of attorney is granted are within the scope of its corporate purposes.

5. That the grantor has in fact the referred to authority and that his/her representation is legal.

6. That I have based certifications 3, 4 and 5 above on the following authentic documents for such purpose exhibited to me and which I mention specifically, giving their dates and their origin or source:

Minutes of the Board of Directors Meeting held on May 24, 2008.

Michelle L. McGowan
Notary Public

MICHELLE L. MCGOWAN
Notary Public, State of New Jersey
No. 2108903
Qualified in Morris County
Commission Expires Feb. 9, 2011

CERTIFICACION NOTARIAL

A los 25 días del mes de julio
de 2008, el suscrito Notario

DA FE

1 Que Gale F. Matthews

suscribió de su puño y letra el documento que antecede.

2. Que conozco al otorgante y que éste tiene capacidad legal para el otorgamiento.

3. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

Subsecretario

de la persona jurídica **WYETH**

4. Que la persona jurídica **WYETH**
con sede en

Five Giralda Farms, Madison, NJ 07940,
Estados Unidos de América

está legalmente constituida, que tiene existencia legal actual y que el acto para el cual se otorga el poder está comprendido entre los que constituyen su objeto social.

5. Que el otorgante tiene efectivamente la representación que ostenta y que ésta es legítima.

6. Que he basado las certificaciones 3, 4 y 5 anteriores en los siguientes documentos auténticos que al efecto se me exhibieron y que menciono específicamente con expresión de sus fechas y de su origen o procedencia:

Actas de la reunión de la Junta Directiva
celebrada el 24 de mayo de 2008.

El Notario Público

COMO NOTARIA ONCE (E) DE ESTE
CICULO HAGO CONSTAR QUE ESTA
FOTOCOPIA COINCIDE CON EL
ORIGINAL QUE HE TENIDO A LA VISTA
19 SET 2008
BOGOTA, D.C. - COLOMBIA
MONICA ZULMA BAUTISTA NAVARRO
NOTARIA ONCE (11) E.

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT		132
(21) N° de solicitud:		(51) Int Cl: A61K 38/20, A61K 38/37, A61K 39/395, A61K 47/18, C07K 16/28		
22) Fecha de solicitud:		(71) Solicitante(s) WYETH		
(30) Prioridad	(31) No. 60/784,130	32) Fecha 20/03/06	(33) País US	(72) Inventor(es) WARNE, Nicholas, William KANTOR, Angela Y OTROS
				(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ
(85)	Fecha limite inicio fase nacional: 20/10/08		(87) Publicación internacional	
(86)	Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha: 27/06/07	
	Fecha de presentación de la solicitud: 19/03/07		N° publicación: WO/2007/109221	
	No. de solicitud PCT/US2007/006787			
(54) Titulo: MÉTODOS PARA REDUCIR LA AGLOMERACIÓN DE PROTEÍNA				

Reivindicaciones:

1. Un método para reducir la aglomeración de una proteína en una formulación de proteína que comprende agregar metionina a la formulación a una concentración de aproximadamente 0.5 mM hasta aproximadamente 145 mM, en donde el método resulta en aglomeración reducida de la proteína en la formulación comparada con la proteína en una formulación que carece de metionina.



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION ☐ **PCT** ☒ **MODELO DE UTILIDAD** ☐ **DISEÑO INDUSTRIAL** ☐ 133

(21) N° de solicitud:

(22) Fecha de solicitud:

(51) Clasificación Internacional : A61K 38/20, A61K 38/37, A61K 39/395, A61K 47/18, C07K 16/28

(71) Solicitante(s) :

WYETH

(72) Inventor(es) : WARNE, Nicholas, William; KANTOR, Angela; CROWLEY, Thomas, Joseph; SOLEY, Erin, Christine; LI, Li; LUKSHA, Nicholas y NEIDHARDT, Edie, Anna

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad

(31) **No. Prioridad**

(32)

Fecha

(33) **País**

60/784,130

20/03/06

US

(85) Fecha inicio fase nacional: 20/10/08

(87) Publicación internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha: 27/09/07

Fecha de presentación de la solicitud: 19/03/07

N° publicación: WO/2007/109221

No. de solicitud **PCT/US2007/006787**

(54) Título:

MÉTODOS PARA REDUCIR LA AGLOMERACIÓN DE PROTEÍNA



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

TARJETA ARCHIVO TEMATICO

134

SUPERINTENDENCIA PATENTE DE INVENCION PCT X MODELO DE UTILIDAD DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud:
(51) Clasificación Internacional : A61K 38/20, A61K 38/37, A61K 39/395, A61K 47/18, C07K 16/28

(71) Solicitante(s)

WYETH

(72) Inventor(es) : WARNE, Nicholas, William; KANTOR, Angela; CROWLEY, Thomas, Joseph; SOLEY, Erin, Christine; LI, Li; LUKSHA, Nicholas y NEIDHARDT, Edie, Anna

(74) Apoderado: ALVARO CORREA ORDOÑEZ

(30) Prioridad (31) **No. Prioridad** (32) **Fecha** (33) **País**
60/784,130 20/03/06 US

(85) Fecha límite inicio fase nacional: 20/10/08

(87) Publicación internacional:

(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT

Fecha: 27/09/07

Fecha de presentación de la solicitud: 19/03/07

No. Publicación : WO/2007/109221

No. de solicitud **PCT/US2007/006787**

(54) Título: **MÉTODOS PARA REDUCIR LA AGLOMERACIÓN DE PROTEÍNA**

(57) Resumen: La presente invención se refiere a métodos para reducir la aglomeración de una proteína o proteínas en una formulación y formulaciones de proteínas que tienen propiedades de aglomeración reducidas. Los métodos y formulaciones descritas en este documento, mantienen la actividad biológica de una proteína e incrementan la vida de anaquel de las formulaciones de proteína.

% de HMW de PSGL-Ig después de tensión de corte

