

MÉTODOS PARA REDUCIR ACTIVIDAD DE LIPASA

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud incorpora por prioridad de referencia y el beneficio de la Solicitud Provisional de Patente núm. US 63/337.532, presentada el 2 de mayo de 2022, la Solicitud Provisional de Patente núm. 63/436.850 presentada el 3 de enero de 2023 y la Solicitud Provisional de Patente núm. 63/499.441 presentada el 1 de mayo de 2023.

LISTADO DE SECUENCIAS

La presente solicitud contiene un listado de secuencias que se ha presentado electrónicamente en formato .xml y se incorpora por la presente como referencia en su totalidad. Esta copia .xml, creada el 31 de enero de 2023, se nombra 070816-03480.xml y tiene un tamaño de 180.926 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere al campo de formulaciones de proteínas terapéuticas. Más específicamente, la presente invención se refiere al campo de formulaciones farmacéuticas con actividad de esterasa o lipasa reducida y/o formación reducida de partículas de ácidos grasos libres.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Entre los productos de fármaco, los bioterapéuticos basados en proteínas son una clase importante de fármacos que ofrecen un alto nivel de selectividad, potencia y eficacia, como lo demuestra el considerable aumento de los ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales (mAb) en los últimos años. Un aspecto crítico para un bioterapéutico clínica y comercialmente viable es la estabilidad del producto de fármaco en términos del proceso de fabricación, así como la vida útil. Los tensioactivos, tal como el polisorbato, se utilizan a menudo para mejorar la estabilidad física de un producto bioterapéutico a base de proteínas. Más del setenta por ciento de los agentes terapéuticos de anticuerpos monoclonales comercializados contienen entre 0,001% y 0,2% de polisorbato, un tipo de tensioactivo, para impartir estabilidad física a los bioterapéuticos basados en proteínas.

La hidrólisis enzimática de polisorbato se ha reconocido como la ruta primaria de

degradación de polisorbato en formulaciones bioterapéuticas. La degradación de polisorbato puede ser causada por la copurificación de esterasas o lipasas durante la producción de un producto de fármaco. La hidrólisis de polisorbato da como resultado la liberación de ácidos grasos libres que pueden impulsar la formación de partículas indeseables en un producto de fármaco. Las partículas pueden ser visibles o subvisibles; las partículas subvisibles típicamente tienen menos de 150 micrones o 100 micrones de diámetro.

Por lo tanto, existe la necesidad de productos de fármaco con actividad de esterasa o lipasa reducida y formación reducida de partículas de ácidos grasos libres, y de métodos para fabricar los mismos.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se han desarrollado productos y métodos para reducir la actividad de esterasa en una composición o formulación, reducir la actividad de lipasa en una composición o formulación, reducir la degradación de polisorbato y reducir la formación de partículas de ácidos grasos. En un aspecto, una muestra que comprende una proteína de interés y una esterasa o lipasa se somete a cromatografía de interacción hidrófoba para producir una sustancia de fármaco formulada y/o un producto de fármaco con actividad de esterasa y/o lipasa reducida, degradación de polisorbato reducida y/o formación de partículas de ácidos grasos libres reducida en comparación con una muestra que no se sometió a cromatografía de interacción hidrófoba. En un aspecto, una muestra que comprende una proteína de interés y una esterasa o lipasa se somete a cromatografía de intercambio aniónico usando un pH de carga alta para producir una sustancia de fármaco y/o producto de fármaco formulado con actividad de esterasa y/o lipasa reducida, degradación de polisorbato reducida y/o formación de partículas de ácidos grasos reducida en comparación con una muestra que no se sometió a cromatografía de intercambio aniónico con un pH de carga alta.

En un aspecto, una muestra que comprende una proteína de interés y una esterasa o lipasa se formula con un polisorbato que comprende una alta concentración de ácido oleico, por ejemplo, > 98% de ácido oleico, para producir una sustancia de fármaco y/o producto de fármaco formulado con actividad de esterasa y/o lipasa reducida, degradación de polisorbato reducida y/o formación de partículas de ácidos grasos reducida en comparación con una muestra que no se formuló con el polisorbato. De manera alternativa, en un aspecto, una muestra que comprende una proteína de interés y una esterasa o lipasa se formula con poloxámero 188 o PEG3350 para producir una sustancia de fármaco y/o

producto de fármaco formulado con actividad de esterasa y/o lipasa reducida, degradación de polisorbato reducida y/o formación de partículas de ácidos grasos reducida en comparación con una muestra que no se formuló con poloxámero 188 o PEG3350. En algunos aspectos, la proteína de interés es un anticuerpo anti-IL4Ra. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4Rα es Dupilumab.

En un aspecto, una sustancia de fármaco formulada que comprende una proteína de interés, un éster de ácido graso y una esterasa o lipasa se somete a estrés, por ejemplo, estrés de agitación o estrés de calor, para inactivar la esterasa o lipasa, degradar la esterasa o lipasa y/o reducir la actividad de esterasa o lipasa, lo que puede causar la formación de especies de esterasa o lipasa de alto peso molecular (HMW, por sus siglas en inglés) y/o proteína de fármaco. La sustancia luego se puede someter a filtración y/o separación, por ejemplo, usando cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de exclusión por tamaño, para eliminar especies de HMW y producir una sustancia de fármaco formulada y/o un producto de fármaco con actividad de esterasa o lipasa reducida, degradación de polisorbato reducida y/o formación de partículas de ácidos grasos libres reducida en comparación con una muestra que no se sometió a estrés y/o filtración/separación. En algunos aspectos, la proteína de interés es un anticuerpo anti-IL4Ra. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4Rα es Dupilumab.

Esta divulgación proporciona métodos adicionales para producir una composición farmacéutica con esterasa o lipasa reducida. En algunos aspectos, estos métodos pueden comprender someter una muestra que incluye una proteína de interés y una esterasa o lipasa a cromatografía de intercambio aniónico, en donde un pH de la muestra cargada en la columna de cromatografía está entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 8,3.

En algunos aspectos adicionales, los métodos para producir una composición farmacéutica con actividad de esterasa o lipasa reducida pueden comprender (a) someter una muestra que incluye una proteína de interés y una esterasa o lipasa a condiciones de estrés para formar una muestra con esterasa o lipasa inactivada; y (b) formular la muestra con esterasa o lipasa inactivada para producir una composición farmacéutica con actividad de esterasa o lipasa reducida.

En un aspecto, la proteína de interés es un anticuerpo, una proteína derivada de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, una proteína de fusión, un conjugado de anticuerpo-fármaco o una proteína terapéutica.

En un aspecto, el paso de formulación comprende agregar un éster de ácido graso a la muestra. En un aspecto específico, el éster de ácido graso es polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 o polisorbato 80. En un aspecto específico, el éster de ácido graso es polisorbato 80 y una concentración de ésteres de ácido oleico en el polisorbato 80 es de al menos 80%. En un aspecto más específico, una concentración de ésteres de ácido oleico en el polisorbato 80 es al menos 98% o al menos 99%.

En un aspecto, las condiciones de estrés incluyen estrés de agitación y/o estrés de calor. En un aspecto específico, el estrés de agitación comprende agitar la muestra a de 50 a 500 rpm, de 200 a 300 rpm, aproximadamente 50 rpm, aproximadamente 75 rpm, aproximadamente 100 rpm, aproximadamente 125 rpm, aproximadamente 150 rpm, aproximadamente 200 rpm, aproximadamente 225 rpm, aproximadamente 250 rpm, aproximadamente 275 rpm, aproximadamente 300 rpm, aproximadamente 325 rpm, aproximadamente 350 rpm, aproximadamente 375 rpm, aproximadamente 400 rpm, aproximadamente 425 rpm, aproximadamente 450 rpm, aproximadamente 475 rpm o aproximadamente 500 rpm. En otro aspecto específico, el estrés de agitación comprende agitar la muestra durante 1 a 96 horas, de 24 a 48 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas o aproximadamente 96 horas.

En un aspecto específico adicional, el estrés de calor comprende almacenar la muestra a aproximadamente 20 °C a aproximadamente 60 °C, aproximadamente 25 °C a aproximadamente 55 °C, aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C, aproximadamente 44 °C a aproximadamente 46 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C o aproximadamente 60 °C. En un aspecto más específico, el almacenamiento es de 1 día a 6 meses, de 3 días a 3 meses, de 1 semana a 2 meses, de 0,5 meses a 1 mes, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 0,5 meses, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7

semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 3,5 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 4,5 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 5,5 meses o aproximadamente 6 meses.

En un aspecto, el método comprende además someter la muestra con esterasa o lipasa inactivada a filtración, enriquecimiento o separación cromatográfica para eliminar especies de lipasa y/o proteína HMW inactivadas antes del paso (b). En un aspecto específico, la separación cromatográfica comprende cromatografía de intercambio catiónico. En otro aspecto específico, la separación cromatográfica comprende cromatografía de exclusión por tamaño.

En un aspecto, el paso de formulación comprende agregar excipientes a la muestra.

Esta divulgación proporciona métodos adicionales para producir una composición farmacéutica con actividad de esterasa o lipasa reducida. En algunos aspectos, los métodos pueden comprender (a) someter el anticuerpo cosechado a cromatografía de afinidad; (b) someter el anticuerpo agrupado del eluato del paso (a) a inactivación viral a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 y luego ajustar el pH a aproximadamente 5 a aproximadamente 8; (c) someter el anticuerpo agrupado del paso (b) a cromatografía de intercambio aniónico en modo de flujo continuo; (d) someter el anticuerpo agrupado del eluato del paso (c) a cromatografía de interacción hidrófoba en modo de flujo continuo; (e) someter el anticuerpo agrupado de fracciones de flujo continuo del paso (d) a filtración de retención de virus; (f) someter una muestra del paso (e) que incluye un anticuerpo de interés y una esterasa o lipasa a estrés de agitación o estrés de calor para formar una composición farmacéutica con actividad de esterasa o lipasa reducida.

En otros aspectos, los métodos pueden comprender (a) someter el anticuerpo cosechado a cromatografía de afinidad; (b) someter el anticuerpo agrupado del eluato del paso (a) a inactivación viral a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 y luego ajustar el pH a aproximadamente 5 a aproximadamente 8; (c) someter el anticuerpo agrupado del paso (b) a cromatografía de intercambio aniónico en modo de flujo continuo; (d) someter el anticuerpo agrupado de fracciones de flujo continuo del paso (c) a filtración de retención de virus; (e) someter una muestra del paso (d) que incluye un anticuerpo de interés y una esterasa o lipasa a estrés para formar una composición farmacéutica con actividad de esterasa o actividad de lipasa reducida.

En un aspecto, los métodos comprenden además someter la composición farmacéutica a filtración, enriquecimiento o separación cromatográfica para eliminar especies de HMW. En un aspecto específico, la separación cromatográfica comprende cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de exclusión por tamaño.

En un aspecto, un pH de la muestra cargada en la columna AEX está entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 8,3.

Esta divulgación proporciona métodos para producir una composición farmacéutica con estabilidad aumentada. En algunos aspectos, los métodos pueden comprender reducir la actividad de esterasa o lipasa en una composición al someter una muestra que incluye una proteína de interés, una esterasa o lipasa y un éster de ácido graso a cromatografía de intercambio aniónico (AEX), en donde un pH de la muestra cargada en la columna AEX está entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 8,3.

En un aspecto, el método comprende además el paso de someter una muestra formada después de la cromatografía de AEX a estrés de calor o estrés de agitación para reducir la actividad de esterasa o lipasa. En un aspecto específico, el método comprende además someter la muestra estresada a separación cromatográfica para eliminar especies de HMW de la esterasa o lipasa.

En un aspecto, el método comprende además la adición de poloxámero 188 o PEG3350 para producir una formulación que comprende una composición farmacéutica con actividad de esterasa o lipasa reducida y estabilidad aumentada. En un aspecto específico, la formulación está sustancialmente libre de polisorbato. En otro aspecto específico, una concentración del poloxámero 188 es de 0,005% a 5%, de 0,05% a 2,5%, de 0,1% a 1%, aproximadamente 0,05%, aproximadamente 0,01%, aproximadamente 0,02%, aproximadamente 0,03%, aproximadamente 0,04%, aproximadamente 0,05%, aproximadamente 0,06%, aproximadamente 0,07%, aproximadamente 0,08%, aproximadamente 0,09%, aproximadamente 0,1%, aproximadamente 0,15%, aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,25%, aproximadamente 0,3%, aproximadamente 0,4%, aproximadamente 0,5%, aproximadamente 1%, aproximadamente 1,5%, aproximadamente 2%, aproximadamente 2,5%, aproximadamente 3%, aproximadamente 3,5%, aproximadamente 4%, aproximadamente 4,5% o aproximadamente 5%. En aun otro aspecto específico, una concentración del PEG3350 es de 0,005% a 5%, de 0,05% a 2,5%, de 0,1% a 1%, aproximadamente 0,05%,

aproximadamente 0,01%, aproximadamente 0,02%, aproximadamente 0,03%,
aproximadamente 0,04%, aproximadamente 0,05%, aproximadamente 0,06%,
aproximadamente 0,07%, aproximadamente 0,08%, aproximadamente 0,09%,
aproximadamente 0,1%, aproximadamente 0,15%, aproximadamente 0,2%,
aproximadamente 0,25%, aproximadamente 0,3%, aproximadamente 0,4%,
aproximadamente 0,5%, aproximadamente 1%, aproximadamente 1,5%, aproximadamente 2%,
aproximadamente 2,5%, aproximadamente 3%, aproximadamente 3,5%,
aproximadamente 4%, aproximadamente 4,5% o aproximadamente 5%.

Esta divulgación proporciona métodos adicionales para producir una composición farmacéutica con estabilidad aumentada. En algunos aspectos, los métodos pueden comprender (a) someter una proteína recombinante cosechada a cromatografía de intercambio aniónico en modo de flujo continuo; (b) someter fracciones de flujo continuo del paso (a) a cromatografía de interacción hidrófoba en modo de flujo continuo; y (c) formular proteína recombinante aislada del paso (b) con polisorbato 80, en donde una concentración de ésteres de ácido oleico en el polisorbato 80 es al menos 80%.

En un aspecto, una concentración de los ésteres de ácido oleico es al menos 98% o al menos 99%.

En un aspecto, un pH de la muestra cargada en la columna de cromatografía de intercambio aniónico es de aproximadamente 7,8 a aproximadamente 8,3, de aproximadamente 7,9 a aproximadamente 8,2, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,1, aproximadamente 8,2 o aproximadamente 8,3.

En algunos aspectos, la proteína de interés o proteína recombinante es un anticuerpo anti-IL4Ra. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R α es Dupilumab.

Estos y otros aspectos de la invención se apreciarán y entenderán mejor cuando se consideren junto con la siguiente descripción y las figuras anexas. La siguiente descripción, en tanto que indica varios aspectos y numerosos detalles específicos de la misma, está dada a modo de ilustración y no de limitación. Se pueden realizar muchas sustituciones, modificaciones, adiciones o reordenamientos dentro del alcance de la invención.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La figura 1 muestra un cromatograma que muestra cantidades relativas de diferentes

especies moleculares con (A) polisorbato 20 de menor calidad (PS20-A), (B) polisorbato 20 de mayor calidad (PS20-B) y (C) polisorbato 80 (PS80), de acuerdo con un aspecto.

La figura 2A muestra la formación de partículas en formulaciones de mAb1 que comprenden SR-PS80 medida por microscopía de membrana, de acuerdo con un aspecto.

La figura 2B muestra la formación de partículas en formulaciones de mAb1 que comprenden HP-PS20 medida por microscopía de membrana, de acuerdo con un aspecto.

La figura 2C muestra la formación de partículas en formulaciones de mAb1 que comprenden SR-PS80 medida por MFI, de acuerdo con un aspecto.

La figura 2D muestra la formación de partículas en formulaciones de mAb1 que comprenden HP-PS20 medida por MFI, de acuerdo con un aspecto.

La figura 3A muestra la recuperación de polisorbato en formulaciones de mAb1 que comprenden SR-PS80 medida por CAD-UHPLC, de acuerdo con un aspecto.

La figura 3B muestra la recuperación de polisorbato en formulaciones de mAb1 que comprenden HP-PS20 medida por CAD-UHPLC, de acuerdo con un aspecto.

La figura 4 muestra una correlación entre la formación de partículas y la recuperación de polisorbato en formulaciones de mAb1, de acuerdo con un aspecto.

La figura 5 muestra una correlación entre la formación de partículas y la recuperación de polisorbato en formulaciones de mAb5, de acuerdo con un aspecto.

La figura 6A muestra la formación de partículas en formulaciones de mAb1 que comprenden SR-PS80 y sometidas a purificación de HIC medida por microscopía de membrana, de acuerdo con un aspecto.

La figura 6B muestra la formación de partículas en formulaciones de mAb1 que comprenden HP-PS20 y sometidas a purificación de HIC medida por microscopía de membrana, de acuerdo con un aspecto.

La figura 6C muestra la formación de partículas en formulaciones de mAb1 que comprenden SR-PS80 y se someten a purificación de HIC medida por MFI, de acuerdo con un aspecto.

La figura 6D muestra la formación de partículas en formulaciones de mAb1 que

comprenden HP-PS20 y se someten a purificación de HIC medida por MFI, de acuerdo con un aspecto.

La figura 7A muestra la recuperación de polisorbato en formulaciones de mAb I que comprenden SR-PS80 y sometidas a purificación de HIC medida por CAD-UHPLC, de acuerdo con un aspecto.

La figura 7B muestra la recuperación de polisorbato en formulaciones de mAb1 que comprenden HP-PS20 y sometidas a purificación de HIC medida por CAD-UHPLC, de acuerdo con un aspecto.

La figura 8 muestra una correlación entre la actividad de fosfolipasa (en partes por millón) y el porcentaje de degradación de polisorbato 20, de acuerdo con un aspecto.

La figura 9 muestra una visualización de modelos generados para un estudio multivariante de factores de riesgo y respuestas de AEX, de acuerdo con un aspecto.

La figura 10 muestra una comparación del rendimiento de actividad de lipasa de agrupación de AEX (%) durante los lotes de confirmación en comparación con las predicciones a pequeña escala de las simulaciones de Monte Carlo, de acuerdo con un aspecto.

La figura 11 muestra la recuperación de polisorbato de formulaciones que comprenden mAb5, mAb6 y mAb7, de acuerdo con un aspecto.

La figura 12 muestra la recuperación de polisorbato de formulaciones de mAb5 a concentraciones y tiempos de incubación variables, de acuerdo con un aspecto.

La figura 13 muestra un modelado de homología que representa la hidrofobicidad de superficie de mAb5, mAb6 y mAb7, de acuerdo con un aspecto.

La figura 14 muestra una cantidad de partículas subvisibles ($\geq 10 \mu\text{m}$) medidas mediante el método microscópico de membrana, en productos farmacéuticos de proteína que comprenden varios tipos de polisorbato 80, de acuerdo con un aspecto.

La figura 15 muestra una cantidad de partículas subvisibles ($\geq 10 \mu\text{m}$) medidas por formación de imágenes de microflujo (MFI), en productos farmacéuticos de proteínas que comprenden varios tipos de polisorbato 80, de acuerdo con un aspecto.

La figura 16 muestra una estructura química de monooleato de sorbitán

polioxietilenado (20), el éster de ácido graso predominante en polisorbato 80, de acuerdo con un aspecto.

La figura 17 muestra una concentración medida de ácidos grasos libres en productos farmacéuticos de proteína que comprenden varios tipos de polisorbato 80, de acuerdo con un aspecto.

La figura 18A ilustra una estructura de polisorbato y rutas de degradación principales, de acuerdo con un aspecto.

La figura 18B ilustra una estructura de poloxámero 188, de acuerdo con un aspecto.

La figura 19 muestra la recuperación de tensioactivo para formulaciones de mAb5 que comprenden PS20, PS80 o poloxámero 188 (PI88) a varias temperaturas, de acuerdo con un aspecto.

La figura 20 muestra una cantidad de partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ (panel superior) y $\geq 25 \mu\text{m}$ (panel inferior) identificadas por microscopía de membrana en una formulación de 150 mg/mL de un anticuerpo anti-TL-4R que contiene una lipasa y PEG3350 o poloxámero 188 (a concentraciones de 0,02%, 0,04% o 0,1% p/v) y almacenadas a 5 °C durante hasta 36 meses, de acuerdo con un aspecto.

La figura 21A muestra un impacto de las concentraciones de PEG3350 en la estabilidad (como un porcentaje de especies de HMW medidas por SE-UPLC) de una formulación de 150 mg/mL de un anticuerpo anti-IL-4R contra el estrés de agitación a temperatura ambiente durante un período de 30-120 minutos.

La figura 21B muestra un impacto de las concentraciones de poloxámero 188 en la estabilidad (como un porcentaje de especies de HMW medidas por SE-UPLC) de una formulación de 150 mg/mL de un anticuerpo anti-IL-4R contra el estrés de agitación a temperatura ambiente durante un período de 30-120 minutos.

La figura 22 muestra un impacto de polisorbato 20, polisorbato 80, PEG3350 y poloxámero 188 (a concentraciones variables) en la estabilidad (como un porcentaje de especies de HMW medidas por SE-UPLC) de una formulación de 150 mg/mL de un anticuerpo anti-IL-4R contra estrés térmico (45 °C) durante un período de hasta 56 días.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las macromoléculas terapéuticas se deben formular de una manera que no solo haga que las moléculas sean adecuadas para la administración a pacientes, sino que también mantenga su estabilidad durante el almacenamiento. Por ejemplo, los anticuerpos terapéuticos en solución líquida son propensos a la degradación, agregación y/o modificaciones químicas no deseadas a menos que la solución se formule adecuadamente. La estabilidad de un anticuerpo en la formulación líquida depende no solo de los tipos de excipientes utilizados en la formulación, sino también de las cantidades y proporciones de los excipientes entre sí. Las formulaciones terapéuticas también pueden estar sujetas a la formación de materia particulada a lo largo del tiempo durante el almacenamiento. Las partículas pueden ser visibles o subvisibles; las partículas subvisibles típicamente tienen menos de 150 micrones o 100 micrones de diámetro. Las formulaciones que tienen altas concentraciones de proteína, *por ejemplo*, concentraciones de 30 mg/mL o más, son más propensas a la agregación y la formación de partículas subvisibles.

El polisorbato 20 (PS20) y el polisorbato 80 (PS80) son los tensioactivos no iónicos más comúnmente utilizados en formulaciones de proteínas biofarmacéuticas para mejorar la estabilidad de las proteínas y proteger los productos proteicos de la agregación y desnaturalización (Martos *et al.*, *J Pharm Sci.* 106(7): 1722-1735 (2017); Kiese *et al.*, *J Pharm Sci* 97(19):4347-4366 (2008); Dwivedi *et al.*, *Int J Pharm* 552(1-2):422-436 (2018)). Sin embargo, se ha informado que los polisorbatos, que incluyen polisorbato 20 y polisorbato 80, se pueden degradar en presencia de lipasa, lo que con el tiempo da como resultado la formación de partículas subvisibles en una formulación.

Se sabe que los PS están propensos a la degradación a través de dos vías principales: la autooxidación y la hidrólisis (Dwivedi *et al.*, Kishore *et al.*, *Pharm Res.* 28(5): 1194-1210 (2011); Larson *et al.*, *J Pharm Sci.* 109(10):63 3-63 9 (2020); Kishore *et al.* *J Pharm Sci.* 100(2)721-731 (2011)). La hidrólisis enzimática se considera la ruta principal de degradación de PS en formulaciones de proteínas de alta concentración, lo que resulta en la acumulación de ácidos grasos libres (FFA) que pueden impulsar la formación de partículas indeseables en los productos farmacéuticos. La oxidación es la segunda vía primaria para la degradación de PS, que conduce a la formación de peróxidos, aldehídos, cetonas y especies de sorbitán/isosórbido POE esterificadas de cadena corta (Kishore *et al.* 2011a; Larson *et al.*; Kishore *et al.* 2011b; Donbrow *et al.*, *J Pharm Sci.* 67(12):1676-1681 (1978); Yao *et al. Res. Pharm.* 26(10):2303-2313 (2009)). La hidrólisis de PS se ha

reconocido como una mayor amenaza para la calidad del producto farmacéutico porque este proceso no solo reduce la concentración de PS, sino que también se asocia con la formación de partículas debido a la baja solubilidad de los FFA acumulados, especialmente a temperaturas de almacenamiento de 2° C-8° C (Doshi *et al.*, *J Pharm Sci.* 110(2):687-692 (2021); Saggu *et al.*, *J Pharm Set.* 110(3): 1093-1102 (2021); Doshi *et al.* *Mol Pharm.* 12(11):3792-3804 (2015)).

Las lipasas residuales o esterasa presentes en el producto de fármaco son la causa principal de la hidrólisis de PS (Chiu *et al.*, *Biotechnol Bioeng.* 114(5): 1006-1015 (2017); Hall *et al.* *J Pharm Sci.* 105(5): 1633-1642 (2016); Labrenz *et al.* *J Pharm Sci.* 103(8):2268-2277 (2014); McShan *et al.* *PDA J Pharm Sci Technol.* 70(4):332-345 (2016); Zhang *et al.* *J Pharm Sci.* 109(11):3300-3307 (2020); Zhang *et al.* *J Pharm Sci.* 109(9):2710-2718 (2020)). Los niveles de lipasas residuales en el producto farmacéutico final suelen ser muy bajos (< 10 ppm) después de múltiples pasos de purificación corriente abajo, y las consecuencias de la degradación de PS pueden no ser notables hasta después del almacenamiento durante meses o años a temperaturas de almacenamiento típicas (2 °C-8 °C).

Sin pretender limitarse por la teoría, se cree que una supuesta fosfolipasa B tipo 2 (PLBL2), que está altamente conservada en hámster, rata, ratones, humanos y bovinos, se copurifica con algunas clases de proteínas bajo ciertos procesos. Otras esterasas o lipasas también pueden copurificar con proteínas de interés a concentraciones demasiado bajas para ser detectadas de manera confiable, pero lo suficientemente altas como para tener actividad de lipasa medible, lo que eventualmente da como resultado una pérdida de polisorbato, producción de ácidos grasos libres y la formación de partículas visibles o subvisibles. Por lo tanto, existe la necesidad de productos de fármaco con actividad de lipasa reducida, actividad de esterasa reducida y formación reducida de partículas de ácidos grasos, y de métodos para fabricar los mismos.

En la presente se divulgan nuevos productos de fármaco, composiciones y formulaciones con actividad de lipasa reducida, actividad de esterasa reducida y formación reducida de partículas de ácidos grasos, y métodos para fabricar los mismos. Los inventores han descubierto sorprendentemente que se puede agregar un paso de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) a un proceso de producción para una proteína de interés para eliminar eficazmente la actividad esterasa y lipasa y prevenir la formación de partículas en los productos farmacéuticos. Además, se han descubierto condiciones

optimizadas para un paso de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) para reducir eficazmente la actividad de esterasa y lipasa al mejorar las condiciones de carga de pH convencionales. Los inventores han descubierto adicionalmente que el contenido de polisorbato, específicamente polisorbato 80, se puede optimizar con una alta concentración de ácido oleico, de modo que se forman menos partículas de ácidos grasos incluso en el producto de fármaco que contiene actividad de esterasa o lipasa. También se investigaron tensioactivos alternativos al polisorbato, y se descubrió sorprendentemente que PEG3350 y poloxámero 188 pueden estabilizar con éxito una proteína en tanto que son resistentes a la actividad de esterasa o lipasa, evitando así la formación de partículas de ácidos grasos. Después de la producción de una sustancia de fármaco, se descubrió además sorprendentemente que las esterases o lipasas copurificadas se pueden inactivar y/o eliminar con éxito mediante la aplicación de estrés, por ejemplo, estrés de agitación o estrés de calor, lo que puede hacer que las esterases o lipasas se degraden, lo que reduce la actividad de la lipasa. La aplicación de estrés también puede conducir a la formación de especies de alto peso molecular (HMW). La especie de HMW se puede retirar de la sustancia de fármaco usando, por ejemplo, filtración o cromatografía de peso molecular, tal como cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de exclusión por tamaño. Estos y otros aspectos de la invención se establecen en detalle adicional más adelante.

A menos que se describa lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque cualquier método y material similar o equivalente a los descritos en la presente se puede usar en la práctica o prueba, ahora se describen métodos y materiales particulares.

Se debe entender que el término “un” significa “al menos uno” y se debe entender que los términos “alrededor de” y “aproximadamente” permiten la variación estándar como se entendería por aquellos expertos en la técnica, y donde se proporcionan intervalos, se incluyen puntos finales. Como se usa en la presente, los términos "incluyen", "incluye" y "que incluye" pretenden ser no taxativos y se entiende que significan "comprenden", "comprende" y "que comprende", respectivamente.

Como se usa en la presente, el término “proteína” o “proteína de interés” puede incluir cualquier polímero de aminoácidos que tenga enlaces amida unidos covalentemente. Las proteínas comprenden una o más cadenas poliméricas de aminoácidos, generalmente conocidas en la técnica como "polipéptidos". “Polipéptido” se refiere a un polímero

compuesto por residuos de aminoácidos, variantes estructurales de origen natural relacionadas y análogos sintéticos de origen no natural de estos enlazados a través de enlaces peptídicos. “Péptido o polipéptido sintético” se refiere a un péptido o polipéptido de origen no natural. Los péptidos o polipéptidos sintéticos se pueden sintetizar, por ejemplo, usando un sintetizador de polipéptidos automatizado. Varios métodos de síntesis de péptidos en fase sólida son conocidos por aquellos expertos en la técnica. Una proteína puede comprender uno o múltiples polipéptidos para formar una única biomolécula funcional. En otro aspecto de ejemplo, una proteína puede incluir fragmentos de anticuerpos, nanocuerpos, quimeras de anticuerpos recombinantes, citocinas, quimiocinas, hormonas peptídicas y similares. Las proteínas de interés pueden incluir cualquiera de las proteínas bioterapéuticas, proteínas recombinantes utilizadas en investigación o terapia, proteínas trap y otras proteínas de fusión de receptor Fc quimérico, proteínas quiméricas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, anticuerpos biespecíficos y proteínas de unión al antígeno.

Las proteínas se pueden producir usando sistemas de producción basados en células recombinantes, tal como el sistema de baculovirus en insectos, sistemas de levadura (*por ejemplo*, *Pichia* sp.) y sistemas de mamífero (*por ejemplo*, células CHO y derivados de CHO como células CHO-K1). Para una revisión reciente que analiza las proteínas bioterapéuticas y su producción, ver Ghaderi *et al.*, “Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation” (Darius Ghaderi *et al.*, Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation, 28 BIOTECHNOLOGY AND GENETIC ENGINEERING REVIEWS 147–176 (2012), cuyas enseñanzas completas se incorporan en la presente como referencia). En algunos aspectos, las proteínas comprenden modificaciones, aductos y otras porciones enlazados covalentemente. Estas modificaciones, aductos y porciones incluyen, por ejemplo, avidina, estreptavidina, biotina, glicanos (*por ejemplo*, N-acetilgalactosamina, galactosa, ácido neuramínico, N-acetilglucosamina, fucosa, manosa y otros monosacáridos), PEG, polihistidina, FLAGtag, proteína de unión a maltosa (MBP), proteína de unión a quitina (CBP), glutatión-S-transferasa (GST), myc-epítipo, marcadores fluorescentes y otros colorantes y similares. Las proteínas se pueden clasificar en función de las composiciones y la solubilidad y, por lo tanto, pueden incluir proteínas simples, tal como proteínas globulares y proteínas fibrosas; proteínas conjugadas, tal como nucleoproteínas, glicoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, fosfoproteínas, metaloproteínas y lipoproteínas; y proteínas derivadas, tal

como proteínas derivadas primarias y proteínas derivadas secundarias.

Como se usa en la presente, el término “proteína recombinante” se refiere a una proteína producida como resultado de la transcripción y traducción de un gen transportado en un vector de expresión recombinante que se ha introducido en una célula hospedera adecuada. En determinados aspectos, la proteína recombinante puede ser un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo quimérico, humanizado o completamente humano. En determinados aspectos, la proteína recombinante puede ser un anticuerpo de un isotipo seleccionado del grupo que consiste en: IgG, IgM, IgA1, IgA2, IgD o IgE. En determinados aspectos, la molécula de anticuerpo es un anticuerpo de longitud completa (*por ejemplo*, una IgG1) o, de manera alternativa, el anticuerpo puede ser un fragmento (*por ejemplo*, un fragmento Fc o un fragmento Fab).

Anticuerpos

El término "anticuerpo", como se usa en la presente, generalmente pretende referirse a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como multímeros de estas (*por ejemplo*, TgM); sin embargo, las moléculas de inmunoglobulina que consisten solo en cadenas pesadas (*es decir*, que carecen de cadenas ligeras) también están abarcadas dentro de la definición del término "anticuerpo". Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (CL1). Las regiones VH y VL se pueden subdividir adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino-terminal hasta el extremo carboxi-terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

En algunos aspectos, la proteína de interés es un anticuerpo humano. El término “anticuerpo humano”, como se usa en la presente, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la divulgación pueden incluir residuos de

aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (*por ejemplo*, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), *por ejemplo*, en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en la presente, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, se han injertado en secuencias marco humanas.

La interleucina-4 (IL-4) y la interleucina-13 (IL-13) son citocinas clave en la conducción de procesos inflamatorios alérgicos y de células T auxiliares de tipo 2 (Th2) polarizadas. La señalización de IL-4 e IL-13 está mediada a través de complejos de receptores heterodiméricos, en los que el receptor de IL-4 alfa (IL-4R α) es una subunidad de receptor compartida para la señalización de IL-4 e IL-13. Por lo tanto, IL-4R α es una diana terapéutica atractiva porque proporciona una única diana para bloquear la señalización de IL-4 e IL-13. En algunos aspectos, la proteína de interés es un anticuerpo anti-IL-4R, o un fragmento de unión al antígeno del mismo. Los anticuerpos contra hIL-4R α se describen, *por ejemplo*, en la solicitud de patente de los Estados Unidos Núms. 5.717.072, 7.186.809 y 7.605.237.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R es un anticuerpo IgG humano. En varios aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R es un anticuerpo humano de isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, o isotipo mixto. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R es un anticuerpo IgG1 humano. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R es un anticuerpo IgG4 humano. En cualquiera de los aspectos analizados anteriormente o en la presente, el anticuerpo anti-IL-4R puede comprender una cadena ligera kappa humana. En cualquiera de los aspectos analizados anteriormente o en la presente, el anticuerpo anti-IL-4R puede comprender una cadena ligera lambda humana.

Los anticuerpos de la divulgación pueden, en algunos aspectos, ser anticuerpos humanos recombinantes. El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa en la presente, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tal como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula hospedera, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatorios recombinantes, anticuerpos aislados de un animal (*por ejemplo*, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase, *por ejemplo*, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro

medio que implique el empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Estos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En ciertos aspectos, sin embargo, estos anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y, por lo tanto, las secuencias de aminoácidos de las regiones Vh y Vl de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien derivan de y están relacionadas con las secuencias Vh y Vl de la línea germinal humana, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

El término “anticuerpo”, como se usa en la presente, también incluye fragmentos de unión a antígeno de moléculas de anticuerpo completas. Los términos "porción de unión a antígeno" de un anticuerpo, "fragmento de unión a antígeno" de un anticuerpo y similares, como se usan en la presente, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína de origen natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado genéticamente que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión a antígeno de un anticuerpo se pueden derivar, por ejemplo, de moléculas de anticuerpo completas usando cualquier técnica estándar adecuada tal como digestión proteolítica o técnicas de ingeniería genética recombinante que implican la manipulación y expresión de ADN que codifica dominios variables y opcionalmente constantes de anticuerpo. Este ADN se conoce y/o está fácilmente disponible de, por ejemplo, fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (que incluyen, *por ejemplo*, bibliotecas de fago-anticuerpo), o se puede sintetizar. El ADN se puede secuenciar y manipular químicamente o mediante el uso de técnicas de biología molecular, por ejemplo, para organizar uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, agregar o eliminar aminoácidos, etc.

Como se usa en la presente, un “fragmento de anticuerpo” incluye una porción de un anticuerpo intacto, tal como, por ejemplo, la región variable o de unión a antígeno de un anticuerpo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un fragmento scFv, un fragmento Fv, un diacuerpo dsFv, un fragmento dAb, un fragmento Fd', un fragmento Fd y una región determinante de complementariedad (CDR) aislada, así como triacuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo monocatenario y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos Fv son la

combinación de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulina, y las proteínas ScFv son moléculas polipeptídicas monocatenarias recombinantes en las que las regiones variables de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina están conectadas por un enlazador peptídico. En algunos aspectos, un fragmento de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos suficiente del anticuerpo original del cual es un fragmento que se une al mismo antígeno que el anticuerpo original; en algunos aspectos, un fragmento se une al antígeno con una afinidad comparable a la del anticuerpo original y/o compite con el anticuerpo original por la unión al antígeno. Un fragmento de anticuerpo se puede producir por cualquier medio. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo se puede producir enzimática o químicamente mediante fragmentación de un anticuerpo intacto y/o se puede producir de forma recombinante a partir de un gen que codifica la secuencia de anticuerpo parcial. De manera alternativa o adicional, un fragmento de anticuerpo se puede producir total o parcialmente de manera sintética. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un fragmento de anticuerpo monocatenario. Alternativa o adicionalmente, un fragmento de anticuerpo puede comprender múltiples cadenas que están enlazadas entre sí, por ejemplo, por enlaces disulfuro. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un complejo multimolecular. Un fragmento de anticuerpo funcional típicamente comprende al menos aproximadamente 50 aminoácidos y más típicamente comprende al menos aproximadamente 200 aminoácidos.

El término “anticuerpo biespecífico” incluye un anticuerpo capaz de unirse selectivamente a dos o más epítopos. Los anticuerpos biespecíficos generalmente comprenden dos cadenas pesadas diferentes, donde cada cadena pesada se une específicamente a un epítipo diferente, ya sea en dos moléculas diferentes (*por ejemplo*, antígenos) o en la misma molécula (*por ejemplo*, en el mismo antígeno). Si un anticuerpo biespecífico es capaz de unirse selectivamente a dos epítopos diferentes (un primer epítipo y un segundo epítipo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítipo generalmente será al menos de uno a dos o tres o cuatro órdenes de magnitud más baja que la afinidad de la primera cadena pesada por el segundo epítipo, y viceversa. Los epítopos reconocidos por el anticuerpo biespecífico pueden estar en la misma o diferente diana (*por ejemplo*, en la misma o diferente proteína). Se pueden producir anticuerpos biespecíficos, por ejemplo, al combinar cadenas pesadas que reconocen diferentes epítopos del mismo antígeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias variables de cadena pesada que reconocen diferentes epítopos del mismo antígeno se pueden fusionar a secuencias de ácido nucleico que codifican diferentes

regiones constantes de cadena pesada y estas secuencias se pueden expresar en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina.

Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas, cada una con tres CDR de cadena pesada, seguido de un dominio CHI, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que no confiere especificidad de unión a antígeno pero que puede asociarse con cada cadena pesada, o que puede asociarse con cada cadena pesada y que puede unirse a uno o más de los epítopos unidos por las regiones de unión a antígeno de cadena pesada, o que puede asociarse con cada cadena pesada y permitir la unión de una o ambas cadenas pesadas a uno o ambos epítopos. Los BsAb se pueden dividir en dos clases principales, aquellos que tienen una región Fc (similar a IgG) y aquellos que carecen de una región Fc, esta última normalmente es más pequeña que la IgG y las moléculas biespecíficas similares a IgG que comprenden un Fc. Los bsAb similares a IgG pueden tener diferentes formatos tales como, pero no se limitan a, triomab, perillas en ojales IgG (kih IgG), crossMab, ort-Fab IgG, dominios variables duales Ig (DVD-Ig), Fab dos en uno o de doble acción (DAF), Fv de cadena única de IgG (IgG-scFv) o cuerpos $\kappa\lambda$. Los diferentes formatos no similares a IgG incluyen scFv en tándem, formato de diacuerpo, diacuerpo monocatenario, diacuerpos en tándem (TandAbs), molécula de redireccionamiento de doble afinidad (DART), DART-Fc, nanocuerpos o anticuerpos producidos por el método de acoplamiento y bloqueo (DNL) (Gaowei Fan, Zujian Wang & Mingju Hao, Bispecific Antibodies and their Applications, 8 JOURNAL OF HEMATOLOGY & ONCOLOGY 130; Dafne Muller & Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, HANDBOOK OF THERAPEUTIC Antibodies 265-310 (2014), cuyas enseñanzas completas se incorporan en la presente). Los métodos para producir bsAb no se limitan a la tecnología de quadroma basada en la fusión somática de dos líneas celulares de hibridoma diferentes, conjugación química, que implica reticulantes químicos, y enfoques genéticos que utilizan tecnología de ADN recombinante.

Como se usa en la presente, “anticuerpo multiespecífico” se refiere a un anticuerpo con especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. En tanto que estas moléculas normalmente solo se unirán a dos antígenos (*es decir*, anticuerpos biespecíficos, bsAb), los anticuerpos con especificidades adicionales tal como anticuerpo triespecífico y KIH triespecífico también se pueden abordar mediante el sistema y el método divulgados en la presente.

El término “anticuerpo monoclonal”, como se usa en la presente, no se limita a

anticuerpos producidos a través de tecnología de hibridoma. Un anticuerpo monoclonal se puede derivar de un único clon, que incluye cualquier clon eucariota, procariota o de fago, mediante cualquier medio disponible o conocido en la técnica. Los anticuerpos monoclonales útiles con la presente divulgación se pueden preparar usando una amplia variedad de técnicas conocidas en la técnica que incluyen el uso de tecnologías de hibridoma, recombinantes y de presentación en fagos, o una combinación de las mismas.

Un "anticuerpo aislado", como se usa en la presente, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (*por ejemplo*, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-4R α está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de hIL-4R α).

El término "se une específicamente", o similar, significa que un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se puede caracterizar por una constante de disociación de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M o mayor. Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmón superficial y similares. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hIL-4R α puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tal como moléculas hIL-4R α de otras especies (ortólogos). En el contexto de la presente divulgación, se considera que los anticuerpos *multiespecíficos* (*por ejemplo*, biespecíficos) que se unen a hIL-4R α , así como uno o más antígenos adicionales, se "unen específicamente" a hIL-4R α . Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos. Sin embargo, en algunos casos, el anticuerpo aislado se puede copurificar con una fosfolipasa expresada por una línea celular de mamífero (*por ejemplo*, células CHO) a partir de la cual se produce el anticuerpo anti-IL-4R.

De acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación, el anticuerpo anti-hIL-4R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1-HCDR2-HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-4-5. De acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación, el anticuerpo anti-hIL-4R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende las regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera LCDR1- LCDR2-LCDR3, respectivamente, que

comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 6-7-8. En determinados aspectos, el anticuerpo anti-hIL-4R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende las CDR HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO:3-4-5-6-7-8.

En determinados aspectos, el anticuerpo anti-hIL-4R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1-HCDR2-HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-4-5 y tiene una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (*por ejemplo*, al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia) con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1. En determinados aspectos, el anticuerpo anti-hIL-4R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6-7-8 y tiene una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (*por ejemplo*, al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia) con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En determinados aspectos, el anticuerpo anti-hIL-4R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende: regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1-HCDR2-HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 3-4-5 y tiene una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (*por ejemplo*, al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia) con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1; y regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 6-7-8 y tiene una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene al menos 90% de identidad de secuencia (*por ejemplo*, al menos 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad de secuencia) con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

En determinados aspectos, el anticuerpo anti-hIL-4R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En determinados aspectos, el anticuerpo anti-hIL-4R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO: 2. En determinados aspectos, el anticuerpo anti-hIL-4R, o fragmento de unión a antígeno del mismo, comprende un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1/2. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R comprende una HCVR/LCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1/2, respectivamente, y una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R comprende una HCVR/LCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1/2, respectivamente, y una región constante de cadena pesada de IgG4 humana. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-TL-4R comprende una HCVR/LCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1/2, respectivamente, y una región constante de cadena pesada de IgG humana. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R comprende una HCVR/LCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1/2, respectivamente, y una región constante de cadena pesada de IgG1 o IgG4 humana. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R es dupilumab.

Otros anticuerpos anti-IL-4R que se pueden utilizar en el contexto de los métodos de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, el anticuerpo denominado y conocido en la técnica como AMG317 (Corren et al., 2010, Am J Respir Crit Care Med., 181(8):788-796), o Med 9314, o cualquiera de los anticuerpos anti-IL-4R α como se establece en la Patente de Estados Unidos Núm. 7.186.809, Patente de Estados Unidos Núm. 7.605.237, Patente de Estados Unidos Núm. 7.638.606, Patente de Estados Unidos Núm. 8.092.804, Patente de Estados Unidos Núm. 8.679.487, Patente de Estados Unidos Núm. 8.877.189, Patente de Estados Unidos Núm. 10.774.141; Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos Núm. US2021/023 8294; o Publicaciones de Patente Internacional Núms. WO2019/228405, WO2020/096381, WO 2020/135471, WO2020/135710 o WO 2020/239134, cuyo contenido se incorpora como referencia en la presente.

En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R comprende una o más secuencias CDR, HCVR y/o LCVR expuestas en la Tabla 1 más adelante.

La cantidad de anticuerpo, o fragmento de unión a antígeno del mismo, contenido dentro de las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación puede variar dependiendo de las propiedades específicas deseadas de las formulaciones, así como de

las circunstancias y propósitos particulares para los que se pretenden utilizar las formulaciones. En determinados aspectos, las formulaciones farmacéuticas pueden contener aproximadamente 1 mg/mL a aproximadamente 500 mg/mL de anticuerpo; aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 250 mg/mL de anticuerpo; aproximadamente 5 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL de anticuerpo; aproximadamente 15 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL de anticuerpo; aproximadamente 25 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL de anticuerpo; aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL de anticuerpo; aproximadamente 100 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL de anticuerpo; aproximadamente 125 mg/mL a aproximadamente 175 mg/mL de anticuerpo; o aproximadamente 150 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL de anticuerpo. Por ejemplo, las formulaciones de la presente divulgación pueden ser formulaciones líquidas que comprenden aproximadamente 1 mg/mL; aproximadamente 2 mg/mL; aproximadamente 5 mg/mL; aproximadamente 10 mg/mL; aproximadamente 15 mg/mL; aproximadamente 20 mg/mL; aproximadamente 25 mg/mL; aproximadamente 30 mg/mL; aproximadamente 35 mg/mL; aproximadamente 40 mg/mL; aproximadamente 45 mg/mL; aproximadamente 50 mg/mL; aproximadamente 55 mg/mL; aproximadamente 60 mg/mL; aproximadamente 65 mg/mL; aproximadamente 70 mg/mL; aproximadamente 75 mg/mL; aproximadamente 80 mg/mL; aproximadamente 85 mg/mL; aproximadamente 90 mg/mL; aproximadamente 95 mg/mL; aproximadamente 100 mg/mL; aproximadamente 105 mg/mL; aproximadamente 110 mg/mL; aproximadamente 115 mg/mL; aproximadamente 120 mg/mL; aproximadamente 125 mg/mL; aproximadamente 130 mg/mL; aproximadamente 135 mg/mL; aproximadamente 140 mg/mL; aproximadamente 145 mg/mL; aproximadamente 150 mg/mL; aproximadamente 155 mg/mL; aproximadamente 160 mg/mL; aproximadamente 165 mg/mL; aproximadamente 170 mg/mL; aproximadamente 175 mg/mL; aproximadamente 180 mg/mL; aproximadamente 185 mg/mL; 190 mg/mL; aproximadamente 195 mg/mL; o aproximadamente 200 mg/mL de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-4R α . En determinados aspectos, las formulaciones farmacéuticas son formulaciones líquidas que pueden contener $5 \pm 0,5$ mg/mL a 200 ± 20 mg/mL de anticuerpo; $15 \pm 1,5$ mg/mL a 200 ± 20 mg/mL de anticuerpo; $25 \pm 2,5$ mg/mL a 200 ± 20 mg/mL de anticuerpo; 50 ± 5 mg/mL a 200 ± 20 mg/mL de anticuerpo; 100 ± 10 mg/mL a 200 ± 20 mg/mL de anticuerpo; 150 ± 10 mg/mL de anticuerpo; o 175 ± 10 mg/mL. En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas contienen de 140 ± 5 mg/mL a 160 ± 5 mg/mL del anticuerpo anti-IL-4R. En algunos casos, las formulaciones farmacéuticas contienen $165 \text{ mg/mL} \pm 5 \text{ mg/mL}$ a 185

mg/mL $\pm$ 5 mg/mL del anticuerpo anti-IL-4R. En algunos casos, las formulaciones farmacéuticas contienen 150 mg/mL $\pm$ 5 mg/mL del anticuerpo anti-IL-4R. En algunos casos, las formulaciones farmacéuticas contienen 175 mg/mL $\pm$ 5 mg/mL del anticuerpo anti-IL-4R.

La presente descripción abarca anticuerpos que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de las moléculas de ejemplo divulgadas en la presente pero que retienen la capacidad de unirse al antígeno cognado, por ejemplo, hIL-4R. Estas moléculas variantes pueden comprender una o más adiciones, delecciones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia original, pero exhiben una actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos analizados en la presente.

La presente divulgación incluye moléculas de unión a antígeno que son bioequivalentes a cualquiera de los anticuerpos de ejemplo establecidos en la presente. En algunos aspectos, la molécula de unión a antígeno es un bioequivalente de dupilumab. Dos anticuerpos se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya velocidad y extensión de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, ya sea dosis única o dosis múltiple. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el alcance de su absorción pero no en su velocidad de absorción y, sin embargo, se pueden considerar bioequivalentes porque estas diferencias en la velocidad de absorción son intencionales y se reflejan en el etiquetado, no son esenciales para el logro de concentraciones corporales efectivas de fármacos en, *por ejemplo*, el uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el producto de fármaco particular estudiado.

En un aspecto, dos anticuerpos son bioequivalentes si no hay diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza y potencia. En un aspecto, dos anticuerpos son bioequivalentes si un paciente se puede cambiar una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluido un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o eficacia disminuida, en comparación con la terapia continua sin este cambio.

La bioequivalencia se puede demostrar mediante métodos *in vivo* e *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) una prueba *in vivo* en humanos u otros mamíferos, en la que la concentración del anticuerpo o sus metabolitos se mide en sangre, plasma, suero u otro fluido biológico en función del tiempo; (b) una prueba *in vitro*

que se ha correlacionado y es razonablemente predictiva de los datos de biodisponibilidad *in vivo en humanos*; (c) una prueba *in vivo* en humanos u otros mamíferos en la que el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su diana) se mide en función del tiempo; y (d) un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia o biodisponibilidad o bioequivalencia de una proteína de unión a antígeno.

Formulaciones farmacéuticas

Como se usa en la presente, una “muestra” se puede obtener de cualquier paso de un bioproceso, tal como fluido de cultivo celular (CCF), fluido de cultivo celular cosechado (HCCF), cualquier paso en el procesamiento corriente abajo, sustancia de fármaco (DS) o un producto de fármaco (DP) que comprende el producto formulado final.

Los términos “composición”, “formulación” y “sustancia de fármaco formulada” (FDS) como se usan en la presente divulgación se refieren a una combinación de dos o más ingredientes farmacéuticos para su inclusión en un producto de fármaco. Una composición, formulación o FDS puede ser, por ejemplo, una composición líquida que incluye un ingrediente farmacéutico activo, tal como un anticuerpo, y un excipiente, tal como un estabilizador o tensioactivo. Una composición, formulación o FDS puede incluir múltiples excipientes. Una composición, formulación o FDS también puede incluir otros constituyentes, tal como proteínas de células hospederas copurificadas con una proteína de interés.

El término “producto de fármaco” (DP, por sus siglas en inglés) como se usa en la presente divulgación se refiere a una forma de dosificación que comprende una cantidad de un FDS para empaque, envío o administración. Por ejemplo, un producto de fármaco puede ser una jeringa precargada que contiene un volumen de FDS para administración a un paciente.

Como se usa en la presente, un “producto de fármaco de proteína”, “producto biofarmacéutico”, “formulación farmacéutica”, “composición farmacéutica” o “bioterapéutico” incluye un ingrediente activo que puede ser de origen total o parcialmente biológica. En un aspecto, el producto farmacéutico de proteína puede comprender un péptido, una proteína, una proteína de fusión, un anticuerpo, un antígeno, una vacuna, un conjugado de péptido-fármaco, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un conjugado de proteína-fármaco, células, tejidos o combinaciones de los mismos. En otro aspecto, el producto farmacéutico de proteína puede comprender una versión recombinante,

modificada, mutada o truncada de un péptido, una proteína, una proteína de fusión, un anticuerpo, un antígeno, una vacuna, un conjugado de péptido-fármaco, un conjugado de anticuerpo-fármaco, un conjugado de proteína-fármaco, células, tejidos o combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención comprenden: (i) un anticuerpo humano que se une específicamente a hIL-4R α ; (ii) uno o más amortiguadores; (iii) un estabilizador térmico; (iv) un tensioactivo (*por ejemplo*, cosolvente orgánico); y (v) un modificador de viscosidad. Se pueden incluir componentes adicionales en las formulaciones de la presente divulgación si estos componentes no interfieren significativamente con la viscosidad y estabilidad de la formulación. Los componentes y formulaciones de ejemplo específicas incluidas dentro de la presente divulgación se describen en detalle más adelante.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden, en determinados aspectos, ser formulaciones fluidas. Como se usa en la presente, la expresión “formulación fluida” significa una mezcla de al menos dos componentes que existe predominantemente en el estado fluido a aproximadamente 2 °C a aproximadamente 45 °C. Las formulaciones fluidas incluyen, *entre otras*, formulaciones líquidas. Las formulaciones fluidas pueden ser de viscosidad baja, moderada o alta dependiendo de sus constituyentes particulares.

Proteínas de célula hospedera

Como se usa en la presente, el término “proteína de célula hospedera” (HCP) incluye proteína derivada de una célula hospedera en la producción de una proteína recombinante. La proteína de célula hospedera puede ser una impureza relacionada con el proceso que se puede derivar del proceso de fabricación y puede incluir tres categorías principales: derivada del sustrato celular, derivada del cultivo celular y derivada corriente abajo. Las impurezas derivadas del sustrato celular incluyen, pero no se limitan a, proteínas derivadas del organismo hospedero y ácido nucleico (ADN genómico, vector o total de célula hospedera). Las impurezas derivadas del cultivo celular incluyen, pero no se limitan a, inductores, antibióticos, suero y otros componentes de medios. Las impurezas derivadas corriente abajo incluyen, pero no se limitan a, enzimas, reactivos de procesamiento químico y bioquímico (*por ejemplo*, bromuro de cianógeno, guanidina, agentes oxidantes y reductores), sales inorgánicas (*por ejemplo*, metales pesados, arsénico, iones no metálicos), solventes, portadores, ligandos (*por ejemplo*, anticuerpos monoclonales) y otros

lixiviables.

Se puede considerar que la presencia de una proteína de célula hospedera en un producto bioterapéutico es un riesgo más alto o más bajo con base en una cantidad de factores medibles. Uno de estos factores es la concentración o abundancia (cantidad) de una impureza de HCP en un producto bioterapéutico. Una HCP puede no tener un impacto discernible a una abundancia lo suficientemente baja, como se mide, por ejemplo, mediante ELISA o espectrometría de masas. El nivel en el que una HCP puede presentar un riesgo considerable, que se puede considerar un nivel inaceptable en un producto y se puede monitorear como un atributo de calidad crítica (CQA), puede depender de la identidad específica del HCP. Se puede saber que las HCP particulares presentan un riesgo a un nivel particular, por ejemplo, dependiendo del nivel de actividad enzimática de una HCP que es una enzima.

De manera relacionada, la criticidad de la presencia de una HCP puede depender de la función de esa HCP, en particular en relación con los componentes del producto bioterapéutico. Por ejemplo, una esterasa o lipasa de HCP que puede o se sabe que degrada el polisorbato que está presente en el producto bioterapéutico de interés se puede monitorear de forma cercana y puede tener un umbral bajo para la cantidad de impureza de HCP que se puede permitir en el producto bioterapéutico. Otras HCP de preocupación particular pueden ser, por ejemplo, proteasas que pueden o se sabe que degradan una proteína de interés en el producto bioterapéutico, o HCP inmunogénicas que pueden o se sabe que causan una reacción inmune cuando se administran a un sujeto.

Cromatografía líquida

Como se usa en la presente, el término “cromatografía líquida” se refiere a un proceso en el que una mezcla biológica/química transportada por un líquido se puede separar en componentes como resultado de la distribución diferencial de los componentes a medida que fluyen a través de (o hacia) una fase líquida o sólida estacionaria. Los ejemplos no limitantes de cromatografía líquida incluyen cromatografía líquida de fase inversa, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de afinidad, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía de interacción hidrófila o cromatografía de modo mixto. Los analitos separados mediante cromatografía presentarán tiempos de retención distintivos, lo que refleja la velocidad a la que un analito se mueve a través de la columna cromatográfica. Los analitos se pueden comparar usando un cromatograma, que traza el tiempo de retención en un eje y la señal

medida en otro eje, donde la señal medida se puede producir a partir de, por ejemplo, detección UV o detección de fluorescencia. En algunos aspectos, una muestra que incluye al menos una esterasa o lipasa, por ejemplo, una sustancia de fármaco, se puede someter a estrés, por ejemplo, estrés de agitación o estrés de calor, y posteriormente se puede someter a un paso de cromatografía para eliminar cualquier especie de HMW.

En determinados aspectos, puede ser ventajoso someter una muestra biológica a cromatografía de afinidad para la producción de una proteína de interés. El material cromatográfico es capaz de unirse o interactuar selectiva o específicamente con la proteína de interés. Ejemplos no limitantes de este material cromatográfico incluyen Proteína A y Proteína G. También se incluye material cromatográfico que comprende, por ejemplo, una proteína o porción de la misma capaz de unirse o interactuar con la proteína de interés.

La cromatografía de afinidad puede implicar someter una muestra biológica a una columna que comprende una resina de proteína A adecuada. Cuando se usa en la presente, el término “Proteína A” abarca Proteína A recuperada de una fuente nativa de esta, Proteína A producida sintéticamente (por *ejemplo*, por síntesis de péptidos o por técnicas recombinantes) y variantes de esta que retienen la capacidad de unirse a proteínas que tienen una región C_{H2}/C_{H3} . En ciertos aspectos, la resina de proteína A es útil para la producción basada en afinidad y el aislamiento de una variedad de isotipos de anticuerpos al interactuar específicamente con la porción Fc de una molécula si posee esa región.

Hay varias fuentes comerciales para la resina de proteína A. Las resinas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, MabSelect PrismA, MabSelect SuRe™, MabSelect SuRe LX, MabSelect, MabSelect SuRe pcc, MabSelect Xtra, rProtein A Sepharose de Cytiva, ProSep HC, ProSep Ultra, ProSep Ultra Plus de EMD Millipore, MabCapture de ThermoFisher y Amsphere™ A3 de JSRLife Sciences.

Una columna de afinidad se puede equilibrar con un amortiguador adecuado antes de la carga de la muestra. Después de la carga de la columna, la columna se puede lavar una o varias veces usando un amortiguador de lavado adecuado. Luego, la columna se puede eluir usando un amortiguador de elución apropiado, por ejemplo, glicina-HCl, ácido acético o ácido cítrico. El eluato se puede monitorear usando técnicas conocidas por aquellos expertos en la técnica, tal como un detector UV. Las fracciones de interés eluidas se pueden recolectar y luego preparar para procesamiento adicional.

La cromatografía de intercambio catiónico (CEX) utiliza un material de cromatografía

de intercambio catiónico. La cromatografía de intercambio catiónico se puede subdividir adicionalmente en, por ejemplo, intercambio catiónico fuerte (SCX) o intercambio catiónico débil, dependiendo del material de cromatografía de intercambio catiónico empleado. Los materiales de cromatografía de intercambio catiónico con un grupo de ácido sulfónico (S) se pueden usar en intercambiadores de cationes fuertes, en tanto que los materiales de cromatografía de intercambio catiónico con un grupo carboximetilo (CM) se pueden usar en intercambiadores de cationes débiles. Los intercambiadores de cationes fuertes incluyen, por ejemplo, la FUENTE S, que utiliza un grupo funcional de sulfato de metilo, y SP Sepharose, que utiliza un grupo funcional de sulfopropilo. Los intercambiadores catiónicos débiles incluyen, por ejemplo, CM-Celulosa, que utiliza un grupo funcional de carboximetilo. Se puede preferir SCX porque se puede usar un intervalo más amplio de amortiguadores de pH sin perder la carga del intercambiador catiónico fuerte, lo que permite la separación efectiva de analitos con un amplio intervalo de pl.

Los materiales de cromatografía de intercambio catiónico están disponibles bajo diferentes nombres de una multitud de compañías tal como, por ejemplo, Bio-Rex, Macro-Prep CM (disponible de BioRad Laboratories, Hercules, Calif, EE. UU.), Intercambiador catiónico débil WCX 2 (disponible de Ciphergen, Fremont, Calif, EE. UU.), Dowex MAC-3 (disponible de Dow Chemical Company, Midland, Mich., EE. UU.), Mustang C (disponible de Pall Corporation, East Hills, N.Y., EE. UU.), Celulosa CM-23, CM- 32, CM-52, hyper-D y partisphere (disponible de Whatman plc, Brentford, Reino Unido), Amberlite IRC 76, IRC 747, IRC 748, GT 73 (disponible de Tosoh Bioscience GmbH, Stuttgart, Alemania), CM 1500, CM 3000 (disponible de BioChrom Labs, Terre Haute, Ind., EE. UU.) y CM-Sepharose Fast Flow (disponible en GE Healthcare, Life Sciences, Alemania). Además, las resinas de intercambio catiónico disponibles comercialmente incluyen además carboximetilcelulosa, Bakerbond ABX, sulfopropilo (SP) inmovilizado en agarosa (*por ejemplo*, SP-Sepharose Fast Flow o SP-Sepharose High Performance, disponible de GE Healthcare-Amersham Biosciences Europe GmbH, Friburgo, Alemania) y sulfonilo inmovilizado en agarosa (*por ejemplo*, S-Sepharose Fast Flow disponible de GE Healthcare, Life Sciences, Alemania).

Los materiales de cromatografía de intercambio catiónico incluyen materiales de cromatografía de modo mixto que realizan una combinación de tecnologías de intercambio iónico e interacción hidrófoba (*por ejemplo*, Capto Adhere, Capto MMC, MEP HyperCell, Eshmuno HCX, etc.), materiales de cromatografía de modo mixto que realizan una combinación de tecnologías de intercambio aniónico e intercambio catiónico (*por ejemplo*, hidroxapatita, hidroxapatita cerámica, etc.) y similares. En algunos aspectos, CEX se

puede usar para eliminar especies de HMW de una muestra, por ejemplo, para eliminar proteínas que se han agregado en especies de HMW después de agitación o estrés de calor.

En algunos aspectos, una muestra que comprende una proteína de interés se somete a al menos un paso de separación de intercambio aniónico (AEX). La cromatografía en lecho empaquetado de intercambio aniónico se basa en interacciones iónicas entre la entidad de unión (proteína diana o impureza) y el grupo funcional inmovilizado en los medios cromatográficos. El rendimiento puede ser una función de la fase móvil, el grupo funcional y la estructura principal de resina. El uso de un material de intercambio aniónico frente a un material de intercambio catiónico se basa, en parte, en las cargas locales de la proteína de interés. La cromatografía de intercambio aniónico se puede usar en combinación con otros procedimientos cromatográficos tales como cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrófoba, así como otros modos de cromatografía conocidos por el experto en la técnica.

En el contexto de separación cromatográfica, se utiliza una columna cromatográfica para alojar el material de soporte cromatográfico (resina o fase sólida). Una muestra que comprende una proteína de interés se carga en una columna cromatográfica particular. Luego, la columna se puede someter a uno o más pasos de lavado usando un amortiguador de lavado adecuado. Los componentes de una muestra que no se han adsorbido en la resina probablemente fluirán a través de la columna. Los componentes que se han adsorbido a la resina se pueden eluir diferencialmente usando un amortiguador de elución apropiado.

Un agente aniónico se puede seleccionar del grupo que consiste en acetato, cloruro, formiato y combinaciones de estos. Un agente catiónico se puede seleccionar del grupo que consiste en Tris, arginina, sodio y combinaciones de estos. Se puede seleccionar un amortiguador del grupo que consiste en piridina, piperazina, L-histidina, Bis-Tris, Bis-Tris propano, imidazol, N-etilmorfolina, TEA (trietanolamina), Tris, morfolina, N-metildietanolamina, AMPD (2-amino-2-metil-1,3-propanodiol), dietanolamina, etanolamina, AMP (2-amino-2-metil-1-propaol), piperazina, 1,3-diaminopropano y piperidina.

Una columna de cromatografía de intercambio aniónico empaquetada, un dispositivo de membrana de intercambio aniónico, un dispositivo monolítico de intercambio aniónico o medios de filtro de profundidad se pueden operar en modo de unión-elución, modo de flujo continuo o un modo híbrido en donde las proteínas exhiben unión al material cromatográfico

y aún se pueden lavar de este material usando un amortiguador que es igual o sustancialmente similar al amortiguador de carga.

En el modo de elución de unión, un dispositivo de columna o membrana se acondiciona primero con un amortiguador con fuerza iónica y pH apropiados en condiciones en las que ciertas proteínas se adsorberán a la matriz a base de resina. Por ejemplo, durante la carga de alimentación, una proteína de interés se puede adsorber a la resina debido a la atracción electrostática. Después de lavar la columna o el dispositivo de membrana con el amortiguador de equilibrio u otro amortiguador con un pH y/o conductividad diferentes, la recuperación del producto se logra al aumentar la fuerza iónica (*es decir*, conductividad) del amortiguador de elución para competir con el soluto por los sitios cargados de la matriz de intercambio aniónico. Cambiar el pH y, por lo tanto, alterar la carga del soluto es otra forma de lograr la elución del soluto. El cambio en la conductividad o el pH puede ser gradual (elución en gradiente) o escalonado (elución escalonada).

En el modo de flujo continuo, se opera un dispositivo de columna o membrana a un pH y conductividad seleccionados de modo que la proteína de interés no se una a la resina o la membrana, en tanto que la especie ácida se retendrá en la columna o tendrá un perfil de elución distinto en comparación con la proteína de interés. En el contexto de esta estrategia, las especies ácidas interactuarán con o se unirán al material cromatográfico en condiciones adecuadas, en tanto que la proteína de interés y ciertos agregados y/o fragmentos de la proteína de interés fluirán a través de la columna.

En algunos aspectos, un paso de AEX se realiza en modo negativo (modo de flujo continuo), donde las impurezas relacionadas con el proceso cargadas negativamente se adsorben al ligando inmovilizado cargado positivamente y la proteína de interés fluye a través.

En algunas modalidades, se puede seleccionar un pH de una muestra cargada en una columna AEX ("pH de carga") para reducir la actividad de esterasa o lipasa en la muestra. En algunos aspectos, un pH de carga de AEX puede ser de aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,1, aproximadamente 8,2, aproximadamente 8,3, entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 8,3, entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 8,0, entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 8,3, o entre aproximadamente 8,0 y aproximadamente 8,2.

Ejemplos no limitantes de resinas de intercambio aniónico incluyen grupos dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y amina cuaternaria (Q). Ejemplos no limitantes adicionales incluyen: Poros 50PI y Poros 50HQ, que son una perla polimérica rígida con una estructura principal que consiste en poli[estireno-divinilbenceno] reticulado; Poros 50XQ; Capto Q Impres y Capto DEAE, que son una perla de agarosa de alto flujo; Capto Adhere; Q Sepharose Fast Flow; Toyopearl QAE-550, Toyopearl DEAE-650 y Toyopearl GigaCap Q-650, que son una perla de base polimérica; Fractogel® EMD TMAE Hicap, que es una resina polimérica sintética con un intercambiador de iones de tentáculo; Sartobind STIC® PA nano, que es una membrana cromatográfica tolerante a la sal con un ligando de amina primaria; Sartobind Q nano, que es una membrana cromatográfica de intercambio de aniones fuertes; CUNO BioCap, que es un medio de filtro de profundidad zeta-plus construido a partir de ayudas de filtro inorgánico, celulosa refinada y una resina de intercambio de iones; XOHc, que es un medio de filtro de profundidad construido a partir de ayuda de filtro inorgánico, celulosa y ésteres de celulosa mixtos; y Unosphere Q. En algunos aspectos, se elige una resina con un tamaño de poro relativamente más grande, para aumentar el área superficial expuesta a especies cargadas negativamente.

Se pueden agregar aditivos tal como polietilenglicol (PEG), detergentes, aminoácidos, azúcares, agentes caotrópicos para mejorar el rendimiento de la separación para lograr una mejor separación, recuperación y/o calidad de producto.

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o filtración en gel se basa en la separación de componentes como una función de su tamaño molecular. La separación depende de la cantidad de tiempo que las sustancias pasan en la fase estacionaria porosa en comparación con el tiempo en el fluido. La probabilidad de que una molécula resida en un poro depende del tamaño de la molécula y el poro. Además, la capacidad de una sustancia para penetrar en los poros se determina por la movilidad de difusión de las macromoléculas, que es mayor para las macromoléculas pequeñas. Las macromoléculas muy grandes pueden no penetrar en los poros de la fase estacionaria en absoluto; y, para macromoléculas muy pequeñas, la probabilidad de penetración está cerca de la unidad. En tanto que los componentes de mayor tamaño molecular se mueven más rápidamente más allá de la fase estacionaria, los componentes de pequeño tamaño molecular tienen una longitud de ruta más larga a través de los poros de la fase estacionaria y, por lo tanto, se retienen más tiempo en la fase estacionaria.

Los analitos que se eluyen de una columna SEC se pueden separar en fracciones

en función del tiempo de elución. Por ejemplo, los analitos que se eluyen antes que la forma funcional de una proteína de interés, por ejemplo, la forma monomérica, se pueden clasificar ampliamente como especies de alto peso molecular (HMW). Una fracción de HMW se puede subdividir adicionalmente en, por ejemplo, una fracción de peso molecular muy alto (vHMW) y una fracción de dímero (que representa el tiempo de elución de un dímero de la proteína de interés). Los analitos que se eluyen más tarde que la forma funcional de una proteína de interés se puede clasificar ampliamente como especies de bajo peso molecular (LMW) y se pueden subdividir adicionalmente en una fracción de LMW y una fracción de cola posterior. De manera similar, los componentes de la muestra además de una proteína de interés, por ejemplo, una lipasa, pueden formar especies de mayor y menor peso molecular que se pueden separar usando SEC.

El material cromatográfico puede comprender un material de exclusión por tamaño en donde el material de exclusión por tamaño es una resina o membrana. La matriz utilizada para la exclusión por tamaño es preferentemente un medio de gel inerte que puede ser un compuesto de polisacáridos reticulados, por ejemplo, agarosa reticulada y/o dextrano en forma de perlas esféricas. El grado de reticulación determina el tamaño de los poros que están presentes en las perlas de gel hinchadas. Las moléculas mayores de un determinado tamaño no entran en las perlas de gel y, por lo tanto, se mueven a través del lecho cromatográfico más rápido. Las moléculas más pequeñas, tales como detergente, proteína, ADN y similares, que entran en las perlas de gel en una medida variable dependiendo de su tamaño y forma, se retrasan en su paso a través del lecho. Por lo tanto, las moléculas generalmente se eluyen en el orden de tamaño molecular decreciente. En algunos aspectos, SEC se puede usar para eliminar especies de HMW de una muestra, por ejemplo, para eliminar proteínas que se han agregado en especies de HMW después de agitación o estrés de calor.

El término "medio de interacción hidrófoba" significa una combinación de una estructura de soporte y una porción hidrófoba, en donde la porción hidrófoba se fija a la estructura de soporte. Los medios pueden estar en forma de medios de cromatografía, *por ejemplo*, perlas u otras partículas mantenidas en un formato de columna de lecho empaquetado, en forma de una membrana o en cualquier formato que pueda acomodar un líquido que comprende una proteína de interés y contaminantes. Por lo tanto, las estructuras de soporte incluyen perlas de agarosa (*por ejemplo*, sefarosa), perlas de sílice, membranas celulósicas, perlas celulósicas, perlas de polímero hidrófilo y similares. La porción hidrófoba es el componente activo del medio, que se une a moléculas hidrófobas y superficies

hidrófobas de proteínas. El grado de hidrofobicidad del medio se puede controlar mediante la selección de la porción hidrófoba. Por ejemplo, las siguientes porciones se pueden fijar al sustrato de medios para producir medios de interacción hidrófoba de hidrofobicidad creciente, es *decir*, de hidrofobicidad baja a hidrofobicidad alta: éter, butilo, octilo y fenilo. Los grupos alquilo pueden ser cadenas lineales o ramificadas. Para una revisión de la cromatografía de interacción hidrófoba y los medios, ver Kuczewski et al., "Development of a polishing step using a hydrophobic interaction membrane adsorber with a PER.C6®-derived recombinant antibody," Biotech. Bioeng. 105(2):296-305 (2010); Roettger y Ladisch, "Cromatografía de interacción hidrófoba", Biotechnol Adv. 7(1): 15-29 (1989); Shukla y Sanchayita, "Process for purifying proteins in a hydrophobic interaction chromatography flow-through fraction", patente de los Estados Unidos Núm. 7.427.659 B2, 23 de septiembre de 2008; y Muller y Franzreb, "Suitability of commercial hydrophobic interaction sorbents for temperature-controlled protein liquid chromatography under low salt conditions," J. Chroma. A 1260:88-96 (2012).

Los medios de interacción hidrófoba se emplean en un proceso conocido como cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) y se utilizan para separar proteínas de interés de contaminantes relacionados con el producto y el proceso. Cuando la proteína de interés se fabrica y/o purifica a partir de células hospedera, el producto y los contaminantes relacionados con el proceso se denominan proteínas de células hospederas (HCP). Las HCP de células de ovario de hámster chino (CHO, por sus siglas en inglés), una célula hospedera de fabricación bioterapéutica común, se pueden denominar CHOP (proteínas de ovario de hámster chino, por sus siglas en inglés). En algunos casos, una mezcla que contiene la proteína de interés (POI) y HCP se aplica al medio de HIC en un amortiguador diseñado para promover la unión de grupos hidrófobos en el POI a la porción hidrófoba del medio de HIC. La POI se adhiere al medio de HIC al unirse a la porción hidrófoba, y algunas HCP no se unen y salen en el amortiguador de lavado. La POI luego se eluye usando un amortiguador que promueve la disociación del POI de la porción hidrófoba de HIC, separando así la POI de las HCP no deseadas.

En algunos casos, la porción hidrófoba de HIC se une preferentemente a algunos contaminantes tal como HCP, y la POI se recoge del flujo a través de HIC. Esta divulgación establece ejemplos del uso de HIC en un modo de flujo continuo, en donde una población de HCP contaminantes, que incluye una actividad de esterasa, permanece unida al medio de interacción hidrófoba.

En algunos casos, la cromatografía de afinidad diseñada para unirse a proteínas específicas que tienen atributos lipófilos se puede emplear en lugar de o en concierto con HIC. Dado que algunas esterasas, tal como lipasas en general, o fosfolipasas en particular, se unen a triglicéridos o fosfolípidos, las moléculas que imitan esos lípidos se pueden usar para capturar esterasas. Por ejemplo, "factor de ribosilación de ADP miristoilado 1" (también conocido como "myrARFI") se puede usar para capturar una lipasa y permitir que la POI permanezca libre y fluya. Para preparar una columna de afinidad myrARFI, myrARFI se puede unir a Q-Sepharose mediante la activación de N-hidroxisuccinimida (ver Morgan et al., "Identification of phospholipase B from Dictyostelium discoideum reveals a new lipase family present in mammals, fly and nematodes, but not yeast," Biochem. J. 3 82: 441-449 (2004)).

Espectrometría de masas

Como se usa en la presente, el término "espectrómetro de masas" incluye un dispositivo capaz de identificar especies moleculares específicas y medir sus masas precisas. El término pretende incluir cualquier detector molecular en el que se pueda caracterizar un polipéptido o péptido. Un espectrómetro de masas puede incluir tres partes principales: la fuente de iones, el analizador de masas y el detector. El papel de la fuente de iones es crear iones en fase gaseosa. Los átomos, moléculas o agrupamientos de analitos se pueden transferir a la fase gaseosa e ionizar simultáneamente (como en la ionización por electropulverización) o a través de procesos separados. La elección de la fuente de iones depende de la aplicación.

En algunos aspectos, el espectrómetro de masas puede ser un espectrómetro de masas en tándem. Como se usa en la presente, el término "espectrometría de masas en tándem" incluye una técnica en la que se obtiene información estructural sobre moléculas de muestra mediante el uso de múltiples etapas de selección de masas y separación de masas. Un requisito previo es que las moléculas de muestra se transformen en una fase gaseosa y se ionicen para que los fragmentos se formen de manera predecible y controlable después del primer paso de selección de masa. La MS/MS, o MS², se puede realizar seleccionando y aislando primero un ion precursor (MS¹) y fragmentándolo para obtener información significativa. La MS en tándem se ha realizado con éxito con una amplia variedad de combinaciones de analizadores. Los analizadores que se combinan para una determinada aplicación se pueden determinar por varios factores diferentes, tal como sensibilidad, selectividad y velocidad, pero también el tamaño, costo y disponibilidad. Las

dos categorías principales de métodos de MS en tándem son tándem en el espacio y tándem en el tiempo, pero también hay híbridos donde los analizadores de tándem en el tiempo se acoplan en el espacio o con analizadores en tándem en el espacio. Un espectrómetro de masas en tándem en el espacio comprende una fuente de iones, un dispositivo de activación de iones precursores y al menos dos analizadores de masas no atrapantes. Se pueden diseñar funciones de separación m/z específicas de modo que en una sección del instrumento se seleccionen iones, se disocien en una región intermedia y luego los iones del producto se transmitan a otro analizador para la separación m/z y la adquisición de datos. En tándem en el tiempo, los iones del espectrómetro de masas producidos en la fuente de iones se pueden atrapar, aislar, fragmentar y separar m/z en el mismo dispositivo físico.

Los péptidos identificados por el espectrómetro de masas se pueden utilizar como representantes sustitutos de la proteína intacta y sus modificaciones postraduccionales u otras modificaciones. Se pueden usar para la caracterización de proteínas mediante la correlación de datos de MS/MS experimentales y teóricos, estos últimos generados a partir de posibles péptidos en una base de datos de secuencias de proteínas. La caracterización puede incluir, pero no se limita a, secuenciar aminoácidos de los fragmentos de proteínas, determinar la secuenciación de proteínas, determinar la secuenciación *de novo* de proteínas, localizar modificaciones postraduccionales o identificar modificaciones postraduccionales o análisis de comparabilidad o combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos de ejemplo, el espectrómetro de masas puede funcionar en nanoelectropulverización o nanopulverización. El término “nanoelectropulverización” o “nanopulverización”, como se usa en la presente, se refiere a la ionización por electropulverización a una velocidad de flujo de solvente muy baja, típicamente cientos de nanolitros por minuto de solución de muestra o inferior, a menudo sin el uso de un suministro de solvente externo. La configuración de infusión de electropulverización que forma una nanoelectropulverización puede usar un emisor de nanoelectropulverización estático o un emisor de nanoelectropulverización dinámico. Un emisor de nanoelectropulverización estática realiza un análisis continuo de volúmenes de solución de muestra pequeña (analito) durante un período de tiempo prolongado. Un emisor de nanoelectropulverización dinámico utiliza una columna capilar y un sistema de administración de solvente para realizar separaciones cromatográficas en mezclas antes del análisis mediante el espectrómetro de masas.

En algunos aspectos, la espectrometría de masas se puede realizar en condiciones naturales. Como se usa en la presente, el término “condiciones nativas” puede incluir realizar espectrometría de masas en condiciones que preservan interacciones no covalentes en un analito. Para una revisión detallada sobre la EM nativa, consultar la revisión: Elisabetta Boeri Erba y Carlo Petosa, The emerging role of native mass spectrometry in characterizing the structure and dynamics of macromolecular complexes, 24 PROTEIN SCIENCE 1176–1192 (2015).

Como se usa en la presente, el término “base de datos” se refiere a una recolección compilada de secuencias de proteínas que posiblemente puedan existir en una muestra, por ejemplo, en forma de un archivo en un formato FASTA. Las secuencias de proteínas relevantes se pueden derivar de secuencias de ADNc de una especie que se está estudiando. Las bases de datos públicas que se pueden usar para buscar secuencias de proteínas relevantes incluyeron bases de datos alojadas, por ejemplo, por Uniprot o Swiss-prot. Las bases de datos se pueden buscar usando lo que se denomina en la presente “herramientas de bioinformática”. Las herramientas de bioinformática proporcionan la capacidad de buscar espectros de MS/MS no interpretados contra todas las secuencias posibles en la (s) base(s) de datos y proporcionar espectros de MS/MS interpretados (anotados) como salida. Ejemplos no limitantes de estas herramientas son Mascot (www.matrixscience.com), Spectrum Mill (www.chem.agilent.com), PEGS (www.waters.com), PEAKS (www.bioinformaticssolutions.com), Proteinpilot (download.appliedbiosystems.com/proteinpilot), Phenyx (www.phenyx-ms.com), Sorcerer (www.sagenresearch.com), OMSSA (www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/omssa/), X'Tandem (www.thegpm.org/TANDEM/), Protein Prospector (prospector.ucsf.edu/prospector/mshome.htm), Byonic (www.proteinmetrics.com/products/byonic) o Sequest (fields.scripps.edu/sequest).

Excipientes de formulación

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación comprenden uno o más excipientes. El término “excipiente”, como se usa en la presente, significa cualquier agente no terapéutico agregado a la formulación para proporcionar una consistencia, viscosidad o efecto estabilizante deseado.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden comprender un amortiguador o sistema de amortiguador, que sirve para mantener un pH estable y para ayudar a estabilizar la proteína de interés. En algunos aspectos, el

amortiguador o sistema de amortiguador comprende al menos un amortiguador que tiene un intervalo de amortiguación que se superpone completamente o en parte al intervalo de pH 5,5 a 6,3. En varios aspectos, el pH de la formulación es 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2 o 6,3. En algunos aspectos, las formulaciones tienen un pH de $5,9 \pm 0,3$. En algunos aspectos, las formulaciones tienen un pH de $5,9 \pm 0,2$. En algunos aspectos, las formulaciones tienen un pH de $5,9 \pm 0,1$. En ciertos aspectos, el amortiguador comprende un amortiguador de histidina. En ciertos aspectos, el amortiguador comprende un amortiguador de acetato. En ciertos aspectos, el amortiguador (*por ejemplo*, histidina y/o acetato) está presente a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 40 mM, aproximadamente 5 mM a aproximadamente 30 mM, aproximadamente 10 mM a aproximadamente 15 mM; o aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM. En algunos aspectos, el amortiguador incluye un amortiguador de histidina a una concentración de 15 mM a 25 mM. En algunos aspectos, el amortiguador incluye un amortiguador de histidina a una concentración de $20 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$. En algunos casos, el amortiguador de histidina está presente a una concentración de 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 21 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM o 25 mM. En algunos aspectos, el amortiguador comprende un amortiguador de acetato a una concentración de 10 mM a 15 mM. En algunos aspectos, el amortiguador comprende un amortiguador de acetato a una concentración de $12,5 \text{ mM} \pm 1,25 \text{ mM}$. En algunos casos, el amortiguador de acetato está presente a una concentración de 10 mM, 10,5 mM, 11 mM, 11,5 mM, 12 mM, 12,5 mM, 13 mM, 13,5 mM, 14 mM, 14,5 mM o 15 mM. En algunos aspectos, las formulaciones de la presente divulgación incluyen amortiguadores de histidina y acetato a cualquiera de las concentraciones analizadas anteriormente. En algunos casos, las formulaciones contienen un amortiguador de histidina a una concentración de 15 mM a 25 mM, y un amortiguador de acetato a una concentración de 10 mM a 15 mM. En algunos casos, las formulaciones contienen un amortiguador de histidina a una concentración de $20 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ y un amortiguador de acetato a una concentración de $12,5 \text{ mM} \pm 1,25 \text{ mM}$.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden comprender uno o más carbohidratos, *por ejemplo*, uno o más azúcares. El azúcar puede ser un azúcar reductor o un azúcar no reductor. Los "azúcares reductores" incluyen, *por ejemplo*, azúcares con un grupo cetona o aldehído y contienen un grupo hemiacetal reactivo, que permite que el azúcar actúe como un agente reductor. Ejemplos específicos de azúcares reductores incluyen fructosa, glucosa, gliceraldehído, lactosa, arabinosa, manosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y maltosa. Azúcares no reductores pueden

comprender un carbono anomérico que es un acetal y no es sustancialmente reactivo con aminoácidos o polipéptidos para iniciar una reacción de Maillard. Ejemplos específicos de azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, sucralosa, melecitosa y rafinosa. Ácidos de azúcar incluyen, por ejemplo, ácidos sacáricos, gluconato y otros azúcares polihidroxilados y sales de los mismos. En algunos aspectos, el azúcar es sacarosa. En algunos casos, el azúcar (*por ejemplo*, sacarosa) actúa como un estabilizador térmico para la proteína de interés.

La cantidad de azúcar (*por ejemplo*, sacarosa) contenido dentro de las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación variará dependiendo de las circunstancias específicas y los propósitos previstos para los que se utilizan las formulaciones. En ciertos aspectos, las formulaciones pueden contener aproximadamente 0,1% a aproximadamente 20% de azúcar; aproximadamente 0,5% a aproximadamente 20% de azúcar; aproximadamente 1% a aproximadamente 20% de azúcar; aproximadamente 2% a aproximadamente 15% de azúcar; aproximadamente 3% a aproximadamente 8% de azúcar; o aproximadamente 4% a aproximadamente 6% de azúcar. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender aproximadamente 0,5%; aproximadamente 1,0%; aproximadamente 1,5%; aproximadamente 2,0%; aproximadamente 2,5%; aproximadamente 3,0%; aproximadamente 3,5%; aproximadamente 4,0%; aproximadamente 4,5%; aproximadamente 5,0%; aproximadamente 5,5%; aproximadamente 6,0%; aproximadamente 6,5%; aproximadamente 7,0%; aproximadamente 7,5%; aproximadamente 8,0%; aproximadamente 8,5%; aproximadamente 9,0%; aproximadamente 9,5%; aproximadamente 10,0%; aproximadamente 15%; o aproximadamente 20% de azúcar (*por ejemplo*, sacarosa). En algunos aspectos, las formulaciones contienen aproximadamente 5% de azúcar (*por ejemplo*, sacarosa). En algunos aspectos, las formulaciones contienen aproximadamente 5% $\pm$ 0,5% de azúcar (*por ejemplo*, sacarosa). Cada uno de los porcentajes mencionados anteriormente corresponde a un porcentaje en peso/volumen (p/v).

En ciertos aspectos, las formulaciones farmacéuticas de la divulgación comprenden al menos un aminoácido. En algunos aspectos, el aminoácido es arginina. En algunos aspectos, la arginina se proporciona en forma de clorhidrato de arginina. En algunos casos, el aminoácido (*por ejemplo*, arginina) actúa como un modificador de viscosidad para las formulaciones de la proteína de interés.

La cantidad de aminoácido contenido dentro de las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación puede variar dependiendo de las propiedades específicas deseadas de las formulaciones, así como de las circunstancias y propósitos particulares para los que se pretenden utilizar las formulaciones. En ciertos aspectos, las formulaciones pueden contener aproximadamente 1 mM a aproximadamente 200 mM de un aminoácido; aproximadamente 5 mM a aproximadamente 150 mM de un aminoácido; aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM de un aminoácido; aproximadamente 20 mM a aproximadamente 80 mM de un aminoácido; aproximadamente 20 mM a aproximadamente 30 mM de un aminoácido; aproximadamente 45 mM a aproximadamente 55 mM de un aminoácido; o aproximadamente 70 mM a aproximadamente 80 mM de un aminoácido. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden comprender aproximadamente 5 mM; aproximadamente 10 mM; aproximadamente 15 mM; aproximadamente 20 mM; aproximadamente 25 mM; aproximadamente 30 mM; aproximadamente 35 mM; aproximadamente 40 mM; aproximadamente 45 mM; aproximadamente 50 mM; aproximadamente 55 mM; aproximadamente 60 mM; aproximadamente 65 mM; aproximadamente 70 mM; aproximadamente 75 mM; aproximadamente 80 mM; aproximadamente 85 mM; aproximadamente 90 mM; aproximadamente 95 mM; o aproximadamente 100 mM de un aminoácido (*por ejemplo*, arginina). En algunos aspectos, las formulaciones contienen aproximadamente 25 mM de un aminoácido (*por ejemplo*, arginina). En algunos aspectos, las formulaciones contienen aproximadamente 50 mM de un aminoácido (*por ejemplo*, arginina). En algunos aspectos, las formulaciones contienen aproximadamente 75 mM de un aminoácido (*por ejemplo*, arginina).

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden comprender uno o más cosolventes orgánicos en un tipo y en una cantidad que estabilice la proteína de interés en condiciones de manipulación o agitación bruscas, tal como, *por ejemplo*, agitación orbital. En algunos aspectos, el cosolvente orgánico es un tensioactivo. Como se usa en la presente, el término “tensioactivo” significa una sustancia que reduce la tensión superficial de un fluido en el que se disuelve y/o reduce la tensión interfacial entre aceite y agua. Los tensioactivos pueden ser iónicos o no iónicos. Los tensioactivos no iónicos específicos que se pueden incluir en las formulaciones de la presente divulgación incluyen, por ejemplo, polisorbatos tal como PS20 y PS80, poloxámeros tal como poloxámero 188 y polietilenglicoles (PEG) tal como PEG3350.

La cantidad de tensioactivo contenido dentro de las formulaciones farmacéuticas de

la presente divulgación puede variar dependiendo de las propiedades específicas deseadas de las formulaciones, así como de las circunstancias y propósitos particulares para los que se pretenden utilizar las formulaciones. En ciertos aspectos, las formulaciones pueden contener al menos aproximadamente 0,01% de tensioactivo. En ciertos aspectos, las formulaciones pueden contener menos de 0,2% de tensioactivo. En algunos aspectos, las formulaciones pueden contener menos de 0,5% de tensioactivo. En ciertos aspectos, las formulaciones pueden contener aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,49% de tensioactivo; aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,39% de tensioactivo; aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,29% de tensioactivo; aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,19% de tensioactivo; aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,15% de tensioactivo; aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,12%; aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,11% de tensioactivo; aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,1% de tensioactivo; o aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,09% de tensioactivo. Por ejemplo, las formulaciones de la presente divulgación pueden comprender aproximadamente 0,01%; aproximadamente 0,02%; aproximadamente 0,03%; aproximadamente 0,04%; aproximadamente 0,05%; aproximadamente 0,06%; aproximadamente 0,07%; aproximadamente 0,08%; aproximadamente 0,09%; aproximadamente 0,1%; aproximadamente 0,11%; aproximadamente 0,12%; aproximadamente 0,13%; aproximadamente 0,14%; aproximadamente 0,15%; aproximadamente 0,16%; aproximadamente 0,17%; aproximadamente 0,18%; aproximadamente 0,19%; aproximadamente 0,20%; aproximadamente 0,21%; aproximadamente 0,22%; aproximadamente 0,23%; aproximadamente 0,24%; aproximadamente 0,25%; aproximadamente 0,26%; aproximadamente 0,27%; aproximadamente 0,28%; aproximadamente 0,29%; aproximadamente 0,30%; aproximadamente 0,35%; aproximadamente 0,40%; aproximadamente 0,45%; o aproximadamente 0,50% de tensioactivo (*por ejemplo*, PS20, PS80, poloxámero 188 o PEG3350). En algunos aspectos, las formulaciones contienen aproximadamente 0,01% a 0,19% de poloxámero 188. En algunos aspectos, las formulaciones contienen de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,49% de poloxámero 188. En algunos aspectos, las formulaciones contienen aproximadamente 0,01% a 0,19% de PEG3350. En algunos aspectos, las formulaciones contienen aproximadamente 0,01% a 0,49% de PEG3350. Cada uno de los porcentajes mencionados anteriormente corresponde a un porcentaje en peso/volumen (p/v).

Polisorbatos

En algunos aspectos, el tensioactivo en la composición puede ser un polisorbato. Como se usa en la presente, “polisorbato” se refiere a un excipiente común usado en el desarrollo de formulaciones para proteger anticuerpos contra diversas tensiones físicas tales como agitación, procesos de congelación-descongelación e interfaces aire/agua (Emily Ha, Wei Wang e Y. John Wang, Peroxide formation in polysorbate 80 and protein stability, 91 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2252-2264 (2002); Bruce A. Kerwin, Polysorbates 20 and 80 Used in the Formulation of Protein Biotherapeutics: Structure and Degradation Pathways, 97 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2924-2935 (2008); Hanns-Christian Mahler et al., Adsorption Behavior of a Surfactant and a Monoclonal Antibody to Sterilizing-Grade Filters, 99 Journal of Pharmaceutical Sciences 2620-2627 (2010)) y puede incluir un tensioactivo anfipático no iónico compuesto de ésteres de ácidos grasos de polioxietilen-sorbitán. Los ésteres pueden incluir un grupo de cabeza de sorbitán polioxietilenado y una cadena lateral de monolaurato saturado (polisorbato 20; PS20) o una cadena lateral de monooleato insaturado (polisorbato 80; PS80). En algunos aspectos, el polisorbato puede estar presente en la formulación en el intervalo de aproximadamente 0,001% a 1% (peso/volumen). El polisorbato también puede contener una mezcla de varias cadenas de ácidos grasos; por ejemplo, el polisorbato 80 contiene ácidos grasos oleico, palmítico, mirístico y esteárico, y la fracción de monooleato constituye aproximadamente el 58% de la mezcla polidispersa (Nitin Dixit et al., La proteína residual de la célula hospedera promueve la degradación de polisorbato 20 en un medicamento de sulfatasa que conduce a partículas de ácidos grasos libres, 105 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 1657-1666 (2016)). Ejemplos no limitantes de polisorbatos incluyen polisorbato-20, polisorbato-40, polisorbato-60, polisorbato-65 y polisorbato-80.

Un polisorbato puede ser susceptible a la autooxidación de una manera dependiente del pH y la temperatura, y además, la exposición a la luz UV también puede producir inestabilidad (Ravuri S.k. Kishore et al., Degradation of Polysorbates 20 and 80: Studies on Thermal Autoxidation and Hydrolysis, 100 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 721-731 (2011)), dando como resultado ácidos grasos libres en solución junto con el grupo de cabeza de sorbitán. Los ácidos grasos libres que resultan del polisorbato pueden incluir cualquier ácido graso alifático con seis a veinte carbonos. Los ejemplos no limitantes de ácidos grasos libres incluyen ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico o combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos de ejemplo, el polisorbato puede formar partículas de ácidos

grasos libres. Las partículas de ácidos grasos libres pueden tener al menos aproximadamente 1 μm de tamaño o al menos aproximadamente 5 μm de tamaño. Además, estas partículas de ácidos grasos se pueden clasificar de acuerdo con su tamaño como partículas visibles (aproximadamente $>100\ \mu\text{m}$), subvisibles (aproximadamente $<100\ \mu\text{m}$, que se pueden subdividir en micrones (1-100 μm) y submicrones (100 nm-1000 nm)) y nanométricas (aproximadamente $<100\ \text{nm}$) (Linda Narhi, Jeremy Schmit y Deepak Sharma, Classification of protein aggregates, 101 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 493-498). En algunos aspectos de ejemplo, las partículas de ácido graso pueden ser partículas visibles. Las partículas visibles se pueden determinar mediante inspección visual. En algunos aspectos, las partículas de ácidos grasos pueden ser partículas subvisibles. Las partículas subvisibles se pueden monitorear mediante el método de bloqueo de luz de acuerdo con la Farmacopea de los Estados Unidos (USP). Un aumento en las partículas de ácidos grasos puede hacer que un producto ya no sea de calidad aceptable y, por lo tanto, se puede usar una tasa de aumento de partículas de ácidos grasos como una medida de la vida útil del producto. Las partículas de ácidos grasos se pueden formar cuando los ácidos grasos libres se liberan en una formulación y exceden una concentración a la que son solubles, precipitando así de la solución. Por lo tanto, la medición de una degradación de polisorbato o una concentración de ácidos grasos libres liberados pueden ser indicadores de la formación de partículas de ácidos grasos y, por extensión, de la vida útil prevista del producto. Además, prevenir una degradación de polisorbato, una liberación de ácidos grasos libres y/o una formación de partículas de ácidos grasos puede ser importante para extender la vida útil del producto y mejorar la calidad del producto.

En algunos aspectos de ejemplo, la concentración de polisorbato en la formulación puede ser de aproximadamente 0,001% p/v, aproximadamente 0,002% p/v, aproximadamente 0,003% p/v, aproximadamente 0,004% p/v, aproximadamente 0,005% p/v, aproximadamente 0,006% p/v, aproximadamente 0,007% p/v, aproximadamente 0,008% p/v, aproximadamente 0,009% p/v, aproximadamente 0,01% p/v, aproximadamente 0,015% p/v, aproximadamente 0,02% p/v, 0,025% p/v, aproximadamente 0,03% p/v, aproximadamente 0,03 5% p/v, aproximadamente 0,04% p/v, aproximadamente 0,045% p/v, aproximadamente 0,05% p/v, aproximadamente 0,06% p/v, aproximadamente 0,07% p/v, aproximadamente 0,08% p/v, aproximadamente 0,09% p/v, aproximadamente 0,1% p/v, aproximadamente 0,2% p/v, aproximadamente 0,3% p/v, aproximadamente 0,4% p/v, aproximadamente 0,5% p/v, aproximadamente 0,6% p/v, aproximadamente 0,7% p/v, aproximadamente 0,8% p/v, aproximadamente 0,9% p/v, o aproximadamente 1% p/v. En

un aspecto, la concentración de polisorbato en la formulación es de aproximadamente 1% p/v.

En algunos aspectos de ejemplo, la concentración de ácidos grasos libres en la formulación puede ser de aproximadamente 10 ng/ml, aproximadamente 20 ng/ml, aproximadamente 30 ng/ml, aproximadamente 40 ng/ml, aproximadamente 50 ng/ml, aproximadamente 60 ng/ml, aproximadamente 70 ng/ml, aproximadamente 80 ng/ml, aproximadamente 90 ng/ml, aproximadamente 100 ng/ml, aproximadamente 200 ng/ml, aproximadamente 300 ng/ml, aproximadamente 400 ng/ml, aproximadamente 500 ng/ml, aproximadamente 600 ng/ml, aproximadamente 700 ng/ml, aproximadamente 800 ng/ml, aproximadamente 900 ng/ml, aproximadamente 1 µg/ml, aproximadamente 2 µg/ml, aproximadamente 3 µg/ml, aproximadamente 4 µg/ml, aproximadamente 5 µg/ml, aproximadamente 6 µg/ml, aproximadamente 7 µg/ml, aproximadamente 8 µg/ml, aproximadamente 9 µg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 30 µg/ml o aproximadamente 40 µg/ml.

En algunos aspectos de ejemplo, el polisorbato se puede degradar por una proteína de célula hospedadora presente en la composición. En algunos aspectos, la proteína de la célula hospedadora puede ser una esterasa o lipasa. La actividad de esterasa o lipasa residual en una formulación se puede evaluar indirectamente midiendo la degradación de polisorbato, la liberación de ácidos grasos libres o una concentración de partículas de ácidos grasos visibles o subvisibles.

El término “éster de ácido graso” significa cualquier compuesto orgánico que contiene una cadena de ácido graso unida a un grupo principal a través de un enlace éster. Se forma un enlace éster cuando un grupo hidroxilo (*por ejemplo*, un alcohol o ácido carboxílico) se reemplaza por un grupo alcoxi. Como se usa en la presente, el grupo hidroxilo puede ser parte de un ácido carboxílico, más específicamente un ácido graso, y/o un alcohol, tal como glicerol, sorbitol, sorbitán, isosorbida, o similares. El grupo alcohol se conoce generalmente en la presente como el grupo principal.

Los ejemplos de ésteres de ácidos grasos incluyen en general fosfolípidos, lípidos (*por ejemplo*, el grupo principal es glicerol, que incluye monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos) y tensioactivos y emulsionantes, que incluyen, por ejemplo, polisorbatos como polisorbato 20, polisorbato 60 y polisorbato 80, que son detergentes no iónicos. Los tensioactivos y emulsionantes son útiles como cosolventes y estabilizadores. Funcionan al asociarse tanto con una superficie hidrófila como con una superficie lipófila para mantener

la dispersión y la estabilidad estructural de los ingredientes, como las proteínas. Los tensioactivos se agregan a las formulaciones de proteínas principalmente para mejorar la estabilidad de la proteína contra el estrés mecánico, tal como la interfaz aire/líquido y el cizallamiento de la interfaz sólido/líquido. Sin un tensioactivo, las proteínas pueden en algunos casos volverse estructuralmente inestables en solución y formar agregados multiméricos que eventualmente se convierten en partículas subvisibles.

El término “ácido graso” o “cadena de ácido graso” significa un ácido carboxílico que tiene una cola alifática. Una cola alifática es simplemente una cadena de hidrocarburo que comprende carbono e hidrógeno, y en algunos casos, sustituciones de oxígeno, azufre, nitrógeno y/o cloro. Las colas alifáticas pueden estar saturadas (como en los ácidos grasos saturados), lo que significa que todos los enlaces carbono-carbono son enlaces simples (*es decir*, alcanos). Las colas alifáticas pueden ser insaturadas (como en los ácidos grasos insaturados), en donde uno o más enlaces carbono-carbono son enlaces dobles (alquenos) o enlaces triples (alquinos).

Los ácidos grasos se designan generalmente como ácidos grasos de cadena corta, que tienen menos de seis carbonos en sus colas alifáticas, ácidos grasos de cadena media que tienen de seis a doce carbonos, ácidos grasos de cadena larga que tienen de trece a veintiún carbonos y ácidos grasos de cadena muy larga que tienen colas alifáticas de veintidós carbonos y más. Como se mencionó anteriormente, los ácidos grasos también se clasifican de acuerdo con su grado de saturación, que se correlaciona con la rigidez y el punto de fusión. Los ácidos grasos comunes incluyen ácido caprílico (8 carbonos:0 enlaces dobles; 8:0), ácido cáprico (10:0), ácido láurico (12:0), ácido mirístico (14:0), ácido miristoleico (14:1), ácido palmítico (16:0), ácido palmitoleico (16:1), ácido sapiénico (16:1), ácido esteárico (18:0), ácido oleico (18:1), ácido elaídico (18:1), ácido vacénico (18:1), ácido linoleico (18:2), ácido linelaédico (18:2), ácido alfa-linolénico (18:3), ácido araquídico (20:0), ácido araquidónico (20:4), ácido eicosapentaenoico (20:5), ácido behénico (22:0), ácido erúcico (22:1), ácido docosahexaenoico (22:6), ácido lignocérico (24:0) y ácido cerotico (26:0).

Como se mencionó anteriormente, los polisorbatos son ésteres de ácidos grasos útiles como tensioactivos no iónicos y estabilizadores de proteínas. El polisorbato 20, el polisorbato 40, el polisorbato 60 y el polisorbato 80 se emplean ampliamente en las industrias farmacéutica, cosmética y alimentaria como estabilizadores y emulsionantes. El polisorbato 20 comprende principalmente el éster de monolaurato de sorbitán

polioxietilenado (20). El polisorbato 40 comprende principalmente el éster monopalmitato de sorbitán polioxietilenado (20). El polisorbato 60 comprende principalmente el éster de monoestearato de sorbitán polioxietilenado (20). El polisorbato 80 comprende principalmente el éster monooleato de sorbitán polioxietilenado (20).

La calidad de los grados comerciales de polisorbatos varía de un proveedor a otro. Por lo tanto, los polisorbatos a menudo son mezclas de diversas entidades químicas, que consisten principalmente en monoésteres de sorbitán polioxietilenado (20) (como se describió anteriormente) con, en algunos casos, contaminantes de éster de isosorbida. El grupo principal (en este caso sorbitán polioxietilenado (20)) comprende un sorbitán (una mezcla de sorbitoles deshidratados, que incluye 1,4-anhidrosorbitol, 1,5-anhidrosorbitol y 1,4,3,6-dianhidrosorbitol) sustituido en tres de sus grupos alcohol para formar enlaces éter con tres grupos polioxietileno. El cuarto grupo alcohol se sustituye con un ácido graso para formar un éster de ácido graso.

En algunos lotes de polisorbatos disponibles en el mercado, el polisorbato contiene monoésteres de isosorbida. La isosorbida es un derivado heterocíclico de la glucosa, también preparado por la deshidratación del sorbitol. Es un diol, es decir, que tiene dos grupos alcohol que pueden participar en la formación de uno o dos enlaces éster. Por lo tanto, por ejemplo, algunos lotes de polisorbato 20 pueden contener cantidades significativas de mono y diésteres de laurato de isosorbida, y algunos lotes de polisorbato 80 pueden contener cantidades significativas de mono y diésteres de oleato de isosorbida.

Además de la variación del grupo principal, las preparaciones de polisorbatos contienen cantidades variables de otros ésteres de ácidos grasos. Por ejemplo, un análisis de una fuente particular de polisorbato 20 reveló <10% de ácido caprílico, <10% de ácido cáprico, 40-60% de ácido láurico, 14-25% de ácido mirístico, 7-15% de ácido palmítico, <11% de ácido oleico, <7% de ácido esteárico y <3% de ácido linoleico. Un análisis de un lote de polisorbato 80 reveló <5% de ácido mirístico, <16% de ácido palmítico, >58% de ácido oleico, <6% de ácido esteárico y <18% de ácido linoleico. Un análisis de otra fuente de polisorbato 80 reveló aproximadamente 70% de ácido oleico, con el resto que son otros ésteres de ácidos grasos e impurezas. Un análisis de aun otra fuente de polisorbato 80 reveló aproximadamente 86-87% de ácido oleico. Un análisis de una fuente adicional, más recientemente desarrollada, de polisorbato 80 reveló >99% de ácido oleico.

En algunos aspectos, una concentración de ácido oleico en polisorbato 80 puede estar entre aproximadamente 50% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 58%

y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 60% y 100%, entre aproximadamente 80% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 90% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 95% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 98% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 99% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 98,0% y aproximadamente 99,9%, entre aproximadamente 98,5% y aproximadamente 99,5%, entre aproximadamente 99,0% y aproximadamente 99,9%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 91%, al menos 92%, al menos 93%, al menos 94%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 98,5%, al menos 99%, al menos 99,5%, aproximadamente 58%, aproximadamente 60%, aproximadamente 65%, aproximadamente 70%, aproximadamente 75%, aproximadamente 80%, aproximadamente 81%, aproximadamente 82%, aproximadamente 83%, aproximadamente 84%, aproximadamente 85%, aproximadamente 86%, aproximadamente 87%, aproximadamente 88%, aproximadamente 89%, aproximadamente 90%, aproximadamente 91%, aproximadamente 92%, aproximadamente 93%, aproximadamente 94%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98%, aproximadamente 98,5%, aproximadamente 99%, aproximadamente 99,1%, aproximadamente 99,2%, aproximadamente 99,3%, aproximadamente 99,4%, aproximadamente 99,5%, aproximadamente 99,6%, aproximadamente 99,7%, aproximadamente 99,8%, aproximadamente 99,9%, o aproximadamente 100%.

Los fármacos biofarmacéuticos a menudo se formulan con detergentes no iónicos como polisorbato 20 o polisorbato 80. Estos detergentes ayudan a estabilizar moléculas grandes como anticuerpos y otras proteínas, y ayudan a prevenir la formación de complejos ternarios supermoleculares u otros agregados. Los agregados pueden convertirse en nanopartículas o partículas subvisibles en el intervalo de 10 a 100 micrones o en el intervalo de 2 a 100 micrones e interferir con la estabilidad y la vida útil del producto farmacéutico. Por lo tanto, la estabilidad de las formulaciones de proteínas depende en algunos casos de la estabilidad del aditivo detergente no iónico. Sin embargo, y como se analiza adicionalmente en la presente, el polisorbato 20 y el polisorbato 80 pueden, en algunos casos, contribuir a la formación de agregados, nanopartículas y partículas subvisibles.

La frase "partícula subvisible" significa una partícula que no es visible, especialmente en un líquido. En otras palabras, una solución u otro líquido que contiene partículas subvisibles, pero no partículas visibles, no aparecerá turbio. Las partículas subvisibles generalmente incluyen aquellas partículas de 100 micrones o menos de diámetro, pero en

algunos casos incluyen partículas por debajo de 150 micrones (Narhi et al., "A critical review of analytical methods for subvisible and visible particles," *Curr Pharm Biotechnol* 10(4):373-381 (2009)). Las partículas subvisibles pueden ser el resultado de contaminantes extraños o agregación de proteínas. Los agregados de proteínas pueden ser de forma blanda y amorfa y, por lo tanto, pueden ser difíciles de detectar usando oscurecimiento por luz convencional y métodos microscópicos (Singh y Toler, "Monitoring of subvisible particles in therapeutic proteins," *Methods Mol Biol.* 2012; 899:379-401). Las partículas subvisibles pueden comprender, *inter alia*, contaminantes de silicona (gotas oleosas), ácidos grasos libres (gotas oleosas), proteína agregada (partículas amorfas) y/o complejos de proteína/ácido graso (partículas amorfas).

Las partículas subvisibles se pueden detectar mediante cualquiera de uno o más de varios métodos. Las normas d USP especifican protocolos de oscurecimiento por luz y microscopía óptica. Otros métodos incluyen análisis de imágenes de microflujo (MFI), recuento de Coulter y métodos de seguimiento de partículas submicrométricas. Para el oscurecimiento por luz (LO, por sus siglas en inglés), las partículas se cuentan en función de las sombras que proyectan sobre un detector de luz a medida que pasan a través de un haz de luz en una celda de flujo. El tamaño, forma e intensidad inversa de la sombra depende del tamaño, forma y diferencia en el índice de refracción de la partícula con respecto a la solución. El intervalo de tamaño inferior para la detección utilizando LO es de aproximadamente 2 micrones. Un dispositivo de LO comúnmente utilizado es el instrumento HIAC (Beckman Coulter, Brea, Calif.). Varios métodos de medición y caracterización de SVP (*por ejemplo*, oscurecimiento por luz, microscopía de flujo, el método de zona de detección eléctrica y citometría de flujo), se analizan, por ejemplo, en Narhi et al. "Subvisible (2-100 μ m) Particle Analysis During Biotherapeutic Drug Product Development: Part 1, Considerations and Strategy," *J. Pharma. Sci.* 104:1899-1908 (2015).

El oscurecimiento por luz es criticado por subestimar los agregados de proteínas y otras estructuras amorfas. El análisis de imágenes de flujo, tal como la formación de imágenes de microflujo (MFI) (Brightwell Technologies, Ottawa, Ontario), es un método más sensible para detectar las partículas subvisibles proteicas de forma irregular, frágiles y transparentes, y para diferenciar esos tipos de partículas de microgotas de silicona, burbujas de aire y otros contaminantes extraños (Sharma et al., "Micro-flow imaging: Flow microscopy applied to sub-visible particulate analysis in protein formulations," *AAPS J.* 12(3): 455-464 (2010)). En general, debido a que la medición y caracterización de SVP por análisis de oscurecimiento por luz es menos sensible que MFI, los recuentos de partículas

detectados por MFI tenderán a ser más altos que los recuentos de partículas detectados por análisis de oscurecimiento por luz. En resumen, la MFI es una microscopía de flujo en la que se toman y analizan sucesivas imágenes de campo brillante en tiempo real. Los algoritmos de análisis de imágenes se aplican a las imágenes para discriminar burbujas de aire, gotas de aceite de silicona y agregados proteínicos. Se pueden analizar volúmenes tan bajos como aproximadamente 250 microlitros hasta tan altos como decenas de mililitros. Dependiendo del sistema utilizado, se pueden detectar partículas en el intervalo de dos a 300 micrones, o de una a 70 micrones (Id).

En algunos aspectos, las partículas visibles o subvisibles en una formulación se pueden detectar y analizar mediante espectroscopía Raman. Como se usa en la presente, el término “espectroscopía Raman” se refiere a un método espectroscópico basado en el método de dispersión Raman. La espectroscopía Raman puede proporcionar un espectro Raman, que puede identificar la presencia y posición de bandas en la región de huella (2000 a 400 cm^{-1}) que permite la identificación química del material analizado en comparación con una base de datos de espectros Raman (C. V. Raman y K. S. Krishnan, A new type of secondary radiation, 121 NATURE 501-502 (1928); Zai-Qing Wen, Raman spectroscopy of protein Pharmaceuticals, 96 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 2861-287 (2007)).

La FDA y otras agencias reguladoras gubernamentales han puesto límites a la cantidad de partículas subvisibles permitidas en las formulaciones de fármacos parenterales. La principal preocupación articulada es la incertidumbre que rodea la inmunogenicidad potencial y los efectos negativos posteriores en el paciente que recibe el fármaco (Singh et al., “An industry perspective on the monitoring of subvisible particles as a quality attribute for protein therapeutic,” J. Pharma. Sci. 99(8):3302-21 (2010)). Para fármacos parenterales de pequeño volumen (*por ejemplo*, 100 mL o menos), la farmacopea limita las partículas subvisibles (SVP) de más de o igual a 10 micrones a no más de 6.000 SVP por recipiente, y SVP de más de o igual a 25 micrones a no más de 600 por recipiente, cuando se determina mediante análisis de oscurecimiento por luz; y SVP de más de o igual a 10 micrones a no más de 3.000 SVP por recipiente, y SVP de más de o igual a 25 micrones a no más de 300 por recipiente, cuando se determina mediante la prueba microscópica de membrana. (United States Pharmacopeia and National Formulary (USP 40-NF 28), <787>Subvisible Particulate Matter in Therapeutic Protein Injections.) Para los fármacos oftálmicos, los límites de SVP son 50 por ml de 10 micrones o más, 5 por ml de 25 micrones o más y 2 por ml de 50 micrones o más (Id. en <78922 Materia particulada en soluciones

oftálmicas). Las agencias reguladoras están contemplando cada vez más que los fabricantes establezcan especificaciones para SVP de 2 micrones o más (ver Singh et al., "An industry perspective on the monitoring of subvisible particles as a quality attribute for protein therapeutics," J. Pharm. Sci. 99(8):3 3 02-21 (2010)).

El término "esterasa" significa una enzima que cataliza la hidrólisis de un enlace éster para crear un ácido y un alcohol. Las esterases son una categoría diversa de enzimas, que incluyen acetil esterases (*por ejemplo*, acetilcolinesterasa), fosfatasas, nucleasas, tioesterases, lipasas y otras carboxil éster hidrolasas. Como su nombre lo indica, una carboxil éster hidrolasa (también conocida como carboxilesterasa, carboxílico-éster hidrolasa y EC 3.1.1.1) utiliza agua para hidrolizar un éster carboxílico en un alcohol y un carboxilato. Una lipasa es una carboxil éster hidrolasa que cataliza la hidrólisis de lípidos, incluidos triglicéridos, grasas y aceites en ácidos grasos y un grupo de cabeza de alcohol. Por ejemplo, los triglicéridos se hidrolizan por lipasas como la lipasa pancreática para formar monoacilglicerol y dos cadenas de ácidos grasos.

Las fosfolipasas son lipasas que hidrolizan fosfolípidos en ácidos grasos y otros productos. Las fosfolipasas se dividen en cuatro amplias categorías: fosfolipasa A (que incluye fosfolipasa A1 y fosfolipasa A2), fosfolipasa B y las fosfodiesterasas fosfodiesterasa C y fosfodiesterasa D. Además de las fosfolipasas canónicas, se cree que las enzimas similares a la fosfolipasa B, que residen en el lumen del lisosoma, están involucradas en la catálisis de lípidos. Por ejemplo, se postula que la fosfolipasa tipo B 2 (PLBL2) tiene actividad de esterasa en función de la homología de secuencia y la localización subcelular (Jensen et al., "Biochemical characterization and liposomal localization of the mannose-6-phosphate protein p76," Biochem. J. 402: 449-45 8 (2007)).

Como se usa en la presente, la frase "porcentaje de hidrólisis de éster graso" se refiere a la proporción molar de éster de ácido graso que se ha hidrolizado. Dado que la hidrólisis de un éster de ácido graso da como resultado la liberación de un ácido graso libre, el porcentaje de hidrólisis de éster graso se puede determinar midiendo el ácido graso libre en una muestra. Por lo tanto, el porcentaje de hidrólisis de éster graso se puede determinar calculando moles de ácido graso libre dividido por la suma de moles de ácido graso más moles de éster de ácido graso. En el caso del porcentaje de hidrólisis de polisorbato 80 o polisorbato 20, ese número se puede determinar calculando los moles de ácido graso libre y dividiendo por los moles totales de polisorbato restante más moles de ácido graso libre.

El término "inhibidor de esterasa" significa cualquier entidad química que reduce,

inhibe o bloquea la actividad de una esterasa. Los solicitantes prevén que la inclusión de un inhibidor de esterasa en una formulación de proteína que contiene un tensioactivo de éster de ácido graso puede ayudar a mantener la estabilidad de proteína y la estabilidad de éster de ácido graso y ayudar a reducir la formación de SVP. Las esterasas comunes conocidas en la técnica incluyen orlistat (tetrahidrolipistatina; un inhibidor de carboxilesterasa 2 y lipoproteína lipasa), fosfato de dietilumbeliferilo (un inhibidor de colesterol esterasa [lipasa A]), URB602 (éster ciclohexílico de ácido [1-1'-bifenil]-3-*tl*-carbámico; un inhibidor de monoacilglicerol lipasa) y ácido 2-butoxifenilborónico (un inhibidor de lipasa sensible a hormonas). Se espera que la inclusión de un inhibidor de esterasa durante la purificación de una proteína de interés o en la formulación final prevenga o ralentice la hidrólisis de detergentes no iónicos como polisorbato 20 y polisorbato 80, que a su vez se espera que prevenga o reduzca la formación de partículas subvisibles.

Formulaciones de ejemplo

De acuerdo con un aspecto de la presente divulgación, la formulación farmacéutica comprende: (i) un anticuerpo humano que se une específicamente a hIL-4R (*por ejemplo*, un anticuerpo que comprende una o más secuencias divulgadas en la Tabla 1 a continuación); (ii) acetato; (iii) histidina; (iv) sacarosa; (v) arginina; y (v) un tensioactivo que comprende un polietilenglicol o un poloxámero.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano que se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 10 mM a 15 mM; (iii) histidina a una concentración de 15 mM a 25 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 2,5% p/v a 7,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 20 mM a 80 mM; y (vi) un tensioactivo que comprende un polietilenglicol o un poloxámero a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,7 a 6,1. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende un polietilenglicol o un poloxámero puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 15 mg/mL a 200 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 10 mM a 15 mM; (iii) histidina a una concentración de 15 mM a 25 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 2,5% p/v a 7,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 20 mM a 80 mM; y (vi) un tensioactivo que comprende un polietilenglicol o un poloxámero a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,7 a 6,1. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende un polietilenglicol o un poloxámero puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 15 mg/mL a 200 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 10 mM a 15 mM; (iii) histidina a una concentración de 15 mM a 25 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 2,5% p/v a 7,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 20 mM a 80 mM; y (vi) PEG3350 o poloxámero 188 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,7 a 6,1. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende PEG3350 o poloxámero 188 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 15 mg/mL a 200 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID

NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 12,5 mM $\pm$ 1,25 mM; (iii) histidina a una concentración de 20 mM $\pm$ 2 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 5% p/v $\pm$ 0,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 25 mM $\pm$ 2,5 mM; y (vi) un tensioactivo que comprende PEG3350 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,9 $\pm$ 0,2. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende PEG3350 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 15 mg/mL a 200 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 12,5 mM $\pm$ 1,25 mM; (iii) histidina a una concentración de 20 mM $\pm$ 2 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 5% p/v $\pm$ 0,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 25 mM $\pm$ 2,5 mM; y (vi) un tensioactivo que comprende poloxámero 188 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,9 $\pm$ 0,2. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende poloxámero 188 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 100 mg/mL a 200 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 10 mM a 15 mM; (iii) histidina a una concentración de 15 mM a 25 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 2,5% p/v a 7,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 20 mM a 80 mM; y (vi) un tensioactivo que comprende un polietilenglicol o un poloxámero a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,7 a 6,1. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende polietilenglicol o un poloxámero puede estar en una concentración de

aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 100 mg/mL a 200 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 10 mM a 15 mM; (iii) histidina a una concentración de 15 mM a 25 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 2,5% p/v a 7,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 20 mM a 80 mM; y (vi) PEG3350 o poloxámero 188 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,7 a 6,1. En otro aspecto, el PEG3350 o poloxámero 188 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 100 mg/mL a 200 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 12,5 mM $\pm$ 1,25 mM; (iii) histidina a una concentración de 20 mM $\pm$ 2 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 5% p/v $\pm$ 0,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 25 mM $\pm$ 2,5 mM; y (vi) un tensioactivo que comprende PEG3350 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,9 $\pm$ 0,2. En otro aspecto, el PEG3350 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un

anticuerpo humano a una concentración de 100 mg/mL a 200 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 12,5 mM $\pm$ 1,25 mM; (iii) histidina a una concentración de 20 mM $\pm$ 2 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 5% p/v $\pm$ 0,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 25 mM $\pm$ 2,5 mM; y (vi) un tensioactivo que comprende poloxámero 188 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,9 $\pm$ 0,2. En otro aspecto, el poloxámero 188 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 150 mg/mL $\pm$ 10 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 10 mM a 15 mM; (iii) histidina a una concentración de 15 mM a 25 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 2,5% p/v a 7,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 20 mM a 80 mM; y (vi) un tensioactivo que comprende un polietilenglicol o un poloxámero a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,7 a 6,1. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende polietilenglicol o un poloxámero puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 150 mg/mL $\pm$ 10 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 10 mM a 15 mM; (iii) histidina a una concentración

de 15 mM a 25 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 2,5% p/v a 7,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 20 mM a 80 mM; y (vi) PEG3350 o poloxámero 188 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,7 a 6,1. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende PEG3350 o poloxámero 188 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 150 mg/mL $\pm$ 10 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 12,5 mM $\pm$ 1,25 mM; (iii) histidina a una concentración de 20 mM $\pm$ 2 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 5% p/v $\pm$ 0,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 25 mM $\pm$ 2,5 mM; y (vi) un tensioactivo que comprende PEG3350 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,9 $\pm$ 0,2. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende PEG3350 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 150 mg/mL $\pm$ 10 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 12,5 mM $\pm$ 1,25 mM; (iii) histidina a una concentración de 20 mM $\pm$ 2 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 5% p/v $\pm$ 0,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 25 mM $\pm$ 2,5 mM; y (vi) un tensioactivo que comprende poloxámero 188 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,9 $\pm$ 0,2. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende poloxámero 188 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o

aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 175 mg/mL $\pm$ 10 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 10 mM a 15 mM; (iii) histidina a una concentración de 15 mM a 25 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 2,5% p/v a 7,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 20 mM a 80 mM; y (vi) un tensioactivo que comprende un polietilenglicol o un poloxámero a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,7 a 6,1. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende polietilenglicol o un poloxámero puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 175 mg/mL $\pm$ 10 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 10 mM a 15 mM; (iii) histidina a una concentración de 15 mM a 25 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 2,5% p/v a 7,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 20 mM a 80 mM; y (vi) PEG3350 o poloxámero 188 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,7 a 6,1. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende PEG3350 o poloxámero 188 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 175 mg/mL $\pm$ 10 mg/mL, en donde el anticuerpo

se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 12,5 mM $\pm$ 1,25 mM; (iii) histidina a una concentración de 20 mM $\pm$ 2 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 5% p/v $\pm$ 0,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 25 mM $\pm$ 2,5 mM; y (vi) un tensioactivo que comprende PEG3350 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,9 $\pm$ 0,2. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende PEG3350 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 175 mg/mL $\pm$ 10 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 12,5 mM $\pm$ 1,25 mM; (iii) histidina a una concentración de 20 mM $\pm$ 2 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 5% p/v $\pm$ 0,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 25 mM $\pm$ 2,5 mM; y (vi) un tensioactivo que comprende poloxámero 188 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5,9 $\pm$ 0,2. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende poloxámero 188 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de 175 mg/mL $\pm$ 10 mg/mL, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de 12,5 mM $\pm$ 1,25 mM; (iii) histidina a una concentración de 20 mM $\pm$ 2 mM; (iv) sacarosa a una concentración de 5% p/v $\pm$ 0,5% p/v; (v) arginina a una concentración de 50 mM $\pm$ 2,5 mM; y (vi) un tensioactivo que comprende

PEG3350 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de $5,9 \pm 0,2$. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende PEG3350 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de $175 \text{ mg/mL} \pm 10 \text{ mg/mL}$, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de $12,5 \text{ mM} \pm 1,25 \text{ mM}$; (iii) histidina a una concentración de $20 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$; (iv) sacarosa a una concentración de $5\% \text{ p/v} \pm 0,5\% \text{ p/v}$; (v) arginina a una concentración de $50 \text{ mM} \pm 2,5 \text{ mM}$; y (vi) un tensioactivo que comprende poloxámero 188 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de $5,9 \pm 0,2$. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende poloxámero 188 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de $175 \text{ mg/mL} \pm 10 \text{ mg/mL}$, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de $12,5 \text{ mM} \pm 1,25 \text{ mM}$; (iii) histidina a una concentración de $20 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$; (iv) sacarosa a una concentración de $5\% \text{ p/v} \pm 0,5\% \text{ p/v}$; (v) arginina a una concentración de $75 \text{ mM} \pm 2,5 \text{ mM}$; y (vi) un tensioactivo que comprende PEG3350 a una concentración de 0,01% p/v a 0,19% p/v, en donde la formulación tiene un pH de $5,9 \pm 0,2$. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende PEG3350 puede estar en una concentración de aproximadamente 0,01% p/v a 0,5% p/v, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,4%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,3%, o aproximadamente 0,01% p/v a 0,2%. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende: (i) un anticuerpo humano a una concentración de $175 \text{ mg/mL} \pm 10 \text{ mg/mL}$, en donde el anticuerpo se une específicamente a IL-4R α humano y comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2; (ii) acetato a una concentración de $12,5 \text{ mM} \pm 1,25 \text{ mM}$; (iii) histidina a una concentración de $20 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$; (iv) sacarosa a una concentración de $5\% \text{ p/v} \pm 0,5\% \text{ p/v}$; (v) arginina a una concentración de $75 \text{ mM} \pm 2,5 \text{ mM}$; y (vi) un tensioactivo que comprende poloxámero 188 a una concentración de $0,01\% \text{ p/v}$ a $0,19\% \text{ p/v}$, en donde la formulación tiene un pH de $5,9 \pm 0,2$. En otro aspecto, el tensioactivo que comprende poloxámero 188 puede estar en una concentración de aproximadamente $0,01\% \text{ p/v}$ a $0,5\% \text{ p/v}$, o aproximadamente $0,01\% \text{ p/v}$ a $0,4\%$, o aproximadamente $0,01\% \text{ p/v}$ a $0,3\%$, o aproximadamente $0,01\% \text{ p/v}$ a $0,2\%$. En otro aspecto, el pH de la formulación puede ser de aproximadamente 5,4 a 6,5, aproximadamente 5,5 a 6,2 o aproximadamente 5,6 a 6,2.

En cualquiera de los diversos aspectos de las formulaciones farmacéuticas analizadas anteriormente o en la presente, el anticuerpo de IL-4R humano puede comprender una región constante de cadena pesada de IgG1 humana.

En cualquiera de los diversos aspectos de las formulaciones farmacéuticas analizadas anteriormente o en la presente, el anticuerpo de IL-4R humano puede comprender una región constante de cadena pesada de IgG4 humana.

En algunos aspectos, el anticuerpo de IL-4R humano puede comprender una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 10.

Ejemplos no limitantes adicionales de formulaciones farmacéuticas comprendidas por la presente divulgación se establecen en otra parte de la presente, incluyendo los Ejemplos de trabajo presentados más adelante.

Estabilidad de las formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación exhiben altos niveles de estabilidad. El término "estable", como se usa en la presente en referencia a las formulaciones farmacéuticas, significa que las proteínas de interés dentro de las formulaciones farmacéuticas retienen un grado aceptable de estructura y/o función y/o actividad biológica después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida.

Una formulación puede ser estable incluso aunque la proteína contenida en la misma no mantenga el 100% de su estructura y/o función y/o actividad biológica después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida. Bajo ciertas circunstancias, el mantenimiento de aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98% o aproximadamente 99% de la estructura y/o función y/o actividad biológica de una proteína después del almacenamiento durante un período de tiempo definido se puede considerar "estable".

La estabilidad se puede medir, *inter alia*, determinando el porcentaje de proteína que forma un agregado dentro de la formulación después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura definida, o en condiciones de estrés (*por ejemplo*, agitación), en donde la estabilidad es inversamente proporcional al porcentaje de agregado que se forma. El porcentaje de proteína agregada se puede determinar mediante, *inter alia*, cromatografía de exclusión por tamaño (*por ejemplo*, cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-HPLC) o cromatografía líquida de ultra rendimiento de exclusión por tamaño (SE-UPLC)). Un "grado aceptable de estabilidad", como se usa esa frase en la presente, significa que como máximo aproximadamente 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5% o 0,1% de la proteína se puede detectar en un agregado en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura dada, o en condiciones de estrés especificadas. La cantidad de tiempo definida después de la cual se mide la estabilidad puede ser de al menos 2 semanas, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, al menos 30 meses, al menos 36 meses o más. La temperatura a la que se puede almacenar la formulación farmacéutica cuando se evalúa la estabilidad puede ser cualquier temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente 45 °C, *por ejemplo*, almacenamiento a aproximadamente -80 °C, aproximadamente -30 °C, aproximadamente -20 °C, aproximadamente 0 °C, aproximadamente 4 °C-8 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 37 °C o aproximadamente 45 °C. La "condición de estrés" a la que se puede someter la proteína formulada de interés puede ser estrés de agitación (*por ejemplo*, agitación vorticial) durante un período de 10 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 40 minutos, 50 minutos, 60 minutos, 70 minutos, 80 minutos, 90 minutos, 100 minutos, 110 minutos, 120 minutos, 150 minutos, 180 minutos o más. Por ejemplo, una

formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-IL-4R se puede considerar estable si después de nueve meses de almacenamiento a 5 °C, se detecta menos de aproximadamente 2%, 1,75%, 1,5%, 1,25%, 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25% o 0,1% del anticuerpo en una forma agregada. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de 56 días de almacenamiento a 45 °C, se detecta menos de aproximadamente 12% de la proteína en una forma agregada. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de 42 días de almacenamiento a 45 °C, se detecta menos de aproximadamente 10% o menos de aproximadamente 9% de la proteína en una forma agregada. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de 28 días de almacenamiento a 45 °C, se detecta menos de aproximadamente 8% o menos de aproximadamente 7,5% o menos de aproximadamente 7% de la proteína en una forma agregada. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de 14 días de almacenamiento a 45 °C, se detecta menos de aproximadamente 6% de la proteína en una forma agregada. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de tres meses de almacenamiento a -20 °C, -30 °C o -80 °C se detecta menos de aproximadamente 2%, 1,9%, 1,8%, 1,7%, 1,6%, 1,5%, 1%, 0,5%, o 0,1% de la proteína en una forma agregada. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de 120 minutos de agitación (*por ejemplo*, mediante agitación vorticial) a temperatura ambiente se detecta menos de 3% o menos de 2,5% de la proteína en una forma agregada.

La estabilidad también se puede medir, *inter alia*, determinando la formulación en partículas dentro de la formulación después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura definida. La formación de partículas se puede determinar, por ejemplo, mediante técnicas de microscopía o mediante técnicas de imágenes de microflujo.

En algunos aspectos, las formulaciones de la presente divulgación comprenden una cantidad detectable de una lipasa (por ejemplo, PLBL2). Los métodos para detectar y cuantificar la presencia y actividad de fosfolipasa se conocen en la técnica. En algunos aspectos, la fosfolipasa se detecta mediante inmunoensayo (*por ejemplo*, ELISA). En algunos aspectos, la fosfolipasa se detecta mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS).

Por consiguiente, una formulación farmacéutica (que contiene una esterasa o lipasa) se puede considerar estable si después del almacenamiento durante un período de tiempo

(por ejemplo, 6, 12, 18, 24 o 36 meses o más) a una temperatura definida (por ejemplo, 5 °C), no más de un número especificado de partículas de ácido graso $\geq 10\ \mu\text{m}$ o $\geq 25\ \mu\text{m}$ de tamaño (por ejemplo, 3000 partículas, 1000 partículas, 500 partículas, 250 partículas, 100 partículas o 50 partículas) se identifican dentro de un volumen de 2,25 mL. Por ejemplo, una formulación farmacéutica se puede considerar estable si después de 24 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 3000 partículas de ácidos grasos dentro de un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. En otro aspecto, una formulación farmacéutica se puede considerar estable si después de 24 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 1000 partículas de ácidos grasos dentro de un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de 24 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 500 partículas de ácidos grasos dentro de un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de 24 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 250 partículas de ácidos grasos dentro de un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de 24 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 150 partículas de ácidos grasos dentro de un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de 36 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 1000 partículas de ácidos grasos dentro de un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de 36 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 500 partículas de ácidos grasos dentro de un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de 36 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 250 partículas de ácidos grasos dentro de un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de 36 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 150 partículas de ácidos grasos dentro de un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de 36 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 100 partículas de ácidos grasos dentro de un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también se puede considerar estable si después de 36 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 50 partículas de ácidos grasos dentro de un volumen de 2,25 mL mediante microscopía.

La estabilidad también se puede medir, *inter alia*, determinando el porcentaje de proteína nativa de interés que queda en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura dada. El porcentaje de proteína nativa de interés se puede determinar mediante, *inter alia*, cromatografía de exclusión por tamaño (*por ejemplo*, cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-HPLC)). Un "grado aceptable de estabilidad", como se usa esa frase en la presente, significa que al menos 90% de la forma natural de la proteína se puede detectar en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura dada. En determinados aspectos, al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la forma nativa de la proteína se puede detectar en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura dada. La cantidad de tiempo definida después de la cual se mide la estabilidad puede ser de al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, al menos 30 meses, al menos 36 meses o más. La temperatura a la que se puede almacenar la formulación farmacéutica cuando se evalúa la estabilidad puede ser cualquier temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente 45 °C, *por ejemplo*, almacenamiento a aproximadamente -80 °C, aproximadamente -30 °C, aproximadamente -20 °C, aproximadamente 0 °C, aproximadamente 4 °C-8 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 37 °C o aproximadamente 45 °C.

La estabilidad también se puede medir, *inter alia*, determinando el porcentaje de proteína de interés que migra en una fracción más ácida durante el intercambio iónico ("forma ácida") que en la fracción principal de proteína ("forma de carga principal"), en donde la estabilidad es inversamente proporcional a la fracción de proteína en la forma ácida. En tanto que no se desea limitarse por la teoría, la desamidación de la proteína puede hacer que la proteína se cargue más negativamente y, por lo tanto, sea más ácida en relación con la proteína no desamidada (ver, *por ejemplo*, Robinson, N., Protein Deamidation, *PNAS*, 16 de abril de 2002, 99(8):5283-5288). El porcentaje de proteína "acidificada" se puede determinar mediante cromatografía de intercambio iónico (*por ejemplo*, cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio catiónico (CEX-HPLC) o cromatografía líquida de ultra-rendimiento de intercambio catiónico (CEX-UPLC)). Un "grado aceptable de estabilidad", como se usa esa frase en la presente, significa que como

máximo 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% o 0,1% de la proteína se puede detectar en una forma ácida en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura dada. La cantidad de tiempo definida después de la cual se mide la estabilidad puede ser de al menos 2 semanas, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, al menos 30 meses, al menos 36 meses o más. La temperatura a la que se puede almacenar la formulación farmacéutica cuando se evalúa la estabilidad puede ser cualquier temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente 45 °C, por ejemplo, almacenamiento a aproximadamente -80 °C, aproximadamente -30 °C, aproximadamente -20 °C, aproximadamente 0 °C, aproximadamente 4 °C - 8 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 25 °C o aproximadamente 45 °C.

La medición de la afinidad de unión de un anticuerpo de interés a su diana también se puede usar para evaluar la estabilidad. Por ejemplo, una formulación de la presente divulgación se puede considerar estable si, después del almacenamiento, *por ejemplo*, a -80 °C, -30 °C, -20 °C, 5 °C, 25 °C, 37 °C, 45 °C, etc. durante una cantidad de tiempo definida (por ejemplo, de 14 días a 9 meses), un anticuerpo anti-IL-4R contenido dentro de la formulación se une a hIL-4R α con una afinidad que es al menos 80%, 85%, 90%, 95% o más de la afinidad de unión del anticuerpo antes de este almacenamiento. La afinidad de unión se puede determinar por cualquier método, tal como, por ejemplo, ELISA o resonancia de plasmón. La actividad biológica se puede determinar, por ejemplo, midiendo la actividad posterior del sistema de IL-4R en presencia del anticuerpo y comparando la actividad con la actividad del sistema de IL-4R en la ausencia de anticuerpo.

Las referencias a la estabilidad de las formulaciones farmacéuticas "después" de un período de tiempo específico pretenden significar que una medición de un parámetro de estabilidad (*por ejemplo*, % de forma nativa, % de especies de HMW o % de forma ácida) se toma al final o aproximadamente al final del período de tiempo específico, y no se pretende que signifique que la formulación farmacéutica mantenga necesariamente el mismo grado de estabilidad para el parámetro medido a partir de entonces. Por ejemplo, la referencia a una estabilidad particular después de 12 meses significa que la medición de la estabilidad se tomó en o aproximadamente 12 meses después del inicio del estudio.

Recipientes y métodos de administración

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden estar contenidas dentro de cualquier recipiente adecuado para el almacenamiento de medicamentos y otras composiciones terapéuticas. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas se pueden contener dentro de un recipiente de plástico o vidrio sellado y esterilizado que tiene un volumen definido tal como un vial, ampolla, jeringa, cartucho, frasco o bolsa IV. Se pueden usar diferentes tipos de viales para contener las formulaciones de la presente divulgación que incluyen, *por ejemplo*, viales de vidrio o plástico transparentes y opacos (*por ejemplo*, ámbar). Del mismo modo, se puede usar cualquier tipo de jeringa para contener y/o administrar las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación. En algunos aspectos, la formulación farmacéutica está contenida en una jeringa precargada (PFS). En algunos aspectos, la formulación farmacéutica está contenida en una jeringa precargada con aguja integrada.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación pueden estar contenidas dentro de jeringas de "tungsteno normal" o jeringas de "bajo contenido de tungsteno". Como se apreciará por personas expertas en la técnica, el proceso de fabricación de jeringas de vidrio generalmente implica el uso de una varilla de tungsteno caliente que funciona para perforar el vidrio creando así un orificio desde el cual se pueden extraer y expulsar líquidos de la jeringa. Este proceso da como resultado la deposición de cantidades traza de tungsteno en la superficie interior de la jeringa. Se pueden usar lavados posteriores y otros pasos de procesamiento para reducir la cantidad de tungsteno en la jeringa. Como se usa en la presente, el término "tungsteno normal" significa que la jeringa contiene más de 500 partes por mil millones (ppb, por sus siglas en inglés) de tungsteno. El término "bajo contenido de tungsteno" significa que la jeringa contiene menos de 500 ppb de tungsteno. Por ejemplo, una jeringa con bajo contenido de tungsteno, de acuerdo con la presente divulgación, puede contener menos de aproximadamente 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 390, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 o menos ppb de tungsteno.

Los émbolos de goma utilizados en las jeringas y los tapones de goma utilizados para cerrar las aberturas de los viales se pueden revestir para evitar la contaminación del contenido medicinal de la jeringa o vial y/o para preservar su estabilidad. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación, de acuerdo con determinados aspectos, pueden estar contenidas dentro de una jeringa que comprende un émbolo

revestido, o dentro de un vial que se sella con un tapón de goma revestido. Por ejemplo, el émbolo o tapón se puede revestir con una película de fluorocarbono. Los ejemplos de tapones y/o émbolos revestidos adecuados para su uso con viales y jeringas que contienen las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación se mencionan, *por ejemplo*, en las Patentes de Estados Unidos Núms. 4.997.423; 5.908.686; 6.286.699; 6.645.635; y 7.226.554, cuyo contenido se incorpora como referencia en la presente en su totalidad. Los tapones y émbolos de caucho revestidos de ejemplo particulares que se pueden usar en el contexto de la presente divulgación están disponibles comercialmente con el nombre comercial "FluroTec®", disponible en West Pharmaceutical Services, Inc. (Lionville, PA). De acuerdo con determinados aspectos de la presente divulgación, las formulaciones farmacéuticas pueden estar contenidas dentro de una jeringa con bajo contenido de tungsteno que comprende un émbolo recubierto con fluorocarbono. En algunos aspectos, el recipiente es una jeringa, tal como una jeringa Ompi EZ-Fill™ o una jeringa BD Neopak™. En algunos casos, la jeringa es una jeringa de vidrio larga de 1 ml con un émbolo iWest de 1 ml, una aguja de pared delgada 27G y un protector de aguja FM30 o un protector de aguja BD260. En algunos casos, la jeringa es una jeringa de vidrio de 2,25 ml (*por ejemplo*, Nuova Ompi). En varios aspectos, la jeringa es de 0,5 ml, 0,6 ml, 0,7 ml, 0,8 ml, 0,9 ml, 1,0 ml, 1,1 ml, 1,2 ml, 1,3 ml, 1,4 ml, 1,5 ml, 1,6 ml, 1,7 ml, 1,8 ml, 1,9 ml, 2,0 ml, 2,1 ml, 2,2 ml, 2,3 ml, 2,4 ml, 2,5 ml, 2,6 ml, 2,7 ml, 2,8 ml, 2,9 ml, 3,0 ml, 3,5 ml, 4,0 ml, 4,5 ml, 5,0 ml, 5,5 ml, 6,0 ml, 6,5 ml, 2,7 ml, 7,5 ml, 8,0 ml, 8,5 ml, 9,0 ml, 9,5 ml, o una jeringa de 10 ml (*por ejemplo*, una jeringa de vidrio).

Las formulaciones farmacéuticas se pueden administrar a un paciente por vías parenterales tal como inyección (*por ejemplo*, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, etc.) o administración percutánea, mucosa, nasal, pulmonar y/u oral. Se pueden usar numerosos dispositivos de administración de pluma y/o autoinyector reutilizables para administrar por vía subcutánea las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Reino Unido), DISETRONIC™ Pen (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), HUMALOG MIX 75/25™ Pen, HUMALOG™ Pen, HUMALIN 70/30™ Pen (Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), BD™ Pen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OptiPen Starlet™ y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar solo algunos. Ejemplos de dispositivos de administración de pluma y/o autoinyector desechables que tienen

aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, la pluma SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), la FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y la KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), la PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), la EPIPEN (Dey, L.P.) y la pluma HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), por nombrar solo algunos. En algunos casos, la formulación farmacéutica está contenida en una jeringa específicamente adaptada para su uso con un autoinyector. Las inyecciones subcutáneas se pueden administrar usando una aguja de calibre 20-30 o una aguja de calibre 25-30. En algunos casos, las inyecciones subcutáneas se pueden administrar usando una aguja de calibre 25. En algunos casos, las inyecciones subcutáneas se pueden administrar usando una aguja de calibre 27. En algunos casos, las inyecciones subcutáneas se pueden administrar usando una aguja de calibre 29.

Otro tipo de dispositivo de administración puede incluir un sistema de seguridad. Estos dispositivos pueden ser relativamente baratos y operar para extender manual o automáticamente un manguito de seguridad sobre una aguja una vez que se completa la inyección. Ejemplos de sistemas de seguridad pueden incluir el dispositivo ERIS de West Pharmaceutical o el dispositivo UltraSafe de Becton Dickinson. Además, también se contempla en la presente el uso de un dispositivo de gran volumen ("LVD"), o inyector de bolo, para administrar las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación. En algunos casos, el LVD o inyector de bolo se puede configurar para inyectar un medicamento en un paciente. Por ejemplo, un inyector de LVD o bolo se puede configurar para administrar un volumen "grande" de medicamento (típicamente de aproximadamente 2 mL a aproximadamente 10 mL).

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación también pueden estar contenidas en una forma de dosificación unitaria. El término "forma de dosificación unitaria", como se usa en la presente, se refiere a una unidad físicamente discreta adecuada como una dosificación unitaria para el paciente a tratar, cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador, diluyente o excipiente farmacéutico requerido. En varios aspectos, la forma de dosificación unitaria está contenida dentro de un recipiente como se analiza en la presente. Los niveles de dosificación reales del ingrediente activo (por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-4R) en las formulaciones de la presente divulgación pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración

particulares, sin efecto adverso para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente divulgación empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales utilizados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general e historial médico previo del paciente que se está tratando, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. El término “diluyente”, como se usa en la presente, se refiere a una solución adecuada para alterar o lograr una concentración o concentraciones ejemplares o apropiadas como se describe en la presente.

En varios aspectos, la forma de dosificación unitaria contiene una cantidad del ingrediente activo (por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-4R) destinado a un solo uso. En varios aspectos, la cantidad del ingrediente activo en la forma de dosificación unitaria es de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 5000 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1000 mg, y de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 400 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 250 mg a aproximadamente 350 mg, de aproximadamente 125 mg a aproximadamente 175 mg, de aproximadamente 275 mg a aproximadamente 325 mg, o rangos o intervalos de los mismos. Por ejemplo, se pretende que se incluyan intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente (o valores contenidos dentro de los intervalos mencionados anteriormente) como límites superior y/o inferior. En un aspecto particular, la formulación a menudo se suministra como un líquido en forma de dosificación unitaria. En algunos aspectos, la forma de dosificación unitaria contiene aproximadamente 100 mg del ingrediente activo. En algunos aspectos, la forma de dosificación unitaria contiene aproximadamente 150 mg. En algunos aspectos, la forma de dosificación unitaria contiene aproximadamente 200 mg. En algunos aspectos, la forma de dosificación unitaria contiene aproximadamente 300 mg. En algunos aspectos, la forma de dosificación unitaria contiene aproximadamente 350 mg. En algunos aspectos, la forma de dosificación unitaria contiene aproximadamente 600 mg. En algunos aspectos, una forma de dosificación unitaria de acuerdo con la presente divulgación es adecuada para administración subcutánea a un paciente.

La presente divulgación también incluye métodos para preparar una forma de dosificación unitaria. En un aspecto, un método para preparar una forma de dosificación

unitaria farmacéutica incluye combinar la formulación de cualquiera de los aspectos anteriores en un recipiente adecuado (*por ejemplo*, aquellos recipientes analizados en la presente).

Usos terapéuticos de las formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de la presente divulgación que comprenden un anticuerpo anti-IL-4R son útiles, *entre otros*, para el tratamiento, prevención y/o mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado con la actividad de IL-4R.

Los métodos terapéuticos de la presente divulgación comprenden administrar a un sujeto cualquier formulación que comprenda un anticuerpo anti-hIL-4R como se divulga en la presente. El sujeto al que se administra la formulación farmacéutica puede ser, *por ejemplo*, cualquier animal humano o no humano que necesite este tratamiento, prevención y/o mejora, o que de otro modo se beneficiaría de la inhibición o atenuación de la actividad mediada por IL-4R y/o IL-4R. La presente divulgación incluye además el uso de cualquiera de las formulaciones farmacéuticas divulgadas en la presente en la fabricación de un medicamento para el tratamiento, prevención y/o mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado con la actividad de IL-4R.

En algunos aspectos, la enfermedad o trastorno asociado con la actividad de IL-4R es una condición inflamatoria, condición alérgica, trastorno pulmonar/respiratorio, trastorno gastrointestinal o trastorno dermatológico. En algunos aspectos, la enfermedad o trastorno es un trastorno inflamatorio tipo 2. En algunos aspectos, la enfermedad o trastorno es una enfermedad atópica. Los ejemplos no limitantes de enfermedades y trastornos asociados con la actividad de IL-4R incluyen alergia (*por ejemplo*, alergia a los alimentos, alergia ambiental, alergia a la hierba, alergia al maní, alergia a los lácteos), reacciones alérgicas, aspergilosis broncopulmonar alérgica, rinosinusitis fúngica alérgica (AFRS), rinitis alérgica, alopecia areata, asma (incluida asma leve, moderada o grave o asma persistente), artritis (incluida artritis séptica), dermatitis atópica (incluida dermatitis atópica moderada o grave), dermatitis atópica de manos y pies, queratoconjuntivitis atópica, anemia hemolítica autoinmune, síndrome linfoproliferativo autoinmune, uveítis autoinmune, esófago de Barrett, hiperplasia benigna de próstata, bronquiectasia, penfigoide ampolloso, síndrome de Churg-Strauss, urticaria idiopática crónica, urticaria inducible por frío, urticaria inducible crónica, urticaria espontánea crónica (UCE), dermatitis de contacto (*por ejemplo*, dermatitis de contacto alérgica), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), esofagitis eosinofílica, gastroenteritis eosinofílica, enfermedad de Grave, herpesiforme, cicatrización

hipertrófica, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedad de Kawasaki, poliposis nasal, nefrosis, síndrome de Netherton, preeclampsia, prurigo nodular, prurito (*por ejemplo*, prurito crónico de origen desconocido), rinitis (*por ejemplo*, rinitis alérgica), rinosinusitis (*por ejemplo*, rinosinusitis fúngica alérgica, rinosinusitis crónica con o sin poliposis nasal), esclerodermia, enfermedad de células falciformes, síndrome de Sjogren, tuberculosis, colitis ulcerosa y enfermedad de Whipple.

En algunos aspectos, la presente divulgación proporciona kits que comprenden una formulación farmacéutica (*por ejemplo*, un recipiente con la formulación o una forma de dosificación unitaria), como se discute en la presente, y empaque o etiquetado (*por ejemplo*, un prospecto) con instrucciones para usar la formulación farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, como se analizó anteriormente. En algunos casos, las instrucciones proporcionan el uso de una forma de dosificación unitaria, como se analiza en la presente, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

Un resumen de las secuencias y las SEQ ID NO correspondientes a las que se hace referencia en la presente se muestra en la Tabla 1, más adelante.

Tabla 1. Listado informal de secuencias

SEQ ID NO	Secuencia	Descripción
1	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLSITIRPRYYGLDVWGQGT TTVTS	Secuencia de aminoácidos de HCVR de dupilumab
2	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLYSIGYNYLDWYLQKSGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGFYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIK	Secuencia de aminoácidos de LCVR de dupilumab
3	GFTFRDYA	Secuencia de aminoácidos de HCDR1 de dupilumab
4	ISGSGGNT	Secuencia de aminoácidos de HCDR2 de dupilumab
5	AKDRLSITIRPRYYGLDV	Secuencia de aminoácidos de HCDR3 de dupilumab
6	QSLYSIGYNY	Secuencia de aminoácidos de LCDR1 de dupilumab
7	LGS	Secuencia de aminoácidos de LCDR2 de dupilumab
8	MQALQTPYT	Secuencia de aminoácidos de LCDR3 de dupilumab
9	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLSITIRPRYYGLDVWGQGT TTVTSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLGLK	Secuencia de aminoácidos de cadena pesada de dupilumab
10	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLYSIGYNYLDWYLQKSGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGFYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Secuencia de aminoácidos de cadena ligera de dupilumab
11	MKVLQEPCTCVSDYMSISTCEWK MNGPTNCSTELRLLYQLVFLSEAHTCIPENNGGAGCVCHLLMDDVVSADNYTLDLWAGQQLWKGSFKPSEHV KPRAPGNLTVHTNVSDTLTLTWSNPYPDPNYLYNHLTYAVNIWSENDPADFRIYNVTYLEPSLRIAASTLKS GISYRARVRAWAQCYNNTTWSEWSPSTKWHNSYREPFEQH	IL-4R α humano
12	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSN SYLAWYQQKPGQAPRLIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-39
13	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-40

14	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IFGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPP WTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-41
15	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVNSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP PWTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-42
16	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVNSSYLAWYQQKPGQAPRL LIFGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSP PWTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-43
17	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPP WTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-44
18	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDHSP WTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-45
19	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSAG WTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-46
20	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDHSA GWTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-47
21	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVNSSYLAWYQQKPGQAPRL LIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDHSP PWTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-48
22	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDHSP WTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-49
23	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IFGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDHSP WTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-50
24	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDHSA GWTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-51
25	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVNSSYLAWYQQKPGQAPRL LIFGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDHSA GWTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-52
26	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVNSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDHS AGWTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-53
27	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IFGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDHSA GWTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-54
28	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDHSA GWTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-55
29	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVNSSYLAWYQQKPGQAPRL LIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDHSA GWTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-56
30	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRL IFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPP WTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-57
31	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVNSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYDHS AGWTFGQGGTKVEIK	SCB-VL-58

32	EVQLVESGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFDYWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-59
33	EVQLVQSGGGLVQPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFDYWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-60
34	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFDYWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-61
35	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFDYWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-62
36	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRYYFDYWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-63
37	EVQLVESGGGLVQPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFDYWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-64
38	EVQLVESGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFDYWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-65
39	EVQLVQSGGGLVQPGGSRLRLSCAASGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFDYWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-66
40	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRYYFDYWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-67
41	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFPWWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-68
42	EVQLVESGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFPWWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-69
43	EVQLVQSGGGLVQPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFPWWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-70
44	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFPWWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-71
45	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFPWWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-72
46	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRYYFPWWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-73
47	EVQLVQSGGGLVHPGRSLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFDYWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-74
48	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLTACAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGL EWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDM AVYYCARGRYYFDYWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-75
49	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEHFWVRQAPGKGL EWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDM AVYYCARGRYYFDYWGGQGLTVTVSS	SCB-VH-76

50	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGEGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFDYWGQGTLLTVSS	SCB-VH-77
51	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDEAKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFDYWGQGTLLTVSS	SCB-VH-78
52	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFDYWGQGTLLTVSS	SCB-VH-79
53	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFDDYAMFWVRQAPGKGL EWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDM AVYYCARGRYYFDYWGQGTLLTVSS	SCB-VH-80
54	EVQLVQSGGGLVQPGGSRLRLSCAASGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRYYFPWWGQGTLLTVSS	SCB-VH-81
55	EVQLVESGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRYYFPWWGQGTLLTVSS	SCB-VH-82
56	EVQLVESGGGLVQPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRYYFPWWGQGTLLTVSS	SCB-VH-83
57	EVQLVESGGGLVQPGGSRLRLSCAASGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRYYFPWWGQGTLLTVSS	SCB-VH-84
58	EVQLVESGGGLVQPGGSRLRLSCAASGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFPWWGQGTLLTVSS	SCB-VH-85
59	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAASGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRYYFPWWGQGTLLTVSS	SCB-VH-86
60	EVQLVQSGGGLVQPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRYYFPWWGQGTLLTVSS	SCB-VH-87
61	EVQLVESGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRYYFPWWGQGTLLTVSS	SCB-VH-88
62	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRYYFPWWGQGTLLTVSS	SCB-VH-89
63	EVQLVESGGGLVQPGGSRLRLSCAASGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFPWWGQGTLLTVSS	SCB-VH-90
64	EVQLVESGGGLVQPGGSRLRLSCAASGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRYYFDYWGQGTLLTVSS	SCB-VH-91
65	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDMA VYYCARGRYYFDYWGQGTLLTVSS	SCB-VH-92
66	EVQLVESGGGLVQPGGSRLRLSCAASGFTFSRNAMEFWVRQAPGKGLE WVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAV YYCARGRYYFPWWGQGTLLTVSS	SCB-VH-93
67	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTDRDTSTSTVYMELSSLRSDDT AVYYCARGKWWLDYWGKGTLLTVSS	MEDI-1-VH

68	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSLSANYVFGTGTKLTVL	MEDI-1-VL
69	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYNWGKGTLLTVSS	MEDI-2-VH
70	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSQPPNPLFGTGTKLTVL	MEDI-2-VL
71	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKLLKNPWGKGTLLTVSS	MEDI-3-VH
72	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWFG TPASNYVFGTGTKLTVL	MEDI-3-VL
73	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYNWGKGTLLTVSS	MEDI-4-VH
74	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSSPPQPIFGTGTKLTVL	MEDI-4-VL
75	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYDWGKGTLLTVSS	MEDI-5-VH
76	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSSPPQPIFGTGTKLTVL	MEDI-5-VL
77	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLLTVSS	MEDI-6-VH
78	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSTTYHPIFGTGTKLTVL	MEDI-6-VL
79	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWWQYWGKGTLLTVSS	MEDI-7-VH
80	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSSPPQPIFGTGTKLTVL	MEDI-7-VL
81	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWWQYWGKGTLLTVSS	MEDI-8-VH
82	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSTTYHPIFGTGTKLTVL	MEDI-8-VL
83	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYNWGKGTLLTVSS	MEDI-9-VH
84	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSTMYPLFGTGTKLTVL	MEDI-9-VL
85	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYDWGKGTLLTVSS	MEDI-10-VH

86	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD STVLTPIFGTGKLTVL	MEDI-10-VL
87	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWFYDWGKGTLVTVSS	MEDI-11-VH
88	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSPSMIPLFGTGKLTVL	MEDI-11-VL
89	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWFYDWGKGTLVTVSS	MEDI-12-VH
90	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSTMYPLFGTGKLTVL	MEDI-12-VL
91	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYDWGKGTLVTVSS	MEDI-13-VH
92	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSTLQPLFGTGKLTVL	MEDI-13-VL
93	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYNWGKGTLVTVSS	MEDI-14-VH
94	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSPPTKPLFGTGKLTVL	MEDI-14-VL
95	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYNWGKGTLVTVSS	MEDI-15-VH
96	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSTHRHPLFGTGKLTVL	MEDI-15-VL
97	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYNWGKGTLVTVSS	MEDI-16-VH
98	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSTTYHPIFGTGKLTVL	MEDI-16-VL
99	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWQHWGKGTLVTVSS	MEDI-17-VH
100	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSPVDRPIFGTGKLTVL	MEDI-17-VL
101	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWQHWGKGTLVTVSS	MEDI-18-VH
102	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD TSTPMPVFGTGKLTVL	MEDI-18-VL
103	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWQHWGKGTLVTVSS	MEDI-19-VH

104	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD STTYHPIFGTGKLTVL	MEDI-19-VL
105	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLLTVSS	MEDI-20-VH
106	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD STVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-20-VL
107	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLLTVSS	MEDI-21-VH
108	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYFCGTWDT TVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-21-VL
109	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLLTVSS	MEDI-22-VH
110	QPVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYFCGTWDT TVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-22-VL
111	QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLLTVSS	MEDI-23-VH
112	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPPGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD STVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-23-VL
113	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPRGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLLTVSS	MEDI-24-VH
114	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYFCGTWDT TVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-24-VL
115	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPRGGSTSYAQKFQGRVSMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLLTVSS	MEDI-25-VH
116	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTTATLAITGLQTGDEADYYCGTWVT STVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-25-VL
117	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLLTVSS	MEDI-26-VH
118	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYFCGTWDT TVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-26-VL
119	QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRPED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTQTVSS	MEDI-27-VH
120	QSVLTQPPLVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQRLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWD STVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-27-VL
121	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGNGTLTVSS	MEDI-28-VH

122	LPVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSSIGNSYVSWYQQLPGAAPKLL IYDNNKRPSGIPDRFSGFRSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWDTSP VWEWPFGTGTKLTVL	MEDI-28-VL
123	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTRVTVSS	MEDI-29-VH
124	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWDT SPVWEWPFGTGTKLTVL	MEDI-29-VL
125	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLVTVSS	MEDI-30-VH
126	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQRLPGAAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWDT STVWEWPFGTGTKLTVL	MEDI-30-VL
127	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLVTVSS	MEDI-31-VH
128	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSSIGNSYVSWYQQLPGTAPKL IYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWATS PVWEWPFGTGTKLTVL	MEDI-31-VL
129	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLVTVSS	MEDI-32-VH
130	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYFCGTWDT STVWEWPFGTGTKLTVL	MEDI-32-VL
131	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLVTVSS	MEDI-33-VH
132	QSALTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYFCGTWDT STVWEWPFGTGTKLTVL	MEDI-33-VL
133	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVSMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLVTVSS	MEDI-34-VH
134	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYFCGTWDT STVWEWPFGTGTKLTVL	MEDI-34-VL
135	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLVTVSS	MEDI-35-VH
136	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWDT SPVWEWPFGTGTKLTVL	MEDI-35-VL
137	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLVTVSS	MEDI-36-VH
138	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWDS STVWEWPFGTGTKLTVL	MEDI-36-VL
139	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPRGGSTSYAQKFQGRVAMTRDTSTSTVYMELSSLRPED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTLVTVSS	MEDI-37-VH

140	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWDT SPVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-37-VL
141	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGKYWMYDWGKGTLLTVSS	MEDI-38-VH
142	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYFCGTWDT TVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-38-VL
143	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPRGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGKYWMYDWGKGTLLTVSS	MEDI-39-VH
144	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWDT STAWEWPFGTGKLTVL	MEDI-39-VL
145	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGKYWMYDWGKGTLLTVSS	MEDI-40-VH
146	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWDS STVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-40-VL
147	QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRPED AVYYCARGKYWMYDWGKGTLLTVSSG	MEDI-41-VH
148	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSTNIGNSYVSWYQRLPGTAPKL LIYDNNKRPPGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWDT STVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-41-VL
149	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVARQAPGQG LEWVGIIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSGD AVYYCARGKYWMYDWGKGTLLTVSS	MEDI-42-VH
150	QAVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQRLPGAAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGLQTGDEADYYCGTWDT STGWEPFGTGKLTVL	MEDI-42-VL
151	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHVVRQAPGQG LEWMGIINPRGGSTSYAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED AVYYCARGKYWMYDWGKGTLLTVSS	MEDI-37GL-VH
152	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSIGNSYVSWYQQLPGTAPKL LIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCGTWDT SPVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-37GL-VL
153	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE WWSAISSGGGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKLRRYFDYWGQGTLLTVSS	AJOU-1-VH
154	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE WWSAISSGGSSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLHLQMNSLRAEDTAV YYCARGPQRSATAVFDYWGQGTLLTVSS	AJOU-2-VH
155	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE WWSWISPNSGNIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARRPLSAASHSSYYNAMDVWGQGTLLTVSS	AJOU-3-VH
156	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWVRQAPGKGLE WWSLISHSGSNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARPHRAFDYWGQGTLLTVSS	AJOU-4-VH
157	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE WWSGISHSGSIYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCARPHRAFDYWGQGTLLTVSS	AJOU-5-VH

158	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE WVSGISHGNGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCAKTGRHFDYWGQGTLVTVSS	AJOU-6-VH
159	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE WVSSISPSGSSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA YYCARSYRAFDYWGQGTLVTVSS	AJOU-7-VH
160	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISPSGSSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA YYCARAKRAFDYWGQGTLVTVSS	AJOU-8-VH
161	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISPSGSGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA YYCAKFRHFDYWGQGTLVTVSS	AJOU-9-VH
162	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE WVSAISSGGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARVHRAFDYWGQGTLVTVSS	AJOU-10-VH
163	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE WVSAITSSGRSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA YYCARVHRAFDYWGQGTLVTVSS	AJOU-69-VH
164	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE WVSAITSSGANIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA YYCARVHRAFDYWGQGTLVTVSS	AJOU-70-VH
165	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE WVSAITSSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA YYCARVHRAFDYWGQGTLVTVSS	AJOU-71-VH
166	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGKGLE WVSAITAGGSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARVHRAFDYWGQGTLVTVSS	AJOU-72-VH
167	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRHAMAWVRQAPGKGLE WVSAITSSGRSIYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTA YYCARVHRAFDYWGQGTLVTVSS	AJOU-83-VH
168	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNNYVNWYQQLPGTAPKL LIYDN SHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDA SLSA YVFGGGTKLTVL	AJOU-33-VL
169	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNNVSWYQQLPGTAPKLL IYANSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDDS LSA YVFGGGTKLTVL	AJOU-34-VL
170	QSVLTQPPSAPGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNVSWYQQLPGTAPKLL IYDDSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCDAWDDS LSA YVFGGGTKLTVL	AJOU-35-VL
171	QSVLTQPPSASGTPGQRVTLSCTGSSSNIGSNVSWYQQLPGTAPKL LIYADSQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDD SLSGYVFGGGTKLTVL	AJOU-36-VL
172	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSSSSSNIGSNVSWYQQLPGTAPKLLI YSDSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDYS SA YVFGGGTKLTVL	AJOU-37-VL
173	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGNNTVSWYQQLPGTAPKLL IYDN SHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYCGSWDYS LSA YVFGGGTKLTVL	AJOU-38-VL
174	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGNNDVNWYQQLPGTAPKL LIYYDSQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDA SLSA YVFGGGTKLTVL	AJOU-39-VL
175	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNVSWYQQLPGTAPKLL IYYDNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDDS LNGYVFGGGTKLTVL	AJOU-40-VL

176	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNAVWYQQLPGTAPKLLIYDDSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDYSLSAYVFGGGTKLTVL	AJOU-41-VL
177	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTFNWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDYSLSGYVLGGGTKLTVL	AJOU-42-VL
178	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTFNWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDYSLSGYVLGGGTKLTVL	AJOU-77-VL
179	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTFNWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDYSLRGYVLGGGTKLTVL	AJOU-78-VL
180	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTFNWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGYWDYSLSGYVLGGGTKLTVL	AJOU-79-VL
181	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTFNWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDYSLSGYVLGGGTKLTVL	AJOU-80-VL
182	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSANSRTDGFNWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDYSLSGYVLGGGTKLTVLG	AJOU-86-VL
183	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSAQFGSRDNFNWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDYSLSGYVLGGGTKLTVLG	AJOU-87-VL
184	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSTKQMHNYQFNWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDYSLSGYVLGGGTKLTVLG	AJOU-88-VL
185	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLLRGENLQFNWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDYSLSGYVLGGGTKLTVLG	AJOU-89-VL
186	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSPLFPDSGSFNWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDYSLSGYVLGGGTKLTVLG	AJOU-90-VL
187	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSAALDLSFSFNWYQQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDYSLSGYVLGGGTKLTVLG	AJOU-91-VL
188	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMGWISVYNGKNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTTTAYMEMRSLRSDDTAVYYCARGSGYDLDYWGQGTLLVSVSS	REGN-VH-3
189	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFWMTWVRQAPGKGLWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPGRMTVRGGIRYYYGMDVWGQGTITVTVSS	REGN-VH-19
190	EVKLAESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMNWVRQAPGKGLEWMVANIKQDGSDKYYVDSVKGRFTISRDNKNSLYLQLNSLIAEDTAVYYCARDRGVRPPRGAFDIWGQGTMTVTVSS	REGN-VH-35
191	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNSYGISWVRQAPGQGLEWMGWIRTYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDEARIVVAGTTPYYYGMDVWGQGTITVTVSS	REGN-VH-51
192	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTISDHYSWVRQAPGKGLWISYISSSGSKIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTRQLVGDYWGQGTITVTVSS	REGN-VH-67
193	EVQLVESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFDNYAMHWVRQAPGKGLEWVSGIRWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKEGGYSGYRPGPFDDYWGQGTITVTVSS	REGN-VH-83

194	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYGISWVRQAPGQGL EWMGWISVYNGHTNYAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD TAVYYCARGSGYDFDSWGQGLTVTVSS	REGN-VH-99
195	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASRYTFTSYDINWVRQATGQGL EWMGWMPNPNNGNTGYAQKFQGRVTMTNTSTSTAYMELSSLRSE DTAVYYCARVRRFFDYWGQGLTVTVSS	REGN-VH-115
196	QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCKASGYFTFTNYGISWVRQAPGQGLE WMGWISVYNGNINIAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMDLRSLRSDDT AVYYCARGSGYDFDYWGQGLTVTVSS	REGN-VH-147
197	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKDSAYTFNRYGISWVRQAPGQGL EWMGWISAYTGNTVYAQKLQGRVTMTTDTNSTSTAYMELRSLRSD TAVYYCARDKSIFGVVRGFDYWGQGLTVTVSS	REGN-VH-163
198	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQGIRNALGWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIFSSLQPEDFATYYCLQDFNYP YTFGQGTKLEIK	REGN-VL-11
199	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGVSSWLAWYQQKPGNAPKL LISAASSIQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQANSFPL TFGGGKVEIK	REGN-VL-27
200	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQGISSWLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSFQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFCQQANSFPL TFGGGTTVEIK	REGN-VL-43
201	DIQMTQSPSSVSASVGDRVITTCRASQDISIWLAWYQQSPGKAPKLLI NVASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLQPEDFVITYCQQANSFPI TFGQGTRLATK	REGN-VL-59
202	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLI FAASTLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQLNSYPLT FGGGTKVEIR	REGN-VL-75
203	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVNYNLAWYQHKPGQAPRL LIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDFAVYYCQQYNNW PLTFGGGKVEIK	REGN-VL-91
204	AIQMTQSSSSLSASVGDRVITTCRASQAIRNALGWYQQKPGKAPKVL IYAASSLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCLQDYDYPY TFGQGTKLEIK	REGN-VL-107
205	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITTCWASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLI YAASLHSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCHQLKSYPI FGQGTREIK	REGN-VL-123
206	AIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDIRNALGWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAAYYCLQDYNYP YTFGQGTKLEIK	REGN-VL-155
207	EIVMTQSPVTLSPGERATLPCRASQSVSSSLAWYQQKAGQSPRLLI YGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISNLQSEDFAVYYCQQYNNWP LTFGGGKVEIK	REGN-VL-171

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proponen para proporcionar a aquellos expertos en la técnica una divulgación completa de cómo preparar y usar los métodos y composiciones de la invención, y no se propone que limiten el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han hecho esfuerzos para asegurar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero se deben tener en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en peso, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión está en o cerca de la atmosférica.

Determinación de partículas subvisibles

Para la determinación de partículas subvisibles, métodos adecuados incluyen "Método 1" (Prueba de recuento de partículas de oscurecimiento por luz) y "Método 2" (Prueba de recuento de partículas microscópicas). Usando oscurecimiento por luz, el requisito de la FDA para partículas subvisibles en el fármaco parenteral es ≤ 6.000 partículas por recipiente para partículas ≥ 10 micrómetros de diámetro, y ≤ 600 partículas por recipiente para partículas ≥ 25 micrómetros de diámetro. Usando el método microscópico, el requisito de la FDA para partículas subvisibles en el fármaco parenteral es ≤ 3.000 partículas por recipiente para partículas ≥ 10 micrómetros de diámetro, y ≤ 300 partículas por recipiente para partículas ≥ 25 micrómetros de diámetro. Actualmente, no existe ninguna especificación para partículas de menos de 10 micrómetros de diámetro, pero la FDA ha solicitado que se midan partículas de 2 a 10 micrómetros.

Las partículas de más de 1 micrómetro de diámetro se midieron usando oscurecimiento por luz HIAC y formación de imágenes de microflujo de Brightwell (MFI). HIAC combina el oscurecimiento por luz con la dispersión de luz láser que permite la detección y el recuento de partículas que varía de 500 nm-350 μ m en una corriente de fluido en movimiento. Las partículas se dimensionaron en función de la respuesta de voltaje generada en el detector y se clasificaron en intervalos de tamaño predeterminados en función de la respuesta de voltaje.

Para los ensayos de HIAC, las muestras de una línea de fabricación (lotes de GMP) que contenían un anticuerpo monoclonal a 150 mg/mL se agruparon hasta un volumen total de 25 mL. Para cada muestra combinada, se realizaron tres lecturas de cinco mililitros por muestra. Las muestras de laboratorio de la misma formulación de anticuerpo de 150 mg/ml también se examinaron mediante HIAC. Se agruparon muestras de al menos tres viales (2,5 mL/vial), siete jeringas de 1 mL (1,14 mL/jeringa) o cinco jeringas de 2,25mL (2 mL/jeringa), y se realizaron tres lecturas de un mililitro por lectura. Se utilizaron los instrumentos HIAC 9703 y HIAC 8000A (Hach Company, Loveland, Colo.) utilizando la sonda HRLD 400 (que lee hasta 18.000 recuentos acumulativos por ml) y la sonda MC05 (que lee hasta 10.000 recuentos acumulativos por ml) respectivamente, para hacer las lecturas de oscurecimiento por luz.

El método de MFI usó menos material (*es decir*, 1 ml de formulación, o 1 vial o jeringa de estabilidad) que el oscurecimiento por luz HIAC y produjo números de partículas más altos que HIAC. Dado que MFI se basa en microscopía, ese método fue más sensible a las

partículas de proteína translúcidas y fue capaz de diferenciar las gotas de aceite de silicona/burbujas de aire de las partículas de proteína para muestras de jeringa precargadas. El MFI se realizó en una muestra de laboratorio que contenía 150 mg/mL de un anticuerpo monoclonal (como en los análisis HIAC). Para MFI, se realizó una lectura de un mililitro por lectura.

Determinación de degradación de polisorbato

La degradación de polisorbato se examinó usando uno o más de varios métodos. El primer método empleó un ensayo colorimétrico enzimático para cuantificar ácidos grasos no esterificados (NEFA). El kit NEFA-HR(2) (Wako Diagnostics, Richmond, Va.) se utilizó para detectar ácidos grasos en la sustancia de fármaco formulada que contiene polisorbato. En resumen, las muestras se combinaron con ATP y coenzima A (CoA) en presencia de acil-CoA sintetasa (ACS). Los ácidos grasos disponibles (libres) reaccionaron con la CoA para formar acil-CoA. El producto de acil-CoA se hizo reaccionar con oxígeno y acil-CoA oxidasa para producir trans-2,3-deshidroacil-CoA y peróxido de hidrógeno. La peroxidasa catalizó la reacción del peróxido de hidrógeno con 4-aminoantipirina y 3-metil-N-etil-N-(P-hidroxietil)-anilina para formar un pigmento azul púrpura (absorbancia máxima a 550 nm). La cantidad de NEFA en la muestra es proporcional a la cantidad de pigmento. Para una descripción detallada del ensayo colorimétrico de NEFA, ver Duncombe, "The Colorimetric Micro-Determination of Non- Esterified Fatty Acids in Plasma," Clin Chim Acta. 9:122-5 (1964); Itaya y Ui, "Colorimetric Determination of Free Fatty Acids in Biological Fluids," J. Lipid Res. 6:16-20 (1965); Novak, M., "Colorimetric Ultramicro Method for the Determination of Free Fatty Acids," J. Lipid Res. 6:431-3 (1965); y Elphick, M. C., "Modified Colorimetric Ultramicro Method for Estimating NEFA in Serum," J. Clin. Pathol. 21(5):567-70 (1968).

La muestra de prueba que contiene la proteína de interés (y el contaminante de proteína de célula hospedera putativa) se aplicó a un filtro de corte de peso molecular de 10 kDa. El producto retenido se recuperó en histidina 10 mM (pH 6,0) a más de 100 g/L de proteína y se enriqueció con polisorbato para proporcionar una muestra de prueba de proteína 100 g/L, polisorbato al 0,8% (p/v), histidina 10 mM, pH 6,0 (t_{inicial}). La muestra de prueba se sometió a 45° C durante 44 horas (t_{final}). Algunas muestras se enriquecieron con ácido oleico para evaluar la eficiencia de recuperación de NEFA en las muestras. El porcentaje de degradación de polisorbato se calculó como sigue:

$$\frac{([NEFA]_{t_{final}} - [NEFA]_{t_{inicial}})}{[polisorbato] - [NEFA]_{t_{final}}} \times 100\%$$

El segundo método para determinar la degradación de polisorbato se basó en espectroscopía de masas. Mediante análisis LC/MS, este ensayo permitió la medición y comparación del porcentaje inicial de ésteres y el porcentaje restante de ésteres en polisorbatos después de la incubación a 45° C en diferentes puntos de tiempo. Se incluyeron MAb1 producidos de acuerdo con el proceso 6 (sin HIC y con actividad de degradación de PS) y mAb1 producidos de acuerdo con el proceso 3 (con paso de HTC y sin actividad de degradación de PS) (ver Ejemplo 4 y Tabla 9) como controles negativos y positivos, respectivamente.

En resumen, se aplicaron 15 mg de muestra de anticuerpo (del orden de 5-10 mg/mL, o 7 mg/mL ± 1,5 mg/mL) a un ultrafiltro (Amicon Ultra 50K, Millipore, Billerica, Mass.) y se centrifugó a 14.000 µg durante 15 minutos o hasta que el volumen restante estuvo ligeramente por debajo de la marca de 100 µL en el dispositivo. Se añadió 1 µL de polisorbato al 10% al filtro de rotación con la proteína concentrada seguido de agitación en vórtice. La muestra se recuperó mediante centrifugación invertida durante 5 minutos a 1000 g para recuperar el volumen completo en el tubo de recolección.

Se midió el volumen recuperado y se calculó la concentración de polisorbato. 1 µL de cada muestra recuperada se diluyó 100 veces en un tubo separado y se midió la concentración de proteína con Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, Delaware). Luego, las muestras se diluyeron en amortiguador de histidina (10 mM, pH 6,0) y stock de polisorbato para lograr una concentración de proteína de 150 mg/mL y una concentración de polisorbato de 0,2% (p/p).

La muestra de tiempo cero (TO) (2 µL) se reservó de cada muestra y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Las muestras que se van a analizar se sellaron bajo argón y se incubaron a 45 °C para inducir la degradación, y se retiraron para la prueba en los puntos de tiempo prescritos. Se tomaron 2 µL de cada una de las muestras en cada punto de tiempo y se diluyeron con agua hasta 100 µL. Cada muestra de punto de tiempo diluida se almacenó a -80 °C de almacenamiento. Después de la recolección de cada punto de tiempo, el espacio de cabeza del tubo de muestra se llenó con gas argón, el recipiente de muestra se volvió a sellar y la muestra se devolvió a la incubadora para reanudar la incubación.

Las muestras de punto de tiempo se analizaron usando una columna de intercambio

aniónico (columna Oasis MAX, 30 μ m, 2,1 mm X 20 mm; Waters Corporation, Milford, Mass.) seguido a t=5 minutos con cromatografía de fase inversa (columna ACQUITY UPLC® BEH 130 C4, 1,7 μ m, 2,1 mm X 50 mm; Waters Corporation, Milford, Mass.). La salida de fase inversa se conectó a un espectrómetro de masas (espectrómetro de masas Thermo Q-Exactive; Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, Del.). Las condiciones cromatográficas se describen en la tabla 2.

El sistema se equilibró con 99% de fase móvil A (ácido fórmico al 0,1% en agua) a una velocidad de flujo de 0,1 mL/minuto durante 40 minutos antes de la primera inyección. Se utilizó agua como una inyección de blanco. Los parámetros del espectrómetro de masas fueron como sigue: intervalo de masa 150-2000 m/z ; temperatura de calentador a 250 °C; voltaje 3,8 kV; gas de impulsión 40; gas auxiliar 10; temperatura capilar 350 °C; y lente S 50. Cuando no fue necesaria la identificación basada en espectrometría de masas, se utilizó detección de aerosol cargado (CAD), un caudal analítico y una temperatura de desolvatación a 100 °C (Lisa et al., "Quantitation of triacyl glycerols from plant oils using loaded aerosol detection with gradient compensation," J Chromatogr A. 1176(1-2): 13 5-42 (2007); Plante et al., "The use of loaded aerosol detection with HPLC for the measurement of lipids," Methods Mol Biol. 579:469-82 (2009)).

Tabla 2. Condiciones de cromatografía para determinación de degradación de polisorbato

Sistema UPLC	Waters ACQUITY UPLC Clase I/Dionex UltiMate 3000				
Fase móvil	A: ácido fórmico al 0,1% en agua B: ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo				
Columna	Waters Oasis ® MAC 30 μ m, 2,1 x 20 mm, Pieza núm. 186002052 ACQUITY UPLC ® BEH130 Columna C4, 1,7 μ m, 2,1 mm x 50 mm de Waters, Pieza núm. 186004496				
Columna Temperatura	40° C $\pm$ 1° C				
Temperatura de automuestreador	5 °C $\pm$ 2 °C				
Volumen de inyección	20,0 μ l				
	Tiempo (minuto)	% A	%B	Flujo (μ L/minuto)	Curva
Gradiente	Inicial	99,0	1,0	100	Inicial
	1,0	99,0	1,0	100	Lineal

	5,0	85,0	15,0	100	Lineal
	40,0	1,0	99,0	100	Lineal
	45,0	1,0	99,0	100	Lineal
	45,1	99,0	1,0	100	Lineal
	50,0	99,0	10	100	Lineal

Para estimar la cantidad total de polioxietileno (POE), el cromatograma de masas se extrajo utilizando el intervalo de 300-800 m/z para evitar la interferencia de proteínas degradadas, y se integró la agrupación de picos de aproximadamente 8-15 minutos. Para los cromatogramas CAD, la primera agrupación de picos de POE se integraron directamente a partir de aproximadamente 8-15 minutos (nuevamente, el tiempo de retención puede cambiar ligeramente). Cuando hubo otras especies que coeluyeron con el POE, el punto de partida se ajustó para minimizar su impacto en el área de pico.

Para estimar la cantidad total de ésteres de POE, el cromatograma de masas se extrajo utilizando el intervalo de 300-2000 m/z , y se integró la agrupación de picos de aproximadamente 17-40 minutos. Para los cromatogramas CAD, la agrupación de picos de ésteres de POE se integró directamente a partir de aproximadamente 17-40 minutos.

El porcentaje de ésteres de POE se calculó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\frac{\text{área de pico de ésteres de POE}}{\text{área de pico de ésteres de POE} + \text{área de POE}} \times 100\%$$

El porcentaje de ésteres de POE restantes se calculó de acuerdo con lo siguiente ecuación:

$$\frac{\% \text{ésteres de POE a } t_n}{\% \text{ésteres de POE a } t_0}$$

en donde $n=2, 4$ o 10 días.

Ejemplo 1. Falla de especificación de partículas

Se evaluaron dos lotes de GMP de la formulación de anticuerpo de 150 mg/ml para partículas subvisibles mediante oscurecimiento por luz HIAC después de al menos seis meses de almacenamiento a 5° C, como se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 10.342.876, que se incorpora en la presente como referencia. La formulación

comprendía polisorbato 20 al 0,02% del proveedor A y 150 mg/mL de anticuerpo anti-IL-4R. El anticuerpo se purificó a partir del cultivo de células CHO usando una combinación de captura de afinidad y cromatografía de intercambio iónico. Los resultados se presentan en la Tabla 3.

Tabla 3. Número de partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ de tamaño después del almacenamiento

	Almacenamiento a 5 °C				Almacenamiento a 25 °C
Lote	0 meses	6 meses	9 meses	12 meses	6 meses
1	125	6.299	13.361	29.505	32.744
2	18	353	8.027	10.797	18.602

Ejemplo 2. Calidad y pureza de éster de ácido graso afecta formación de SVP

El efecto de la naturaleza y calidad del detergente no iónico (polisorbato 20 y polisorbato 80) sobre la formación de partículas subvisibles en una formulación de proteína se probó formulando un anticuerpo en (i) polisorbato 20 del proveedor A (PS20-A), (ii) polisorbato 20 del proveedor B (PS20-B) o (iii) polisorbato 80 (PS80) , como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 10.342.876, que se incorpora en la presente como referencia. La Tabla 4 muestra los datos de HTAC SVP ($\geq 10 \mu\text{m}$ SVP) de la sustancia de fármaco formulada de la siguiente fórmula: 20 mM de histidina (pH 5,9), 12,5 mM de acetato, detergente no iónico al 0,02% (polisorbato), sacarosa al 5% (p/v), 25 mM de arginina y 150 mg/mL de anticuerpo, almacenados como 2,5 mL relleno en un vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 5 mL con un tapón West S2-F451 4432/50 GRY B2-40.

Aquí, la sustancia de fármaco formulada ("mAb1") que contiene polisorbato 80 mostró significativamente menos formación de SVP con el tiempo que aquellas formulaciones que contienen polisorbato 20. Además, las formulaciones que contienen polisorbato 20 del proveedor B (PS20-B), que es un grado más alto de polisorbato 20, mostraron menos formación de SVP que aquellas formulaciones que contienen polisorbato 20 del proveedor A (PS20-A; un grado más bajo de polisorbato 20). Un análisis comparativo de PS20-A y PS20-B muestra que PS20-B tiene 5-10% más ésteres generales que PS20-A, y que PS20-A tiene más éster de laurato de isosorbida que PS20-B, como se muestra en la figura 1.

Tabla 4. Número de partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ de tamaño después del almacenamiento con detergentes variables

		Almacenamiento a 5 °C				Almacenamiento
Lote	Detergente no iónico	0 meses	6 meses	9 meses	12 meses	6 meses
1	PS20-A	125	6.299	13.361	29.505	32.744
2	PS20-A	18	353	8.027	10.797	18.602
1	PS20-B	25	175	NA	1.138	4.221
2	PS20-B	8	108	NA	1.198	5.682
1	PS80	19	26	NA	22	92

La sustancia de fármaco formulada que comprende HP-PS20 o SR-PS80 se evaluó adicionalmente utilizando un método de microscopía de membrana o MFI después del almacenamiento durante hasta 36 meses, como se muestra en la figura 2. El número de partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ se comparó adicionalmente entre las formulaciones almacenadas en un vial de vidrio en comparación con las formulaciones almacenadas en una jeringa precargada, como se muestra en las figuras 2A, 2B, 2C y 2D. En todos los casos, el número de partículas aumentó sustancialmente con el tiempo.

Se planteó la hipótesis de que la degradación del éster de ácido graso de polisorbato en las formulaciones puede promover la inestabilidad de las proteínas y, en consecuencia, dar como resultado la formación de SVP. Con el fin de evaluar la degradación de polisorbato, se comparó la estabilidad del polisorbato 20 y el polisorbato 80 en la formulación de anticuerpo 150 mg/mL (mAb1) que contenía detergente no iónico al 0,02% (polisorbato) preparado sin HIC (proceso 3, ver más adelante y Tabla 9)). Las cantidades relativas de ésteres restantes (mono y diésteres) se determinaron mediante espectroscopía de masas. Se observó una degradación significativa de los componentes éster del polisorbato 20 después de que las muestras se almacenaron a 5 °C durante seis meses o 45 °C durante dos meses. Se observó una degradación menos extensa para el polisorbato 80 en las mismas condiciones (ver Tabla 5). Estos resultados se correlacionan con las observaciones de formación de partículas de SVP.

Las tasas de degradación de polisorbato 20 y polisorbato 80 formuladas con 150 mg/mL de anticuerpo (mAb1) (como se describió anteriormente para la Tabla 5) se determinaron en condiciones idénticas utilizando espectroscopía de masas para medir cantidades relativas de ácidos grasos libres y ésteres de ácidos grasos. El porcentaje de degradación de éster se determinó usando la siguiente fórmula:

$$\frac{\% \text{ ésteres de POE a } T0 - \% \text{ ésteres de POE a } T1}{\% \text{ ésteres de POE a } T0}$$

en donde T0=tiempo cero, T1=tiempo en condición experimental (es decir, 2 meses a 45 °C; 6 meses a 5 °C) y POE=polioxietileno. La Tabla 6 muestra el porcentaje de degradación de polisorbato 20 y polisorbato 80 en formulaciones de anticuerpo de 150 mg/mL. La tasa de degradación de polisorbato 80 fue consistentemente más baja para mAb1 (pero no para todos los anticuerpos probados) que la tasa de degradación de polisorbato 20 en formulaciones de anticuerpos por lo demás idénticas.

Tabla 5. Porcentaje de ésteres restantes después de almacenamiento

Detergente/entidad química		0 meses	6 meses a 5 °C	2 meses a 45 °C
PS20	Monoéster	100%	60%	30%
	Diéster	100%	30%	10%
PS80	Monoéster	100%	80%	35%
	Diéster	100%	75%	25%

Tabla 6. Porcentaje de degradación de éster después de almacenamiento

Éster de polioxietileno	0 meses	6 meses a 5 °C	2 meses a 45 °C
PS20	0%	22%	63%
PS80	0%	13%	47%

La degradación de polisorbato en formulaciones que comprenden SR-PS80 o HP-PS20, almacenadas en viales de vidrio o jeringas precargadas, se comparó adicionalmente usando CAD-UHPLC, como se muestra en las figuras 3A y 3B. En todos los casos, hubo una degradación apreciable de polisorbato con el tiempo. La presencia de SVP se correlacionó con la concentración de polisorbato restante en una formulación, como se muestra en la figura 4. Se encontró la misma relación usando una formulación que comprende otro anticuerpo monoclonal, mAb5, como se muestra en la figura 5. Usando espectroscopía Raman, se confirmó que las partículas en formulaciones que contienen polisorbato coincidían con las características de los ácidos grasos. Por lo tanto, con el fin de resolver el problema de la formación de SVP, se investigó más a fondo el fenómeno de la degradación de polisorbato y la formación de partículas de ácidos grasos libres.

Ejemplo 3. Actividad de degradación de polisorbato

Para determinar el agente etiológico responsable de la degradación de polisorbato, el anticuerpo mAb1 amortiguado (150 mg/ml) se separó en dos fracciones mediante filtración de 10 kDa: una fracción de proteína y una fracción de amortiguador, como se

describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 10.342.876, que se incorpora en la presente como referencia. Estas dos fracciones, así como el anticuerpo amortiguado intacto, se enriquecieron con 0,2% (p/v) de polisorbato 20 súper refinado (PS20-B) y se estresaron a 45 °C durante hasta 14 días. El estudio mostró que la fracción de proteína, no la fracción de amortiguador, tuvo un efecto sobre la degradación de laurato de sorbitán (es decir, el componente principal de polisorbato 20), como se muestra en la Tabla 7, y que la degradación de polisorbato 20 se correlacionó con la concentración del anticuerpo, como se muestra en la Tabla 8.

Tabla 7. Degradación de laurato de sorbitán en cada fracción de mAb1

Fracción	% de éster de laurato de sorbitán restante (14 días a 45 °C)
Sustancia de fármaco	75%
Fracción de proteína	75%
Fracción de amortiguador	100%

Tabla 8. La degradación de polisorbato en cada fracción de mAb1 se correlaciona con la concentración de anticuerpos

Fracción	Concentración de anticuerpo (mg/mL)	Éster de polisorbato al 20 % restante (12 días a 45 °C)
Sustancia de fármaco	150	82%
Fracción de proteína	75	92%
Fracción de amortiguador	25	98%

Ejemplo 4. Cromatografía de interacción hidrófoba

El anticuerpo se produjo en un hospedero de células CHO y se purificó usando uno de dos procesos (ver, Tabla 9), como se describe en la patente de los Estados Unidos núm. 10.342.876, que se incorpora en la presente como referencia. En un caso, el anticuerpo se purificó usando intercambiadores de iones como pasos de pulido (paso de captura, intercambio de iones 1, intercambio de iones 2; "Proceso 3"). En el otro caso, uno de los pasos de pulido utilizados para purificar el anticuerpo fue la cromatografía de interacción hidrófoba como un paso de pulido adicional (paso de captura, intercambio iónico, interacción hidrófoba; "Proceso 6"). El anticuerpo, purificado mediante el proceso 3 o el

proceso 6, se formuló a 150 mg/mL en histidina 20 mM (pH 5,9), acetato 12,5 mM, sacarosa al 5%, arginina 25 mM y polisorbato 20 al 0,02%, y se sometió a degradación forzada a 45 °C durante hasta 14 días. En el día 14, aproximadamente 98% del laurato de sorbitán (es decir, éster intacto) permaneció en la formulación que contenía el anticuerpo purificado usando el proceso 6, mientras que solo aproximadamente 28% del laurato de sorbitán permaneció en la formulación que contenía el anticuerpo purificado usando el proceso 3. Por lo tanto, el paso de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC) probablemente eliminó una actividad que contribuye a la degradación de polisorbato.

Tabla 9. Recuperación de polisorbato usando varios procesos de purificación de anticuerpos

Proceso núm.	Pasos de purificación	% de PS20 intacto
1	Captura de afinidad de proteína A (PA)	54%
2	PA > intercambio catiónico (CEX)	25%
3	PA > CEX > intercambio aniónico (AEX)	86%
4	PA > CEX > interacción hidrófoba (HIC)	90%
5	PA > AEX	83%
6	PA > AEX > HIC	92%

Se evaluó el papel de los pasos de proceso a granel en la eliminación del factor de degradación de polisorbato putativo (actividad esterasa putativa). El anticuerpo producido a partir de células CHO se sometió a pasos de purificación secuenciales, y se evaluó la estabilidad del polisorbato 20 en cada paso. Los resultados de un conjunto de experimentos se presentan en la Tabla 9, que informa sobre el porcentaje de polisorbato 20 intacto en cada paso o secuencia de pasos. Se predice que el porcentaje de polisorbato 20 intacto es inversamente proporcional a la cantidad de actividad esterasa contaminante.

Se probaron múltiples anticuerpos diferentes para determinar una actividad de degradación de polisorbato asociada (esterasa) y el efecto de HIC en esa actividad. En cada caso, se detectó actividad de degradación de polisorbato 20, y esa actividad se eliminó virtualmente mediante la incorporación de un paso de purificación de HIC (Tabla 10).

Tabla 10. Degradación de polisorbato con y sin purificación de HIC

Anticuerpo	HIC o sin HIC	Degradación de PS20 en el día 15
------------	---------------	----------------------------------

mAb1 (IgG4)	Sin HIC	72%
mAb1 (IgG4)	HIC	2,0%
mAb2 (IgG1)	Sin HIC	41%
mAb2 (IgG1)	HIC	2,0%
mAb3 (IgG4)	Sin HIC	40%
mAb3 (IgG4)	HIC	5,0%
mAb4 (IgG4)	Sin HIC	ND
mAb4 (IgG4)	HIC	1,0%

Se exploró el papel de HIC en la formación de partículas subvisibles. Sin pretender limitarse por la teoría, se planteó la hipótesis de que la estabilidad del detergente no iónico en una formulación de proteína (*por ejemplo*, anticuerpo) se correlaciona directamente con la formación de partículas subvisibles. La pérdida de actividad tensioactiva puede permitir que la proteína se agregue y forme partículas subvisibles. De manera adicional o alternativa, los ácidos grasos liberados por los ésteres de ácidos grasos de sorbitán que se degradan también pueden contribuir a la formación de partículas subvisibles como gotas de ácidos grasos inmiscibles. Por lo tanto, se contaron niveles de partículas subvisibles >10 micrómetros de diámetro en la sustancia de fármaco (150 mg/mL de anticuerpo en histidina 20 mM (pH 5,9), acetato 12,5 mM, sacarosa al 5%, arginina 25 mM y polisorbato 20 al 0,02%) producido con HIC (*por ejemplo*, proceso 6) o sin HIC (*por ejemplo*, proceso 3). Los resultados (presentados en la Tabla 11 y la Tabla 12) muestran que la aplicación de un paso de HIC redujo significativamente la formación de SVP en la sustancia de fármaco (en el orden de diez veces menos), aunque se usó PS20-A de menor calidad en estos experimentos.

Tabla 11. Número de partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ de tamaño con y sin purificación de HIC

	Almacenamiento a 5 °C				Almacenamiento a 25 °C
Proceso	0 meses	6 meses	12 meses	24 meses	6 meses
HIC utilizado	129	189	140	178	136
Sin HIC	35	769	1.342	14.346	1.951

Tabla 12. Número de partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ de tamaño con y sin purificación de HIC

	Almacenamiento a 5 °C				Almacenamiento
Proceso	0 meses	6 meses	12 meses	24 meses	6 meses
HIC	15	12	28	28	6

Sin HIC	3	59	30	429	70
---------	---	----	----	-----	----

Las formulaciones de mAb1 que comprenden PS20 o PS80 y producidas con HIC se caracterizaron adicionalmente a lo largo del tiempo para la formación de partículas, como se muestra en las figuras 6A, 6B, 6C y 6D. Las formulaciones que comprenden PS20 o PS80, como se mide por microscopía de membrana o MFI, no mostraron un aumento en la formación de partículas con el tiempo.

Las formulaciones de mAb1 producidas con HIC se evaluaron adicionalmente para determinar la degradación de polisorbato a lo largo del tiempo, como se muestra en las figuras 7A y 7B. De acuerdo con los resultados de SVP descritos anteriormente, las formulaciones sometidas al proceso de HIC no mostraron una degradación apreciable del polisorbato incluso durante 36 meses de almacenamiento.

Ejemplo 5. Actividad de tipo 2 de fosfolipasa B putativa

La actividad de degradación de polisorbato se siguió durante la purificación de HIC de un anticuerpo ejemplar producido en cultivo de células CHO, como se describe en la Patente de los Estados Unidos Núm. 10.342.876, que se incorpora en la presente como referencia. El extracto de células CHO parcialmente purificado se aplicó a HIC (fenil-sefarosa). Se recolectó el flujo continuo, que contenía casi todo el anticuerpo, y se analizó para determinar la actividad de degradación de polisorbato. No se observó actividad de degradación de polisorbato en esta fracción de flujo continuo. La fracción unida a HIC se eliminó del medio de HIC y posteriormente se sometió a ultrafiltración/diafiltración de corte de 100 kDa. La fracción separada sin filtrar contenía 9,9% de actividad de degradación de polisorbato, el permeado de filtro contenía 1,3% de actividad de degradación de polisorbato y 5% de rendimiento de anticuerpo, y el retenido de filtro contenía 7,4% de actividad de degradación de polisorbato y 95% de rendimiento de anticuerpo.

Tabla 13. Porcentaje de reducción en la degradación de polisorbato 20 por concentración de inhibidor de lipasa

Inhibidor de lipasa	0 mM	0,001 mM	0,01 mM	0,1 mM
Orlistat	0%	0%	27,8%	67%
Fosfato de dietilumbeliferilo	0%	48%	100%	> 95 %
URB602	0%	0%	20%	0%
Ácido 2-butoxifenil borónico	0%	0%	28%	0%

Se probó si la actividad de degradación de polisorbato es una lipasa mediante la combinación de un inhibidor de lipasa con la fracción de actividad de degradación de polisorbato enriquecida con polisorbato 20. La Tabla 13 presenta los datos que muestran una reducción de la actividad de degradación de polisorbato debido al inhibidor de lipasa con respecto al control (anticuerpo con actividad de degradación de polisorbato asociada más polisorbato 20 sin inhibidor de lipasa). Los inhibidores de lipasa redujeron o eliminaron la actividad de degradación de polisorbato asociada con el anticuerpo.

Una fracción de tira de HIC de anticuerpo recombinante producida por CHO (no el flujo continuo), que contenía la actividad de degradación de polisorbato, se sometió a HIC adicional en modo de unión/elución, en donde el anticuerpo se eluyó con un gradiente poco profundo. Las fracciones de elución se analizaron para determinar la actividad de degradación de PS20 y aquellas fracciones que tenían esa actividad se sometieron a (i) análisis de espectrometría de masas intacta, (ii) cromatografía de exclusión de tamaño nativo, análisis UV (SEC-UV) y (iii) digestión trípica seguida de LC-MS y análisis de búsqueda proteómica. El análisis de espectrometría de masas intacta de fracciones de cromatografía líquida de fase inversa reveló una especie desconocida en la fracción hidrófoba L8 (la fracción más hidrófoba). Las muestras de anticuerpo formuladas que contienen polisorbato 20 y enriquecidas con L8 (1:00) mostraron una degradación de polisorbato del 20% para el día ocho. Se detectaron monómero de anticuerpo y cadena ligera libre en fracciones menos hidrófobas L3-L7, así como L8. El dímero de anticuerpo se detectó en las fracciones L5-L8.

Las fracciones de tira de HIC L3-L9 se sometieron a SEC-UV en condiciones naturales. La fracción L8 se separó en tres picos principales que salieron primero, y dos picos menores que salieron más tarde y que representan especies más pequeñas. El primer pico de la columna contenía dímero de anticuerpo y otros oligómeros. El segundo pico contenía monómero de anticuerpo. El tercer pico contenía las especies que tenían actividad de degradación de polisorbato. Por lo tanto, la actividad de degradación es separable del anticuerpo y es de rotación molecular más pequeña que el monómero de anticuerpo.

La fracción de HIC L8 también se sometió a análisis proteómico de escopeta. En resumen, la fracción L8 se (i) retuvo secuencialmente en un filtro de 10 kDa, (ii) se reconstituyó en 6M de guanidina-HCl, 100 mM de Tris-HCl, pH 7,5, (iii) se trató durante 30 minutos a 50 °C en 10 mM de clorhidrato de Tris(2-carboxietil)fosfina (TCEP) seguido de 30 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente en 20 mM de ácido indol-3-acético

(IAA), (iv) se diluyó ocho veces, se agregó tripsina a 1 parte de tripsina a 20 partes de muestra, y se incubó a 37 °C durante cuatro horas, y luego (v) se sometió a análisis de LC-MS/MS. La búsqueda proteómica de las secuencias peptídicas resultantes reveló cinco proteínas asociadas con L8: (i) fosfolipasa B tipo 2 putativa (que representa el 15% de la fracción de pico), (ii) peroxirredoxina-1, (iii) proteína 1 de 27 kDa de choque térmico, (iv) subunidad 1 de complejo promotor de anafase y (v) proteína de ribonucleoproteína pequeña U3 MPP10.

La cantidad de actividad de degradación de polisorbato se correlacionó con la abundancia de proteína 2 similar a fosfolipasa B (PLBL2) presente. En varios pasos de purificación, se determinó la cantidad de PLBL2 mediante nanoLC-MS o LC-MS y se determinó la tasa de degradación de polisorbato (fracciones enriquecidas con PS20). La abundancia de PLBL2 se calculó con base en la relación de intensidad de péptido de la lipasa y la sustancia de fármaco (es decir, anticuerpo). Los resultados se presentan en la figura 8 y la tabla 14.

Tabla 14. Correlación de PLBL2 y degradación de polisorbato

Fracción	% de degradación de PS20	Cantidad relativa PLBL2 (ppm) ²
Agrupación de ProA	69,02%	991
Agrupación de CEX	55,24%	403
Agrupación de AEX	12,85%	84
Agrupación de HIC	8,67%	0
Agrupación de HIC 2	10,96%	0
Tira de HIC	83,75%	1384
proceso de mAb1 3 (ejemplo 4)	4,60%	0
proceso de mAb1 6 (ejemplo 4) ¹	29,12%	92

¹Tasa de degradación ajustada por concentración.

²Abundancia de fosfolipasa calculada con base en la relación de intensidad de péptido de la lipasa y la sustancia de fármaco.

Ejemplo 6. Reducción de actividad de lipasa usando AEX

Se investigó la capacidad de una operación de unidad de cromatografía de intercambio aniónico (AEX) para reducir los niveles de lipasas en una formulación de fármaco. AEX se realizó en modo de flujo continuo, donde las impurezas cargadas

negativamente se adsorben al ligando inmovilizado cargado positivamente (columna) y el producto fluye a través. Las funciones de transferencia se generaron utilizando regresión escalonada para los parámetros del proceso que se considera que tienen más probabilidades de influir en la actividad de la lipasa. Las visualizaciones de los modelos resultantes se muestran en la figura 9. Este modelo se puede utilizar para la selección racional de punto de ajuste e intervalo utilizando un algoritmo de optimización para maximizar la conveniencia y la robustez del proceso. Se descubrió sorprendentemente que la actividad de lipasa se correlacionaba inversamente con el pH de la carga de AEX, proporcionando un nuevo método para minimizar la actividad de lipasa al optimizar las condiciones de cromatografía de AEX.

El rendimiento de un proceso de AEX optimizado se verificó en cuatro lotes de confirmación a escala piloto (500 L), como se muestra en la tabla 15. La actividad de lipasa se midió estresando muestras concentradas a 45° C durante 44 horas después de un pico de polisorbato 20 al 0,8% p/v y midiendo el cambio en ácidos grasos no esterificados (NEFA). El rendimiento de proceso de intercambio aniónico durante estos lotes se comparó con las predicciones del modelo a pequeña escala derivadas de las simulaciones de Monte Carlo de la ejecución del proceso en el punto de ajuste con la variación estimada en los parámetros de entrada, como se muestra en la figura 10. Las respuestas del lote de confirmación se indican con una línea naranja continua. Todas las respuestas estuvieron dentro del intervalo predicho generado a partir del modelo multivariable a escala reducida para un anticuerpo anti-IL-4R producido utilizando el proceso de la presente invención, lo que ilustra la robustez del proceso para ampliar y la idoneidad del modelo a pequeña escala para predecir el rendimiento a escala piloto.

Tabla 15. Resumen del rendimiento de paso de intercambio aniónico de escala de 500 L durante los lotes de confirmación de proceso

Biorreactor	B1	B2	B3	B4	Lote de confirmación (media ± SD, N=4)	Escala descendente (media ± DE)
Actividad de lipasa de carga de AEX (%)	6,31	6,30	6,29	7,28	6,55 ±0,49	N/A

Actividad de lipasa de agrupación de AEX (%)	2,29	3,21	2,33	2,64	2,62 ±0,42	4,3 ±0,6
--	------	------	------	------	------------	----------

SD, desviación estándar

Ejemplo 7. Composición de ácidos grasos optimizada para reducir la formación de partículas

Las proteínas de interés pueden presentar desafíos adicionales para la eliminación de lipasa en función de su estructura y características fisicoquímicas. mAb5 se formuló siguiendo técnicas típicas de eliminación de HCP, pero aún mostró degradación de polisorbato a lo largo del tiempo en almacenamiento, como se muestra en la figura 11 y la figura 12. El modelado de homología demostró que mAb5 presenta un gran parche hidrófobo en comparación con mAb6 y mAb7, como se muestra en la figura 13, lo que podría causar la coelución de mAb5 con lipasas hidrófobas. Por lo tanto, se investigaron enfoques adicionales para reducir la degradación de polisorbato y la formación de SVP.

La composición de ácidos grasos y la distribución porcentual de componentes de alto punto de fusión son consideraciones útiles para predecir la formación de partículas. Los ácidos grasos libres con altos puntos de fusión probablemente pueden formar partículas insolubles que se pueden detectar a temperatura ambiente y durante la evaluación analítica. La composición de ácidos grasos en diferentes polisorbatos, junto con sus respectivos puntos de fusión, se muestra en la Tabla 16. Los polisorbatos disponibles comercialmente pueden tener composiciones de ácidos grasos con un amplio intervalo de puntos de fusión, con PS80 que presenta una mayor concentración de ácidos grasos de bajo punto de fusión, en particular ácido oleico.

Tabla 16. Composiciones de ácidos grasos de polisorbatos disponibles comercialmente

Ácidos grasos	% (de CoA)	SR-PS20	Seppic PS80	Croda SR-PS80	NOF PS80 (ChP)	Croda Alto Oleico SR-PS80 (ChP)	Punto de fusión (°C)
Cáprico	≤ 10	1,7	-	-	-	-	31,6
Láurico	40,0-60,0	55,6	-	-	-	-	43,2
Mirístico	≤5,0	22,8	0	0	NMT0,1	0	54,4
Palmítico	≤16,0	10,8	12	1,4	0,2	0,1	62,9

Estearico	≤6,0	0,3	2,8	2,3	NMT0,1	0	69,3
Oleico	≥ 58,0 (≥ 98,0 ChP)	6,9	70,6	87,8	99,3	99,5	13,4/16,3

La estabilidad de almacenamiento del producto de fármaco de mAb1 (DP) preparado sin un paso de HIC se evaluó en muestras que comprenden diferentes grados de PS80, como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos Núm. 20190083618 AI, que se incorpora en la presente como referencia. Cada muestra de DP tenía un volumen de 2,136 mL, contenía la misma concentración de mAb1 (150 mg/mL) y 0,2% (p/v) de uno de varios lotes de PS80. Cada lote de PS80 tenía uno de tres contenidos porcentuales diferentes de éster de ácido oleico (70%, 87% y > 99%). La Tabla 17 resume el contenido porcentual de éster de ácido oleico en el PS80 en cada muestra de FDS.

Tabla 17.

Muestra	% de contenido de éster de ácido oleico en PS80 (Lote)
DPA	87%
DPB	> 99% (Lote 1)
DPC	> 99% (Lote 2)
DPD	70% (Lote 1)
DPE	70% (Lote 2)
DPF	70% (Lote 3)

Las muestras de DP se almacenaron a 2-8 °C en jeringas precargadas de vidrio durante hasta 24 meses. Las partículas se midieron en cada muestra de DP cada seis meses durante un total de 24 meses, tanto por método de microscopía de membrana como por formación de imágenes de microflujo (MFI).

La figura 14 muestra el número de SVP por recipiente que tiene un diámetro de ≥ 10 µm, como se mide por microscopía de membrana. La figura 15 muestra, en forma de gráfico, el número de SVP por recipiente que tiene un diámetro ≥ 10 µm, como se mide por MFI. Como se muestra en la figura 14 y la figura 15, DP B y DP C (las dos muestras de DP que contienen PS80 que tienen un contenido ≥ 99% de ésteres de ácido oleico) mostraron los números más bajos de SVP a lo largo del período completo de 24 meses, como se mide por microscopía de membrana (figura 14) y MFI (figura 15). El DP A, que contiene PS80 con un contenido de 87% de ésteres de ácido oleico, mostró el siguiente número más bajo

de partículas subvisibles a lo largo del período de 24 meses (en particular, mostró entre 800 y 1200 partículas a los 24 meses). Los DP D, E y F mostraron todos más de 3000 partículas por recipiente (como se mide por ambos métodos) por al menos la marca de 18 meses.

Se planteó la hipótesis de que el menor número de partículas en los DP A, B y C (en comparación con las partículas más numerosas en los DP D, E y F) fue el resultado del uso de PS80 que tenía un mayor contenido porcentual de ésteres de ácido oleico (o ácido graso de cadena larga). El ácido oleico es un ácido graso de cadena más larga, con un enlace insaturado (ver, figura 16). Por lo tanto, tiene una temperatura de fusión subambiente de aproximadamente 13 °C. Un precursor de la formación de partículas de ácidos grasos libres (FFA) subvisibles y visibles es la aglomeración de cadenas de FFA individuales en agregados, que luego precipitan en forma de partículas. El ácido oleico se puede generar durante el almacenamiento de las formulaciones a 5 °C, por *ejemplo*, mediante hidrólisis enzimática de los ésteres de ácidos grasos en polisorbato 80. Este ácido oleico puede formar SVP, pero debido a su baja temperatura de fusión, es más probable que estas partículas existan como un líquido oleoso en formulaciones de proteínas a temperatura ambiente (aproximadamente 22°C) donde se realiza el análisis y, por lo tanto, no persiste como partículas subvisibles a temperatura ambiente. Como contraste, cantidades más altas de contenido de éster de ácido no oleico en la formulación conducirán a la formación de sus FFA correspondientes tras la hidrólisis, y debido a sus temperaturas de fusión más altas, las partículas amorfas subvisibles y visibles así formadas persisten a temperatura ambiente durante el análisis.

Además, los ésteres de ácido oleico son mejores agentes solubilizantes/estabilizantes que los ésteres de ácidos grasos de cadena más corta debido a la mayor hidrofobicidad de los ésteres de ácido oleico, lo que permite que los ésteres de ácido oleico solubilicen partículas de ácidos grasos y proteínas libres, manteniendo así la estabilidad del producto. Por lo tanto, el polisorbato 80 con contenidos más altos de ésteres de ácido oleico (> 98%) puede proporcionar una estabilidad mejorada a las formulaciones de proteínas y productos farmacéuticos en comparación con el polisorbato 80 con contenidos más bajos de ésteres de ácido oleico.

Se evaluó una concentración de cada tipo de ácido graso libre (en microgramos/mL) en cada muestra de DP (DP A-F) después del almacenamiento de las muestras a 5 °C durante 18 meses. Las muestras de DP A-F se prepararon como se describió anteriormente. Las concentraciones de ácidos grasos libres se midieron a los 18 meses por

LC-MS, como se muestra en la figura 17. Los DP B y C (las dos muestras de DP que contienen PS80 que tienen un contenido $\geq 99\%$ de ésteres de ácido oleico mostraron la concentración más alta de ácido oleico y las concentraciones más bajas de otros FFA. Esto indica la homogeneidad de los FFA (es decir, ácidos oleicos) en los DP B y C. Esto indica además que el uso de polisorbato que comprende una alta concentración de ácido oleico puede reducir la formación de partículas de ácidos grasos libres a temperatura ambiente incluso en una formulación que comprende una lipasa que causa la producción de ácidos grasos libres.

Ejemplo 8. Prevención de la formación de partículas en formulaciones que contienen lipasa con PEG3350 o poloxámero 188

Las esterasas o lipasas pueden hidrolizar polisorbatos mediante hidrólisis enzimática del enlace éster, como se muestra en la figura 18A. Los tensioactivos alternativos tal como PEG3350 y poloxámero 188 no contienen enlaces éster y, por lo tanto, no son dianas para las esterasas, como se muestra en la figura 18B. Se formuló mAb5 con PS20, PS80 o poloxámero 188, y se comparó la recuperación de tensioactivo, como se muestra en la figura 19. A diferencia de las formulaciones PS20 y PS80, las formulaciones de poloxámero no experimentaron pérdidas de recuperación, a todas las temperaturas probadas.

Con el fin de investigar si el uso de tensioactivos alternativos podría reducir la formación de SVP en un DP formulado, se prepararon formulaciones de anticuerpo IL-4R usando tensioactivos alternativos, y se midió la formación de partículas a lo largo del tiempo, como se describe en la Solicitud Provisional de los Estados Unidos Núm. 63/337532, que se incorpora en la presente como referencia. Se formuló un anticuerpo anti-IL-4R que comprende el par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR de SEQ ID NO:1/2 a una concentración de 150 mg/mL con histidina 20 mM, acetato de sodio 12,5 mM, arginina-HCl 25 mM, sacarosa al 5% p/v y PEG3350 o poloxámero 188 a concentraciones variables, a pH 5,9. Las formulaciones se almacenaron en jeringas a 5 °C durante hasta 36 meses con mediciones periódicas del número de partículas ($\geq 10 \mu\text{m}$ y $\geq 25 \mu\text{m}$) presentes en las formulaciones, como se determina por microscopía. Como se muestra en la figura 20, se identificaron pocas partículas de $\geq 10 \mu\text{m}$ o $\geq 25 \mu\text{m}$ en las formulaciones durante el período de observación de 36 meses. Además, no se observaron diferencias o cambios apreciables en la cantidad de partículas subvisibles entre las diferentes formulaciones que contienen PEG3350 o poloxámero 188 durante el transcurso del período de almacenamiento.

Estos resultados demuestran que los tensioactivos alternativos tal como poloxámero

188 son resistentes a la degradación en una formulación que contiene lipasa, y que bajas concentraciones de PEG3350 o poloxámero 188 pueden prevenir la formación de partículas en una formulación de DP durante largos períodos de almacenamiento.

Con el fin de evaluar la capacidad de los tensioactivos alternativos para promover la estabilidad de proteínas terapéuticas, las formulaciones que comprenden PEG3350 o poloxámero 188 se sometieron adicionalmente a evaluaciones de la estabilidad al estrés de agitación y la estabilidad al estrés térmico. Se evaluó la estabilidad al estrés de agitación para las formulaciones de anticuerpo IL-4R que contienen diferentes concentraciones del tensioactivo PEG3350 o poloxámero 188. Un anticuerpo anti-IL-4R que comprende el par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR de las SEQ ID NO: 1/2 se formuló a una concentración de 150 mg/mL con histidina 20 mM, acetato de sodio 12,5 mM, arginina-HCl 25 mM, sacarosa al 5% p/v y PEG3350 o poloxámero 188 a concentraciones variables, a pH 5,9. Las formulaciones se almacenaron en viales de vidrio y se agitaron mediante agitación vorticial (ajuste de velocidad = 4) durante 30 minutos, 60 minutos o 120 minutos. El porcentaje de especies de alto peso molecular (HMW, por sus siglas en inglés) se determinó entonces mediante cromatografía líquida de ultra alta resolución de exclusión por tamaño (SE-UPLC, por sus siglas en inglés).

Como se muestra en la figura 21A, la formulación del anticuerpo con al menos 0,01% (p/v) de PEG3350 evitó un aumento observable de especies de HMW (cuantificado por SE-UHPLC) debido a la agitación. Las cantidades más bajas de PEG3350 (0,001% o 0,005%) fueron insuficientes para prevenir la formación de HMW. De manera similar, como se muestra en la figura 21B, la formulación del anticuerpo con al menos 0,01% (p/v) de poloxámero 188 evitó un aumento observable de especies de HMW, pero se observaron especies de HMW con cantidades más bajas de poloxámero 188 (0,001% o 0,005%).

Se evaluó adicionalmente la estabilidad al estrés térmico de las formulaciones de anticuerpo IL-4R que contienen PEG3350 o poloxámero 188 y se comparó con diversas formulaciones de anticuerpo IL-4R que contienen polisorbato. Un anticuerpo anti-IL-4R que comprende el par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR de las SEQ ID NO: 1/2 se formuló a una concentración de 150 mg/mL con histidina 20 mM, acetato de sodio 12,5 mM, arginina-HCl 25 mM, sacarosa al 5% p/v y polisorbato 20, polisorbato 80, PEG3350 o poloxámero 188 a concentraciones variables, a pH 5,9. Estas formulaciones se sometieron a estrés térmico (45 °C) durante un período de hasta 56 días, y el porcentaje de especies de alto peso molecular (HMW, por sus siglas en inglés) se determinó mediante

cromatografía líquida de ultra alta resolución de exclusión por tamaño (SE-UPLC, por sus siglas en inglés) a los 7 días, a los 14 días, a los 28 días, a los 42 días y a los 56 días.

Como se muestra en la figura 22, las formulaciones de anticuerpos que comprenden PEG3350 o poloxámero 188 a una concentración de 0,01% o 0,02% mostraron una estabilidad térmica similar a las formulaciones de anticuerpos que contienen cantidades más bajas de polisorbato (hasta 0,1% p/v). A los 28 días, las formulaciones que contienen PEG3350 o poloxámero 188 exhibieron un porcentaje menor de especies de HMW que las formulaciones de control que comprenden polisorbato 20 al 0,2%.

Se llevaron a cabo estudios adicionales que compararon la estabilidad térmica de las formulaciones de anticuerpos que contienen polisorbato 80 al 0,2% (Tabla 18), poloxámero 188 al 0,01% (Tabla 19), poloxámero 188 al 0,1% (Tabla 20), poloxámero 188 al 0,5% (Tabla 21), PEG3350 al 0,01% (Tabla 22), PEG3350 al 0,1% (Tabla 23) o PEG3350 al 0,5% (Tabla 24). Cada formulación comprendía 150 mg/mL de anticuerpo anti-1L4R, L-arginina-HCl 25 mM, L-histidina 20 mM, acetato de sodio 12,5 mM, sacarosa al 5% (p/v) y el tensioactivo, a un pH de 5,9. Las formulaciones que comprenden poloxámero 188 o PEG3350 mostraron beneficios de estabilidad en comparación con una formulación que comprende polisorbato 80.

Tabla 18. Estabilidad térmica de las formulaciones con PS80 al 0,2%

Ensayo		t=0	Duración de almacenamiento a 45 °C (meses)		
			1	2	3
Apariencia visual		Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria
Incremento en turbidez (OD 405 nm)		-	0,02	0,16	0,33
pH		6,0	6,0	6,0	6,0
% de anticuerpos recuperados por RP-UPLC		100	98	97	94
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	2,1	10,3	18,6	26,6
	% de Principal	97,2	88,7	79,0	70,7
	% de	0,7	1,0	2,4	2,7

	LMW				
	% de ácido	27,7	53,7	77,9	86,9
Análisis de variantes de carga por CEX-UPLC	% de Principal	62,5	41,0	20,9	9,5
	% de básico	9,9	5,3	13	3,6
MFI (# de partículas/mL)	2 – 10 µm	125	1428	1785	377
	≥ 10 µm	23	29	209	19
	≥ 25 µm	4	2	23	4

Tabla 19. Estabilidad térmica de las formulaciones con poloxámero al 0,01% 188

Ensayo		t=0	Duración de almacenamiento a 45 °C (meses)		
			1	2	3
Apariencia visual		Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria
Incremento en turbidez (OD 405 nm)		-	0,02	0,18	0,28
pH		6,1	6,0	6,1	6,0
% de anticuerpos recuperados por RP-UPLC		100	100	97	98
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	2,1	9,1	16,3	23,7
	% de Principal	97,2	90,0	81,4	73,5
	% de LMW	0,7	0,9	2,3	2,7
Análisis de variantes de carga por CEX-UPLC	% de ácido	28,4	51,7	75,5	86,6
	% de Principal	62,1	43,1	21,0	8,9
	% de básico	9,5	5,3	3,6	4,5

MFI (# de partículas/mL)	2- 10 µm	79	142	648	396
	≥ 10 µm	17	17	23	8
	≥ 25 µm	0	6	2	0

Tabla 20. Estabilidad térmica de las formulaciones con poloxámero al 0,1% 188

Ensayo		t=0	Duración de almacenamiento a 45 °C (meses)		
			1	2	3
Apariencia visual		Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria
Incremento en turbidez (OD 405 nm)		-	0,01	0,14	0,21
pH		6,1	6,0	6,1	6,0
% de anticuerpos recuperados por RP-UPLC		100	99	97	100
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	2,1	9,1	16,4	23,7
	% de Principal	97,3	90,0	81,2	73,6
	% de LMW	0,6	0,9	2,4	2,8
Análisis de variantes de carga por CEX-UPLC	% de ácido	28,1	51,9	74,9	84,0
	% de Principal	62,1	46,2	21,0	8,7
	% de básico	9,8	1,9	4,1	7,4
MFI (# de partículas/mL)	2 – 10 µm	69	540	993	811
	≥ 10 µm	0	17	38	25
	≥ 25 µm	0	0	2	0

Tabla 21. Estabilidad térmica de las formulaciones con poloxámero al 0,5% 188

Ensayo		t=0	Duración de almacenamiento a 45 °C (meses)		
			1	2	3
Apariencia visual		Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria
Incremento en turbidez (OD 405 nm)		-	0,02	0,06	0,22
pH		6,1	6,1	6,1	6,0
% de anticuerpos recuperados		100	100	97	100

por RP-UPLC					
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	2,1	9,1	16,8	24,2
	% de Principal	97,3	90,0	80,9	73,1
	% de LMW	0,6	0,9	2,4	2,7
Análisis de variantes de carga por CEX-UPLC	% de ácido	29,5	50,8	77,1	86,6
	% de Principal	61,5	44,5	21,5	9,0
	% de básico	9,1	4,8	1,4	4,4
MFI (# de partículas/mL)	2 – 10 μ m	179	805	4089	1887
	$\geq 10 \mu$ m	10	8	671	307
	$\geq 25 \mu$ m	0	2	94	61

Tabla 22. Estabilidad térmica de las formulaciones con PEG3350 al 0,01%

Ensayo		t=0	Duración de almacenamiento a 45 °C (meses)		
			1	2	3
Apariencia visual		Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria
Incremento en turbidez (OD 405 nm)		-	0,03	0,14	0,23
pH		6,1	6,1	6,1	6,0
% de anticuerpos recuperados por RP-UPLC		100	102	98	100
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	2,1	9,3	16,5	23,6
	% de Principal	97,4	89,9	81,2	73,6
	% de LMW	0,6	0,9	2,4	2,7

Análisis de variantes de carga por CEX-UPLC	% de ácido	29,4	51,6	77,3	86,4
	% de Principal	62,2	46,1	21,5	11,9
	% de básico	8,5	2,4	1,1	1,8
MFI (# de partículas/mL)	2 – 10 μm	42	494	1216	2085
	$\geq 10 \mu\text{m}$	6	15	44	206
	$\geq 25 \mu\text{m}$	0	6	6	40

Tabla 23. Estabilidad térmica de las formulaciones con PEG3350 al 0,1%

Ensayo		t=0	Duración de almacenamiento a 45 °C (meses)		
			1	2	3
Apariencia visual		Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria
Incremento en turbidez (OD 405 nm)		-	0,03	0,15	0,23
pH		6,0	6,0	6,1	6,1
% de anticuerpos recuperados por RP-UPLC		100	97	92	92
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	2,1	9,3	16 1	22,4
	% de Principal	97,4	89,8	81,6	74,9
	% de LMW	0,6	0,9	2,4	2,8
Análisis de variantes de carga por CEX-UPLC	% de ácido	32,1	51,0	77,6	85,7
	% de Principal	60,6	45,6	21,5	10,9
	% de básico	7,4	3,4	0,9	3,5
MFI (# de partículas/mL)	2 – 10 μm	94	313	1541	2058
	$\geq 10 \mu\text{m}$	2	15	90	159
	$\geq 25 \mu\text{m}$	0	4	0	21

Tabla 24. Estabilidad térmica de las formulaciones con PEG3350 al 0,5%

Ensayo		t=0	Duración de almacenamiento a 45 °C (meses)		
			1	2	3
Apariencia visual		Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria
Incremento en turbidez (OD 405 nm)		-	0,02	0,15	0,23
pH		6,1	6,1	6,1	6,0
% de anticuerpos recuperados por RP-UPLC		100	100	97	98
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	2,1	9,2	16,7	23,9
	% de Principal	97,3	89,8	81,0	73,4
	% de LMW	0,6	0,9	2,4	2,7
Análisis de variantes de carga por CEX-UPLC	% de ácido	29,7	52,0	75,6	83,6
	% de Principal	62,0	45,7	21,3	10,5
	% de básico	8,4	2,3	3,1	6,0
MFI (# de partículas/mL)	2 – 10 µm	121	1289	528	2654
	≥ 10 µm	0	44	42	279
	≥ 25µm	0	25	15	31

CEX, intercambio catiónico; FCP, agrupación concentrada final; HMW, alto peso molecular; LMW, bajo peso molecular; MFI, imágenes de microflujo; NR, no requerido; OD, densidad óptica; RH, humedad relativa; RP, fase inversa; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra-rendimiento

Ejemplo 9. Reducción de actividad de lipasa usando estrés de agitación y estrés de calor

Con el fin de reducir aún más la actividad de esterasa y lipasa, la formación de partículas de ácidos grasos libres y/o la degradación de polisorbato en productos

terapéuticos, se investigaron métodos adicionales para reducir la actividad de esterasa y lipasa en la sustancia de fármaco formulada. Se descubrió sorprendentemente que someter la sustancia de fármaco a condiciones de estrés, tal como estrés de agitación o estrés de calor, se podría usar para reducir la actividad de esterasa y lipasa y aumentar la estabilidad a largo plazo de las moléculas terapéuticas y los tensioactivos en la sustancia de fármaco y los productos de fármaco posteriores.

La sustancia de fármaco de mAb1 producida sin un paso de HIC se sometió a estrés de agitación. Se usaron 30 mL de 200 mg/mL de mAb1 DS. Dos botellas de policarbonato de 125 mL se llenaron cada una con 10 mL de DS y se agitaron en un agitador orbital a 250 rpm durante 0, 24 o 48 horas. Los 10 mL restantes de DS se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL y sirvieron como control no estresado. Se analizaron 2 mL de cada DS como DS pre-estresado (control) (0 horas de agitación) o DS post-estresado (24 o 48 horas de agitación).

El DS de control o estresado se usó para preparar 150 mg/mL de sustancia de fármaco final (FDS), que comprende 150 mg/mL de mAb1, histidina 20 mM, acetato 12,5 mM, sacarosa al 5%, PS20 de alta pureza al 0,2% y HCl de arginina 25 mM, a pH 5,9. El FDS se esterilizó por filtro y luego se almacenó durante 0 semanas, 4 semanas u 8 semanas a 45 °C. Se seleccionó el almacenamiento a 45 °C para acelerar el estudio de estabilidad. La estabilidad física de cada muestra recolectada anteriormente se analizó usando inspección visual para partículas y agregados visibles, SE-UPLC para especies de alto y bajo peso molecular, imágenes de microflujo para análisis de partículas subvisibles (2-300µm) y CAD-UPLC para determinar los niveles de PS20.

La sustancia de fármaco de mAb1 sometida a los pasos de estrés de agitación y filtración mostró menos formación de partículas y mayor retención de polisorbato a lo largo del tiempo, como se muestra en la Tabla 25.

Tabla 25. Estabilidad térmica de las formulaciones sometidas a estrés de agitación

Duración de agitación a 250 rpm (horas)	0			24			48		
Duración de almacenamiento a 45 °C (semanas)	0	4	8	0	4	8	0	4	8
Apariencia visual	Satis- factoria	Satis- factoria	Satis- factoria	Satis- factoria	Satis- factoria	Satis- factoria	Satis- factoria	Satis- factoria	Satis- factoria
Cuantificación de polisorbato % por	100	32	25	100	59	48	100	65	33

CAD										
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	1,7			16,6			30,9		
	% de Principal	98,3			83,5			69,1		
	% de LMW	0			0			0		
MFI (# de partículas/mL)	2 – 10 µm	1036	3260	503066	739	3955	7792	1269	13974	14415
	≥ 10 µm	54	53	81146	15	53	39	73	140	125
	≥ 25 µm	10	6	17563	3	3	0	7	14	3

^a Especificaciones de MFI USP: ≥10 µm tamaños ≤ 3000 partículas/recipiente; ≥25 µm tamaños ≤ 300 partículas/recipiente

CAD, detector de aerosol cargado; CEX, intercambio catiónico; FCP, agrupación concentrada final; HMW, alto peso molecular; LMW, bajo peso molecular; MFI, imágenes de microflujo; NR, no requerido; OD, densidad óptica; RH, humedad relativa; RP, fase inversa; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra-rendimiento.

También se investigaron formas adicionales de estrés. sustancia de fármaco de mAb1 producida sin un paso de HIC se sometió a estrés de calor. DS se almacenó a 45 °C durante 0, 0,5 o 1 mes para hacer que las lipasas se degraden, agreguen y/o inactiven. El DS de control y estresado se usaron para preparar 150 mg/mL de FDS, que comprende 150 mg/mL de mAb1, histidina 20 mM, acetato 12,5 mM, sacarosa al 5%, polisorbato 20 de alta pureza al 0,2% y HCl de arginina 25 mM, a pH 5,9. El FDS se esterilizó por filtro y luego se almacenó en las condiciones establecidas en la Tabla 26.

Tabla 26. Condiciones de incubación/almacenamiento para FDS de DS estresado por calor

Condición de estrés	Duración de incubación
Sin almacenamiento	t=0
45°C	0,5, 1, 1,5, 2 meses
25°C	3, 6 meses
5°C	3, 6, 12, 18, 24, 36 meses y 3 reservas

La estabilidad física de las muestras térmicamente estresadas y de control no estresadas descritas anteriormente se analizó usando inspección visual para partículas y agregados visibles, SE-UPLC para especies de alto y bajo peso molecular, imágenes de microflujo para análisis de partículas subvisibles (2-300 µm) y CAD-UPLC para determinar los niveles de PS20. Los resultados se exponen a continuación en las Tablas 27-32. Someter DS a estrés térmico antes de la formulación dio como resultado una disminución significativa de la actividad de lipasa, mejorando la recuperación de polisorbato y

disminuyendo la formación de partículas de ácidos grasos libres. Las muestras no estresadas mostraron un aumento significativo en las partículas subvisibles a lo largo del tiempo que no se observó en las muestras estresadas. Someter DS a estrés térmico dio como resultado un aumento significativo en el nivel de HMW, pero ese nivel se mantuvo estable durante la incubación adicional.

Tabla 27. Estabilidad de una formulación de DS con 0 meses de estrés térmico

Ensayo		t=0	Duración de almacenamiento a 5 °C (meses)					
			3	6	12	18	24	36
Apariencia visual		Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	
Incremento en turbidez (OD 405 nm)		-						
pH								
Cuantificación de polisorbato % por CAD		100		53				
Pureza por SE- UPLC	% de HMW	2,2	2,2	2,5	2,5	2,6	2,7	2,8
	% de Principal	96,6	96,6	95	96,6	96,5	95,9	95,4
	% de LMW	1,2	1,2	2,5	0,9	0,9	1,5	1,8
	2 – 10 µm	264	12265	81203	141583	243895	273027	371554
MFI (#	≥ 10 µm	20	2273	8446	16902	26739	3042	38956
partículas/mL)	≥ 25 µm	3	9	47	530	1780	113	3602

Tabla 28. Estabilidad de una formulación de DS con 0,5 meses de estrés térmico

Ensayo		t=0	Duración de almacenamiento a 5 °C (meses)					
			3	6	12	18	24	36
Apariencia visual		Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	
Incremento en turbidez (OD 405 nm)		-						
pH								
Cuantificación de		100		89				

polisorbato % por CAD								
Pureza por SE- UPLC	% de HMW	10,9	10,7	11	12	12	11,6	11,7
	% de Principal	86,3	86,6	85,7	85,8	85,7	85,7	84,9
	% de LMW	2,8	2,7	3,4	2,2	2,3	2,7	3,4
MFI (# de partículas/mL)	2 – 10 μm	349	6691	5828	1794	3052	21842	258288
	$\geq 10 \mu\text{m}$	16	216	61	34	222	3641	3586
	$\geq 25 \mu\text{m}$	2	21	8	6	36	248	119

Tabla 29. Estabilidad de una formulación de DS con 1 mes de estrés térmico

Ensayo		t=0	Duración de almacenamiento a 5 °C (meses)					
			3	6	12	18	24	36
Apariencia visual		Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	
Incremento en turbidez (OD 405 nm)		-						
pH								
Cuantificación de polisorbato % por CAD		100		90				
Pureza por SE- UPLC	% de HMW	17,3	17,4	17,7	19	18,9	18,6	18,5
	% de Principal	78,5	78,4	77,6	77,6	77,6	77,2	76,7
	% de LMW	4,2	4,2	4,7	3,5	3,5	4,2	4,8
MFI (# de partículas/mL)	2 – 10 μm	160	3898	2081	35220	4806	824	5189
	$\geq 10 \mu\text{m}$	7	52	14	1017	119	39	109
	$\geq 25 \mu\text{m}$	2	6	1	30	5	2	8

Tabla 30. Estabilidad de una formulación de DS con 0 meses de estrés térmico

Ensayo	t=0	Duración de almacenamiento a 25 °C (meses)		Duración de almacenamiento a 45 °C (meses)			
		3	6	0,5	1	1,5	2

Apariencia visual		Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria		Satisfactoria	
Incremento en turbidez (OD 405 nm)		-						
pH								
Nivel de PS-20 (CAD-UPLC)		100		16				33
Pureza por SE- UPLC	% de HMW	2,2	3	3,5	6,2	8,5	13,3	17,4
	% de Principal	96,6	95,8	94,2	92,2	89,2	84,4	79,9
	% de LMW	1,2	1,2	2,3	1,6	2,3	2,3	2,7
MFI (# de partículas/mL)	2 – 10 μ m	264	19609	146335	25146	2532	8226	263410
	$\geq 10 \mu$ m	20	492	23326	750	47	206	41033
	$\geq 25 \mu$ m	j	19	3825	60	5	20	9790

Tabla 31. Estabilidad de una formulación de DS con 0,5 meses de estrés térmico

Ensayo		t=0	Duración de almacenamiento a 25 °C (meses)		Duración de almacenamiento a 45 °C (meses)			
			3	6	0,5	1	1,5	2
Apariencia visual		Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria		Satisfactoria	
Incremento en turbidez (OD 405 nm)		-						
pH								
Nivel de PS-20 (CAD-UPLC)		100		68				75
Pureza por SE- UPLC	% de HMW	10,9	11	11,5	14,5	14,6	21,2	24,8
	% de Principal	86,3	86,2	84,4	82,3	81	74,5	70,3
	% de LMW	2,8	2,8	4,2	3,2	4,4	4,4	4,9
MFI (# de partículas/mL)	2 – 10 μ m	349	6232	8660	4838	9249	18683	7797
	$\geq 10 \mu$ m	16	52	169	60	172	426	272

	≥ 25 µm	2	4	3	8	0	29	6
--	---------	---	---	---	---	---	----	---

Tabla 32. Estabilidad de una formulación de DS con 1 mes de estrés térmico

Ensayo		t=0	Duración de almacenamiento a 25 °C (meses)		Duración de almacenamiento a 45 °C (meses)			
			3	6	0,5	1	1,5	2
Apariencia visual		Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria		Satisfactoria	
Incremento en turbidez (OD 405 nm)		-						
pH								
Nivel de PS-20 (CAD-UPLC)		100		77				84
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	17,3	17,5	17,6	20,8	19,4	27	30,2
	% de Principal	78,5	78,4	77,2	74,6	74,4	67,4	63,6
	% de LMW	4,2	4,2	5,2	4,6	6,2	5,6	6,3
MFI (# de partículas/mL)	2 – 10 µm	160	5799	11893	3258	10647	18440	4921
	≥ 10 µm	7	84	236	38	359	453	70
	≥ 25 µm	2	3	19	10	18	28	4

Se espera que las HCP se inactiven, degraden y agreguen de manera desproporcionada en respuesta al estrés debido a una estabilidad reducida en comparación con un bioterapéutico, por ejemplo, un anticuerpo terapéutico. Las especies de HMW en DS sometidas a estrés de agitación o estrés térmico, ya sea formadas a partir de HCP, proteína de fármaco, o una combinación, se pueden eliminar usando pasos de procesamiento adicionales tales como filtración o cromatografía. DS térmicamente estresado se sometió a cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para eliminar las especies de HMW que se formaron durante las condiciones de estrés. Las especies de HMW se agotaron de manera eficiente de DS estresado, como se muestra en la Tabla 33.

Tabla 33. Eliminación de especies de HMW de la sustancia de fármaco estresada

Ensayo		t=0	Estrés térmico de 1 semana		Estrés térmico de 2 semanas	
			45°C	50°C	45°C	50°C
Pureza por SE-UPLC antes de la purificación de CEX	% de HMW	1,7	10,2	26,2	17,0	33,6
	% de Principal	98,3	89,8	73,8	83,0	66,4
Pureza por SE-UPLC después de la purificación de CEX	% de HMW	1,3	2,3	2,3	2,5	2,5
	% de Principal	98,7	97,7	97,7	97,5	97,5

Se formuló DS agotado de HMW en FDS que comprende 150 mg/mL de mAb1, histidina 20 mM, acetato 12,5 mM, sacarosa al 5%, PS80 al 0,2% y HCl de arginina 25 mM, a pH 5,9. La estabilidad de FDS de DS estresado térmicamente agotado de HMW se comparó con FDS de DS no estresado agotado de HMW, como se muestra en la Tabla 34. Después de solo una semana (0,25 meses), FDS de DS no estresado agotado de HMW mostró una recuperación de PS80 muy mejorada en comparación con DS no estresado agotado de HMW. Se pueden medir mejoras adicionales en puntos de tiempo posteriores; se espera que la formación medible de partículas de ácidos grasos libres a partir de ácidos grasos libres acumulados siga en el tiempo después de la degradación de PS80 en DS no estresado agotado de HMW. Se debe señalar que una diferencia en la actividad de lipasa entre DS estresado y no estresado después del agotamiento de HMW también se puede enmascarar debido al agotamiento de lipasa HCP del DS no estresado como resultado del paso de cromatografía. Estos resultados demuestran que los métodos divulgados para someter la sustancia de fármaco a estrés de agitación o estrés de calor, opcionalmente seguido de agotamiento de HMW, producen una composición farmacéutica mejorada con actividad de lipasa reducida, degradación de polisorbato reducida y formación de partículas de ácidos grasos libres reducida.

Tabla 34. Estabilidad térmica de una formulación de DS térmicamente estresado agotado de HMW

Estrés térmico de sustancia de fármaco	Control		1 semana a 45 °C		1 semana a 50 °C	
Duración de	0	0,25	0	0,25	0	0,25

almacenamiento a 45 °C (meses)							
Apariencia visual		Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria	Satisfactoria
Incremento en turbidez (OD 405 nm)		0,0	0,03	0,0	0,01	0,0	0,0
pH		6,2	6,2	6,2	6,2	6,1	6,0
Nivel de PS-80 (CAD-UPLC)		100	68	100	97	100	101
Pureza por SE- UPLC	% de HMW	2,2	4,0	2,7	3,8	3,0	4,0
	% de Principal	97,7	95,7	97,0	95,9	96,7	95,7
	% de LMW	0,2	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3
% de mAb1 recuperado por RP-UPLC		100	103	100	103	100	103
MFI (# de partículas/mL)	2 – 10 µm	876	438	323	646	469	947
	≥ 10 µm	48	31	6	27	29	148
	≥ 25 µm	2	4	0	2	8	48

El alcance de la presente invención no se limitará a los aspectos específicos descritos en la presente. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de aquellas descritas en la presente serán evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Se propone que estas modificaciones caigan dentro del alcance de las reivindicaciones anexas.

Ejemplos enumerados

El siguiente conjunto de ejemplos enumerados que se establece más adelante proporciona aspectos adicionales de la presente divulgación.

1. Un método para producir una composición farmacéutica con lipasa reducida, que comprende: someter una muestra que incluye una proteína de interés y una lipasa a cromatografía de intercambio aniónico, en donde un pH de la muestra cargada en la columna de cromatografía está entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 8,3.

2. Un método para producir una composición farmacéutica con actividad de lipasa reducida, que comprende:

(a) someter una muestra que incluye una proteína de interés y una lipasa a

condiciones de estrés para formar una muestra con lipasa inactivada; y

(b) formular la muestra con lipasa inactivada para producir una composición farmacéutica con actividad de lipasa reducida.

3. El método del ejemplo 2, en donde la proteína de interés es un anticuerpo, una proteína derivada de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo biespecífico, una proteína de fusión, un conjugado de anticuerpo-fármaco o una proteína terapéutica.

4. El método del ejemplo 2 o 3, en donde el paso de formulación comprende agregar un éster de ácido graso a la muestra, en donde el éster de ácido graso es polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 o polisorbato 80.

5. El método del ejemplo 4, en donde el éster de ácido graso es polisorbato 80 y una concentración de ésteres de ácido oleico en el polisorbato 80 es de al menos 80%.

6. El método del ejemplo 5, en donde una concentración de ésteres de ácido oleico en el polisorbato 80 es al menos 98% o al menos 99%.

7. El método de cualquiera de los ejemplos 2-6, en donde las condiciones de estrés incluyen estrés de agitación y/o estrés de calor.

8. El método del ejemplo 7, en donde el estrés de agitación comprende agitar la muestra a de 50 a 500 rpm, de 200 a 300 rpm, aproximadamente 50 rpm, aproximadamente 75 rpm, aproximadamente 100 rpm, aproximadamente 125 rpm, aproximadamente 150 rpm, aproximadamente 200 rpm, aproximadamente 225 rpm, aproximadamente 250 rpm, aproximadamente 275 rpm, aproximadamente 300 rpm, aproximadamente 325 rpm, aproximadamente 350 rpm, aproximadamente 375 rpm, aproximadamente 400 rpm, aproximadamente 425 rpm, aproximadamente 450 rpm, aproximadamente 475 rpm o aproximadamente 500 rpm.

9. El método del ejemplo 7, en donde el estrés de agitación comprende agitar la muestra durante 1 a 96 horas, de 24 a 48 horas, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 30 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 42 horas, aproximadamente 48 horas,

aproximadamente 60 horas, aproximadamente 72 horas, aproximadamente 84 horas o aproximadamente 96 horas.

10. El método del ejemplo 7, en donde el estrés de calor comprende almacenar la muestra a aproximadamente 30 °C a aproximadamente 60 °C, aproximadamente 35 °C a aproximadamente 55 °C, aproximadamente 40 °C a aproximadamente 50 °C, aproximadamente 44 °C a aproximadamente 46 °C, aproximadamente 30 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C o aproximadamente 60 °C.

11. El método del ejemplo 10, en donde el almacenamiento es de 1 día a 6 meses, de 3 días a 3 meses, de 1 semana a 2 meses, de 0,5 meses a 1 mes, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 1 semana, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 0,5 meses, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 5 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 7 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 3,5 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 4,5 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 5,5 meses o aproximadamente 6 meses.

12. El método de cualquiera de los ejemplos 2-11, que comprende además someter la muestra con lipasa inactivada a filtración, enriquecimiento o separación cromatográfica para eliminar especies de alto peso molecular (HMW) antes del paso (b).

13. El método del ejemplo 12, en donde la separación cromatográfica comprende cromatografía de intercambio catiónico.

14. El método del ejemplo 12, en donde la separación cromatográfica comprende cromatografía de exclusión por tamaño.

15. El método de cualquiera de los ejemplos 2-14, en donde el paso de formulación comprende agregar excipientes a la muestra.

16. Un método para producir una composición farmacéutica con actividad de lipasa reducida:

- (a) someter el anticuerpo cosechado a cromatografía de afinidad;
- (b) someter el anticuerpo agrupado del eluato del paso (a) a inactivación viral a

un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 y luego ajustar el pH a aproximadamente 5 a aproximadamente 8;

(c) someter el anticuerpo agrupado del paso (b) a cromatografía de intercambio aniónico en modo de flujo continuo;

(d) someter el anticuerpo agrupado del eluato del paso (c) a cromatografía de interacción hidrófoba en modo de flujo continuo;

(e) someter el anticuerpo agrupado de fracciones de flujo continuo del paso (d) a filtración de retención de virus;

(f) someter una muestra del paso (e) que incluye un anticuerpo de interés y una lipasa a estrés de agitación o estrés de calor para formar una composición farmacéutica con actividad de lipasa reducida.

17. Un método para producir una composición farmacéutica con actividad de lipasa reducida:

(a) someter el anticuerpo cosechado a cromatografía de afinidad;

(b) someter el anticuerpo agrupado del eluato del paso (a) a inactivación viral a un pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 4 y luego ajustar el pH a aproximadamente 5 a aproximadamente 8;

(c) someter el anticuerpo agrupado del paso (b) a cromatografía de intercambio aniónico en modo de flujo continuo;

(d) someter el anticuerpo agrupado de fracciones de flujo continuo del paso (c) a filtración de retención de virus;

(e) someter una muestra del paso (d) que incluye un anticuerpo de interés y una lipasa a estrés de agitación o estrés de calor para formar una composición farmacéutica con actividad de lipasa reducida.

18. El método del ejemplo 16 o 17, que comprende además someter la composición farmacéutica a filtración, enriquecimiento o separación cromatográfica para eliminar especies de HMW.

19. El método del ejemplo 18, en donde la separación cromatográfica comprende

cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de exclusión por tamaño.

20. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16-19, en donde un pH de la muestra cargada en la columna AEX está entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 8,3.

21. Un método para producir una composición farmacéutica con mayor estabilidad, que comprende: reducir la actividad de lipasa en una composición al someter una muestra que incluye una proteína de interés y una lipasa a cromatografía de intercambio aniónico (AEX), en donde un pH de la muestra cargada en la columna AEX está entre aproximadamente 7,8 y aproximadamente 8,3.

22. El método del ejemplo 21, que comprende además el paso de someter una muestra formada después de la cromatografía de AEX a estrés de agitación o estrés de calor para reducir la actividad de lipasa.

23. El método de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 16-22, que comprende además la adición de poloxámero 188 o PEG3350 para producir una formulación que comprende una composición farmacéutica con actividad de lipasa reducida y estabilidad aumentada.

24. El método del ejemplo 23, en donde la formulación está sustancialmente libre de polisorbato.

25. El método del ejemplo 23 o 24, en donde una concentración del poloxámero 188 es de 0,005% a 5%, de 0,05% a 2,5%, de 0,1% a 1%, aproximadamente 0,05%, aproximadamente 0,01%, aproximadamente 0,02%, aproximadamente 0,03%, aproximadamente 0,04%, aproximadamente 0,05%, aproximadamente 0,06%, aproximadamente 0,07%, aproximadamente 0,08%, aproximadamente 0,09%, aproximadamente 0,1%, aproximadamente 0,15%, aproximadamente 0,2%, aproximadamente 0,25%, aproximadamente 0,3%, aproximadamente 0,4%, aproximadamente 0,5%, aproximadamente 1%, aproximadamente 1,5%, aproximadamente 2%, aproximadamente 2,5%, aproximadamente 3%, aproximadamente 3,5%, aproximadamente 4%, aproximadamente 4,5% o aproximadamente 5%.

26. El método del ejemplo 23 o 24, en donde una concentración del PEG3350 es de 0,005% a 5%, de 0,05% a 2,5%, de 0,1% a 1%, aproximadamente 0,05%,

aproximadamente 0,01%, aproximadamente 0,02%, aproximadamente 0,03%,
aproximadamente 0,04%, aproximadamente 0,05%, aproximadamente 0,06%,
aproximadamente 0,07%, aproximadamente 0,08%, aproximadamente 0,09%,
aproximadamente 0,1%, aproximadamente 0,15%, aproximadamente 0,2%,
aproximadamente 0,25%, aproximadamente 0,3%, aproximadamente 0,4%,
aproximadamente 0,5%, aproximadamente 1%, aproximadamente 1,5%, aproximadamente 2%,
aproximadamente 2,5%, aproximadamente 3%, aproximadamente 3,5%,
aproximadamente 4%, aproximadamente 4,5% o aproximadamente 5%.

27. Un método para producir una composición farmacéutica con estabilidad aumentada, que comprende:

(a) someter una proteína recombinante cosechada a cromatografía de intercambio aniónico en modo de flujo continuo;

(b) someter las fracciones de flujo continuo del paso (a) a cromatografía de interacción hidrófoba en modo de flujo continuo; y

(c) formular proteína recombinante aislada del paso (b) con polisorbato 80, en donde una concentración de ésteres de ácido oleico en el polisorbato 80 es al menos 80%.

28. El método del ejemplo 27, en donde una concentración de los ésteres de ácido oleico es al menos 98% o al menos 99%.

29. El método de cualquiera de los ejemplos 1 o 16-28, en donde un pH de la muestra cargada en la columna de cromatografía de intercambio aniónico es de aproximadamente 7,8 a aproximadamente 8,3, de aproximadamente 7,9 a aproximadamente 8,2, aproximadamente 7,8, aproximadamente 7,9, aproximadamente 8,0, aproximadamente 8,1, aproximadamente 8,2 o aproximadamente 8,3.