

MÉTODOS PARA REDUCIR LA ACTIVIDAD DE LA LIPASA USANDO ESTRÉS

REFERENCIA CRUZADA A LAS SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reivindica el beneficio de la Solicitud de Patente Provisional Estadounidense No. 63/547,123, presentada el 2 de noviembre de 2023, que se incorpora en este documento por referencia en su totalidad.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Entre los productos farmacéuticos, los bioterapéuticos basados en proteínas son una clase importante de fármacos que ofrecen un alto nivel de selectividad, potencia y eficacia, como es evidenciado por el considerable aumento de los ensayos clínicos con anticuerpos monoclonales (mAbs) durante los últimos años. Un aspecto crítico para que un bioterapéutico sea clínicamente y comercialmente viable es la estabilidad del producto farmacéutico en cuanto al proceso de manufacturación, así como también su vida útil. Los tensioactivos, tales como el polisorbato, se utilizan a menudo para mejorar la estabilidad física de un producto bioterapéutico basado en proteínas. Más del setenta por ciento de los anticuerpos monoclonales terapéuticos 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 del polisorbato ha sido reconocida como la principal ruta de degradación del polisorbato en las formulaciones bioterapéuticas. La degradación del polisorbato puede ser causada por la co-purificación de esterasas o lipasas durante la producción de un producto farmacéutico. La hidrólisis del polisorbato resulta en la liberación de ácidos grasos libres que pueden provocar la formación de partículas indeseables en un producto farmacéutico. Las partículas pueden ser visibles o subvisibles; las partículas subvisibles típicamente tienen un diámetro debajo de 150 micras o 100 micras.

Por lo tanto, existe la necesidad de productos farmacéuticos con actividad reducida de esterasas o lipasas y formación reducida de partículas de ácidos grasos libres, y de métodos para elaborar los mismos.

SUMARIO DE LA INVENCION

Se han desarrollado productos y métodos para reducir la actividad de la esterasa en una composición o formulación, reducir la actividad de la lipasa en una composición o formulación, reducir la degradación del polisorbato y reducir la formación de partículas

de ácidos grasos. En un aspecto, una sustancia farmacéutica formulada que comprende una proteína de interés, un éster de ácido graso y una esterasa o lipasa se somete a estrés, por ejemplo estrés por agitación o estrés térmico, para inactivar la esterasa o lipasa, degradar la esterasa o lipasa, y/o reducir la actividad de la esterasa o lipasa. Estos pueden provocar la formación de especies de alto peso molecular (HMW) de esterasa o lipasa y/o proteína de fármaco. La sustancia puede entonces someterse a filtración, enriquecimiento y/o separación, por ejemplo usando cromatografía de intercambio catiónico o cromatografía de exclusión por tamaño, para eliminar las especies de HMW y producir una sustancia farmacéutica formulada y/o un producto farmacéutico con actividad reducida de esterases o lipasas, degradación reducida de polisorbato, y/o formación reducida de partículas de ácidos grasos libres 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-IL4R α . En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R α es Dupilumab.

Esta descripción proporciona métodos para producir una composición farmacéutica con actividad reducida de lipasa, estabilidad mejorada de éster de ácido graso, degradación reducida de éster de ácido graso y/o formación reducida de partículas de ácido graso. En algunos aspectos ejemplares, estos métodos pueden comprender: (a) someter una muestra que incluye una proteína de interés y una lipasa a condiciones de estrés para formar una muestra con lipasa inactivada; (b) someter tal muestra con lipasa inactivada a un paso de purificación para formar una muestra reducida en HMW; y c) formular tal muestra reducida en HMW con al menos un éster de ácido graso para producir una composición farmacéutica con actividad reducida de lipasa, estabilidad mejorada de polisorbato, degradación reducida de polisorbato y/o formación reducida de partículas de ácido graso en comparación con una composición farmacéutica formulada a partir de una muestra que no se sometió a condiciones de estrés, y en donde tal actividad reducida de lipasa, estabilidad mejorada de polisorbato, degradación reducida de polisorbato y/o formación reducida de partículas de ácido graso se mide después de un periodo de almacenamiento en condiciones de almacenamiento a largo plazo o condiciones de almacenamiento acelerado.

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 específico, la proteína de interés es un anticuerpo anti-IL4R α . En otro aspecto específico, la proteína de interés es Dupilumab.

En un aspecto, las condiciones de estrés incluyen estrés por agitación y/o estrés térmico. En un aspecto específico, el estrés por agitación comprende agitar tal muestra desde 50 a 500 rpm, desde 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 por agitación comprende agitar tal muestra desde 1 a 96 horas, desde 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 térmico comprende almacenar tal muestra desde aproximadamente 25 °C hasta aproximadamente 60 °C, desde aproximadamente 30 °C hasta aproximadamente 60 °C, desde aproximadamente 35 °C hasta aproximadamente 55 °C, desde aproximadamente 40 °C hasta aproximadamente 50 °C, desde aproximadamente 44 °C hasta aproximadamente 46 °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 estrés térmico comprende almacenar tal muestra a tal temperatura desde 1 día hasta 6 meses, desde 3 días hasta 3 meses, desde 1 semana hasta 2 meses, desde 0,5 meses hasta 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 paso de purificación comprende la filtración, el enriquecimiento o la separación cromatográfica. 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 específico adicional, la separación cromatográfica comprende cromatografía de intercambio aniónico. En otro aspecto específico, la separación cromatográfica comprende cromatografía de interacción hidrofóbica.

En un aspecto, el paso de purificación se selecciona para eliminar las especies de HMW. En otro aspecto, el paso de purificación elimina sustancialmente las especies de HMW.

En un aspecto, la muestra reducida en HMW comprende menos de 10%, menos de 5%, menos de 4%, menos de 3%, menos de 2% o menos de 1% de especies de HMW. En otro aspecto, la muestra reducida en HMW comprende menos de 5% de especies de HMW. En otro aspecto, la muestra reducida en HMW comprende un porcentaje de especies de HMW que es aproximadamente el mismo que el porcentaje de especies de HMW en una muestra que no se sometió a condiciones de estrés ni a un paso de purificación.

En un aspecto, el paso de formulación comprende además la adición de excipientes a la muestra reducida en HMW.

En un aspecto, el éster de ácido graso es un polisorbato. En un aspecto específico, el polisorbato es polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60 o polisorbato 80.

En un aspecto, el período de almacenamiento es desde aproximadamente 2 semanas hasta aproximadamente 5 años, desde aproximadamente 2 semanas hasta aproximadamente 3 años, desde aproximadamente 2 semanas hasta aproximadamente 1 año, desde aproximadamente 2 semanas hasta aproximadamente 6 meses, desde aproximadamente 1 mes hasta aproximadamente 5 años, desde aproximadamente 1 mes hasta aproximadamente 3 años, desde aproximadamente 1 mes hasta aproximadamente 1 año, desde aproximadamente 1 mes hasta aproximadamente 6 meses, aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 12 meses, aproximadamente 18 meses, aproximadamente 2 años, aproximadamente 3 años, aproximadamente 4 años,

o aproximadamente 5 años.

En un aspecto, las condiciones de almacenamiento a largo plazo comprenden almacenamiento a una temperatura desde aproximadamente 0 °C hasta aproximadamente 10 °C, aproximadamente 0 °C, aproximadamente 5 °C, o aproximadamente 10 °C. En otro aspecto, las condiciones de almacenamiento acelerado comprenden almacenamiento a una temperatura desde aproximadamente 35 °C hasta aproximadamente 60 °C, desde aproximadamente 45 °C hasta aproximadamente 55 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 40 °C, aproximadamente 45 °C, aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, o aproximadamente 60 °C.

En un aspecto, una medida de la actividad reducida de lipasa y/o de la estabilidad de ésteres de ácidos grasos comprende una cuantificación de la degradación de ésteres de ácidos grasos. En un aspecto específico, la cuantificación comprende un ensayo colorimétrico enzimático para ácidos grasos no esterificados, espectrometría de masas, detección de aerosoles cargados y/o cromatografía líquida. En otro aspecto específico, la cuantificación comprende determinar un porcentaje de éster de ácido graso recuperado de tal composición farmacéutica con actividad reducida de lipasa después de tal periodo de almacenamiento usando detección de aerosol cargado-cromatografía líquida. En un aspecto más específico, el porcentaje es por arriba de 80%, por arriba de 85%, por arriba de 90%, por arriba de 95%, por arriba de 99%, aproximadamente 85%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 99% o aproximadamente 100%.

En un aspecto, una medida de la reducción de la actividad de la lipasa, estabilidad mejorada de ésteres de ácidos grasos, degradación reducida de ésteres de ácido graso y/o formación reducida de partículas de ácidos grasos comprende una cuantificación de partículas por unidad de volumen. En un aspecto específico, las partículas comprenden partículas visibles y/o partículas subvisibles. En otro aspecto específico, las partículas comprenden partículas ≥ 10 μm de diámetro y/o partículas ≥ 25 μm de diámetro. En un aspecto específico adicional, las partículas comprenden partículas de ácidos grasos. En un aspecto específico adicional, la cuantificación comprende el oscurecimiento por luz, microscopía óptica, análisis de imágenes de micro-flujo, citometría de flujo, conteo Coulter y/o el seguimiento de partículas submicrónicas. En otro aspecto específico, un número de partículas por mL en tal composición farmacéutica con actividad reducida de lipasa está por debajo de 500, por debajo de 200, por debajo de 100, por debajo de 50, por debajo de 10 o por debajo de

5.

En un aspecto, la proteína de interés se produce a partir de una célula hospedera recombinante. En un aspecto específico, la célula hospedera recombinante se selecciona a partir de un grupo que consiste de una célula CHO, una célula CHO-K1 y variaciones de las mismas.

En un aspecto, la lipasa es una proteína de la célula hospedera. En otro aspecto, la lipasa tiene una mayor susceptibilidad a la inactivación en condiciones de estrés en comparación con tal proteína de interés.

La presente descripción proporciona además una formulación de proteína que comprende una proteína y al menos un éster de ácido graso elaborado por el método de cualquiera de los aspectos o modalidades anteriores.

Estos y otros aspectos de la invención serán mejor apreciados y entendidos cuando se consideren en conjunto con la siguiente descripción y los dibujos acompañantes. La siguiente descripción, si bien indica diversos aspectos y numerosos detalles específicos de la misma, se presenta a modo de ilustración y no de limitación. Se pueden realizar numerosas sustituciones, modificaciones, adiciones o reordenamientos dentro del alcance de la invención.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las macromoléculas terapéuticas deben formularse de manera que no sólo sean las moléculas adecuadas para administración a pacientes, sino que también mantengan 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 apropiadamente. La estabilidad de un anticuerpo en formulación líquida depende no sólo de los tipos de excipientes usados en la formulación, sino también de las cantidades y proporciones de los excipientes relativos entre sí. Las formulaciones terapéuticas también pueden estar sujetas a la formación de materia particulada con el tiempo durante su almacenamiento. Las partículas pueden ser visibles o subvisibles; las partículas subvisibles típicamente tienen un diámetro por debajo de 150 micras o 100 micras. Las formulaciones que tienen altas concentraciones de proteínas, por *ejemplo*, concentraciones de 30 mg/mL o superiores, son más propensas a la agregación y a la formación de partículas subvisibles.

El polisorbato 20 (PS20) y el polisorbato 80 (PS80) son los tensioactivos no iónicos más comúnmente usados en las formulaciones de proteínas biofarmacéuticas

para mejorar la estabilidad de las proteínas y proteger los productos de proteína de la agregación y la 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 reportado de que los polisorbatos, que incluyen el polisorbato 20 y el polisorbato 80, pueden degradarse en presencia de lipasa, lo que con el tiempo resulta en la formación de partículas subvisibles en una formulación.

Se conoce que los polisorbatos (PS) pueden ser capaz de degradarse por dos trayectorias principales: autooxidación e hidrólisis (Dwivedi *et al.*; Kishore *et al.*, *Pharm Res.* 28(5): 1194-1210 (2011); Larson *et al.*, *J Pharm Sci.* 109(10): 633-639 (2020); Kishore *et al.* *J Pharm Sci.* 100(2): 721-731 (2011)). Se considera que la hidrólisis enzimática es la principal ruta de degradación de la PS en formulaciones de proteínas de alta concentración, lo que resulta en la acumulación de ácidos grasos libres (FFA) que pueden conducir a la formación de partículas indeseables en los productos farmacéuticos. La oxidación es la segunda trayectoria primaria de degradación de la PS, que conduce a la formación de peróxidos, aldehídos, cetonas y especies de sorbitán/isorbida de 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.* *Pharm Res.* 26(10): 2303-2313 (2009)). La hidrólisis de PS se ha reconocido como una amenaza mayor para la calidad del producto farmacéutico porque este proceso no sólo reduce la concentración de PS, sino que también está asociada 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 Sci.* 110(3): 1093-1102 (2021); Doshi *et al.* *Mol Pharm.* 12(11): 3792-3804 (2015)).

Las lipasas o esterasas residuales presentes en el producto farmacéutico son la principal causa de la hidrólisis de la 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)). Véase también la Solicitud de Patente Estadounidense No. 18/310,921, cuya enseñanza completa se incorpora en este documento por referencia. Los niveles de lipasas residuales en el producto farmacéutico final usualmente son muy bajos (< 10 ppm) después de múltiples pasos de purificación posterior, y las consecuencias de la degradación de la PS pueden no ser perceptibles hasta después de un almacenamiento de meses o años a las temperaturas típicas de almacenamiento

(2 °C-8 °C).

Sin pretender estar ligado a la teoría, se cree que una fosfolipasa B similar a 2 putativa (PLBL2), la cual es altamente conservada en hámster, rata, ratón, humano y bovino, se copurifica con algunas clases de proteínas bajo ciertos procesos. Otras esterases o lipasas también pueden copurificarse con las proteínas de interés a concentraciones también demasiado bajas para ser detectadas de forma confiable pero lo suficientemente altas como para tener una actividad de lipasa medible, lo que eventualmente resulta en una pérdida de polisorbato, producción de ácidos grasos libres y formación de partículas visibles o subvisibles. Por lo tanto, existe la necesidad de productos farmacéuticos con actividad reducida de lipasa, actividad reducida de esterasa y formación reducida de partículas de ácidos grasos, y métodos para manufacturar los mismos.

Se describen en este documento nuevos producto farmacéuticos, composiciones y formulaciones con actividad reducida de lipasa, actividad reducida de esterasa y formación reducida de partículas de ácidos grasos, y métodos para manufacturar los mismos. Los inventores han descubierto de manera sorprendente que las esterases o lipasas co-purificadas pueden ser inactivadas y/o eliminadas de manera exitosa usando la aplicación de estrés, por ejemplo estrés por agitación o estrés térmico, que pueden hacer que las esterases o lipasas se degraden, reduciendo la actividad de lipasa. La aplicación de estrés también puede conducir a la formación de especies de alto peso molecular (HMW). Las especies de HMW pueden eliminarse de la sustancia farmacéutica usando, por ejemplo, filtración de peso molecular o cromatografía, tal como la cromatografía de intercambio catiónico o la cromatografía de exclusión por tamaño. Estos y otros aspectos de la invención se exponen en más detalle a continuación.

A menos que se describa de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por uno de habilidad ordinaria en la técnica a la cual esta invención pertenece. Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en este documento pueden ser usados en la práctica o ensayos, ahora se describen métodos y materiales particulares.

El término “un” debe entenderse por significar “al menos uno”, y los términos “alrededor de” y “aproximadamente” deben entenderse como que permiten la variación estándar que podrían entender aquellos de habilidad ordinaria en la técnica, y cuando se proporcionan rangos, se incluyen los puntos finales. Como se usa en este documento, los términos “incluyen”, “incluye”, e “incluyendo” se entiende que no son

limitantes y se entienden por significar “comprenden”, “comprende” y “que comprende”, respectivamente.

Como se usa en este documento, el término “proteína” o “proteína de interés” puede incluir cualquier polímero de aminoácido que tiene enlaces amida covalentemente enlazados. Las proteínas comprenden una o más cadenas poliméricas de aminoácidos, en general conocidas en la técnica como “polipéptidos”. El “polipéptido” se refiere a un polímero compuesto por residuos de aminoácidos, variantes estructurales que se originan de manera natural relacionadas, y análogos sintéticos de los mismos que no se originan de manera natural, enlazados mediante uniones de polipéptidos. Un “péptido o polipéptido sintético” se refiere a un péptido o polipéptido que no se origina de manera natural. Los péptidos o polipéptidos sintéticos pueden sintetizarse, por ejemplo, usando un sintetizador automático de polipéptidos. Varios métodos de síntesis de péptidos en fase sólida se conocen por aquellos de habilidad en la técnica. Una proteína puede comprender uno o múltiples polipéptidos para formar una biomolécula funcional única. En otro aspecto ejemplar, una proteína puede incluir fragmentos de anticuerpos, nanocuerpos, quimeras de anticuerpos recombinantes, citocinas, quimiocinas, hormonas de polipéptidos, y similares. Las proteínas de interés pueden incluir cualquiera de proteínas bioterapéuticas, proteínas recombinantes usadas en investigación o terapia, proteínas trampa y otras proteínas de fusión Fc de receptores quiméricos, proteínas quiméricas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos humanos, anticuerpos biespecíficos y proteínas de unión al antígeno.

Las proteínas pueden producirse usando sistemas de producción basados en células recombinantes, tales como el sistema de baculovirus de insectos, sistemas de levadura (*por ejemplo*, *Pichia* sp.) y sistemas de mamíferos (*por ejemplo*, células CHO y derivados de CHO como las células CHO-K1). Para una revisión reciente que discute las proteínas bioterapéuticas y su producción, véase 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 y GENETIC ENGINEERING REVIEWS 147–176 (2012), las enseñanzas completas de las cuales se incorporan en este documento por referencia). En algunos aspectos, las proteínas comprenden modificaciones, aductos y otras fracciones covalentemente unidas. Estas modificaciones, aductos y fracciones 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), epítipo myc, etiquetas fluorescentes y otros tintes, y similares. Las proteínas se pueden clasificar con base en composiciones y solubilidad y, de este modo, pueden incluir proteínas simples, tales como proteínas globulares y proteínas fibrosas; proteínas conjugadas, tales como nucleoproteínas, glicoproteínas, mucoproteínas, cromoproteínas, fosfoproteínas, metaloproteínas y lipoproteínas; y proteínas derivadas, tales como proteínas derivadas primarias y proteínas derivadas secundarias.

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

ANTICUERPOS

El término "anticuerpo", como se usa en este documento, en general está propuesto para referirse a las moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos: dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, así como también multímeros de las mismas (*por ejemplo*, IgM); sin embargo, las moléculas de inmunoglobulina que consisten únicamente de 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 este documento 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 este documento 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 pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas,

denominadas regiones de armazón (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el amino-terminal al 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 este documento, está propuesto para incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la descripción pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (*por ejemplo*, mutaciones introducidas usando mutagénesis específica del sitio o aleatoria *in vitro* o usando mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDRs y en particular CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", como se usa en este documento, no pretende incluir anticuerpos en donde secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como el ratón, se han injertado en secuencias de armazón humanas.

La interleucina-4 (IL-4) y la interleucina-13 (IL-13) son citocinas clave en la conducción de procesos inflamatorios alérgicos y polarizados por células T auxiliaadoras tipo 2 (Th2). La señalización de IL-4 y la IL-13 está mediada a través de complejos del receptor heterodimérico, en los que el receptor alfa de IL-4 (IL-4R α) es una subunidad del receptor compartida para la señalización tanto de IL-4 como de IL-13. De este modo, IL-4R α es un objetivo terapéutico atractivo porque proporciona un objetivo único para bloquear tanto la señalización de IL-4 como de 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 para hIL-4R α se describen, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 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 de isotipo mezclado. 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 discutidos anteriormente o en este documento, el anticuerpo anti-IL-4R puede comprender una cadena ligera kappa humana. En cualquiera de los aspectos discutidos anteriormente o en este documento, el anticuerpo anti-IL-4R puede comprender una cadena ligera lambda humana.

Los anticuerpos de la descripción pueden, en algunos aspectos, ser anticuerpos humanos recombinantes. El término "anticuerpo humano recombinante", como se usa este documento, está propuesto para incluir todos los anticuerpos humanos que se

preparan, expresan, crean o aíslan por medios métodos recombinantes, tales como los 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 involucre el empalme de secuencias del gen de la inmunoglobulina humana con otras secuencias de ADN. Dichos anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En ciertos aspectos, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, a mutagénesis somática *in vivo*) y, de este modo, las secuencias de aminoácidos de las regiones de V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien se derivan de y están relacionadas con las secuencias de V_H y V_L de la línea germinal humana, pueden no existir de forma natural dentro del repertorio de la línea germinal de anticuerpo humano *in vivo*.

El término “anticuerpo”, como se usa en este documento, también incluye los fragmentos de unión al antígeno de las moléculas de anticuerpo completo. Los términos “porción de unión al antígeno” de un anticuerpo, “fragmento de unión al antígeno” de un anticuerpo, y similares, como se usa en este documento, incluyen cualquier polipéptido o glicoproteína que se origina de manera natural, obtenible enzimáticamente, sintético o modificado por ingeniería genética que se une específicamente a un antígeno para formar un complejo. Los fragmentos de unión al antígeno de un anticuerpo pueden derivarse, por ejemplo, de moléculas de anticuerpos completos usando cualquiera de las técnicas estándares adecuadas, tales como la digestión proteolítica o las técnicas de ingeniería genética recombinante que involucran la manipulación y expresión del ADN que codifica los dominios variables y, opcionalmente, constantes del anticuerpo. Tal ADN es conocido y/o está fácilmente disponible, por ejemplo, en fuentes comerciales, bibliotecas de ADN (incluidas, *por ejemplo*, las bibliotecas de fagos-anticuerpos), o puede sintetizarse. El ADN puede secuenciarse y manipularse químicamente o mediante técnicas de biología molecular, por ejemplo, para disponer uno o más dominios variables y/o constantes en una configuración adecuada, o para introducir codones, crear residuos de cisteína, modificar, añadir o eliminar aminoácidos, etc.

Como se usa en este documento, un “fragmento de anticuerpo” incluye una porción de un anticuerpo intacto, tal como, por ejemplo, la región variable o de unión al antígeno de un anticuerpo. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpos 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 aislada determinante de complementariedad (CDR), así como tri-cuerpos, tetracuerpos, anticuerpos lineales, moléculas de anticuerpo de cadena simple y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Los fragmentos Fv son la combinación de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulina, y las proteínas ScFv son moléculas de polipéptidos recombinantes de cadena sencilla en las que las regiones variables de las cadenas ligeras y pesadas de inmunoglobulina están conectadas por un enlazador peptídico. En algunos aspectos, un fragmento de anticuerpo comprende una secuencia de aminoácidos suficiente del anticuerpo precursor del cual es un fragmento para que se una al mismo antígeno como lo hace el anticuerpo precursor; en algunos aspectos, un fragmento se une al antígeno con una afinidad comparable a aquella del anticuerpo precursor y/o compite con el anticuerpo precursor por la unión al antígeno. Un fragmento de anticuerpo puede producirse por cualquier medio. Por ejemplo, un fragmento de anticuerpo puede producirse enzimáticamente o químicamente producido por la fragmentación de un anticuerpo intacto y/o puede producirse recombinantemente a partir de un gen que codifica la secuencia parcial del anticuerpo. Alternativamente, o adicionalmente, un fragmento de anticuerpo puede producirse completamente o parcialmente de forma sintética. Un fragmento de anticuerpo puede comprender opcionalmente un fragmento de anticuerpo de una cadena sencilla. Alternativamente, o adicionalmente, un fragmento de anticuerpo puede comprender cadenas múltiples que están ligadas en conjunto, por ejemplo, usando 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 en general comprenden dos cadenas pesadas diferentes, con cada una de las cuales se une específicamente a un epítipo distinto -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 epítomos diferentes (un primer epítomo y un segundo epítomo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítomo será en general al menos de una, dos, tres o cuatro órdenes de magnitud menor que la afinidad de la primera cadena pesada por el segundo epítomo, y viceversa. Los epítomos reconocidos por el anticuerpo biespecífico pueden estar en el mismo objetivo o en uno diferente (*por ejemplo*, en la misma proteína o en una proteína diferente). Los anticuerpos biespecíficos pueden elaborarse, por ejemplo, combinando las cadenas pesadas que reconocen diferentes epítomos del mismo antígeno. Por ejemplo, las secuencias de ácidos nucleicos que codifican secuencias variables de cadena pesada que reconocen diferentes epítomos del mismo antígeno pueden fusionarse con secuencias de ácidos nucleicos que codifican diferentes regiones constantes de cadena pesada, y tales secuencias pueden expresarse en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina.

Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas, cada una tiene tres CDR de cadena pesada, seguidas de un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que ya sea no confiere especificidad de unión al 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 epítomos unidos por las regiones de unión al 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 epítomos. Los BsAbs se pueden dividir en dos clases principales, aquellos que llevan una región Fc (similar a la IgG) y aquellos que carecen de una región Fc, estos últimos normalmente son más pequeños que las moléculas biespecíficas IgG y similares a la IgG que comprenden una Fc. Los bsABs similares a IgG pueden tener diferentes formatos, tales como pero no limitados a, triomab, IgG de botón en ojal (kih IgG), crossMab, ort-Fab IgG, Ig de dominios variables duales (DVD-Ig), Fab de acción dual o dos en uno (DAF), IgG-scFv de cadena sencilla (IgG-scFv) o cuerpos $\kappa\lambda$. Los diferentes formatos no similares a IgG incluyen scFv en serie, formato de diacuerpo, diacuerpo de cadena sencilla, diacuerpos en serie (TandAbs), molécula de reobjetivo de afinidad Dual (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 Müller & Roland E. Kontermann, Bispecific Antibodies, HANDBOOK OF THERAPEUTIC ANTIBODIES 265–310 (2014), las enseñanzas completas de las cuales se incorporan en este documento). Los métodos de producción de bsAbs no se limitan

a la tecnología de quadroma basada en la fusión somática de dos líneas celulares de hibridoma diferentes, la conjugación química, que involucra reticuladores químicos, y los procedimientos genéticos que utilizan tecnología de ADN recombinante.

Como se usa en este documento "anticuerpo multiespecífico" se refiere a un anticuerpo con especificidades de unión para al menos dos antígenos diferentes. Si bien tales moléculas normalmente solo se unirán a dos antígenos (*es decir*, anticuerpos biespecíficos, bsAbs), los anticuerpos con especificidades adicionales, tales como anticuerpos trispecíficos y KIH Triespecíficos también pueden ser abordados por el sistema y métodos descritos en este documento.

El término "anticuerpo monoclonal" como se usa en este documento no está limitado a los anticuerpos producidos a través de la tecnología de hibridoma. Un anticuerpo monoclonal puede derivarse de un clon único, incluyendo cualquier clon eucariótico, procariótico o de fago, por cualquier método disponible o conocido en la técnica. Los anticuerpos monoclonales útiles para la presente invención pueden prepararse usando una amplia variedad de técnicas conocidas en el arte, incluyendo 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 este documento, está propuesto para 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 al antígeno del mismo forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una constante de disociación de al menos 1×10^{-6} M o mayor. Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, la diálisis de equilibrio, la resonancia de plasmón de superficie y similares. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a la hIL-4R α , puede sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como las moléculas de IL-4R α de otras especies (ortólogos). En el contexto de la presente descripción, anticuerpos multiespecíficos (*por ejemplo*, biespecíficos) que se unen a hIL-4R α así como a uno o más antígenos adicionales son considerados como que "se unen específicamente" a hIL-4R α . Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas. Sin embargo, en

algunos casos, el anticuerpo aislado puede copurificarse 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.

Por ejemplo, para la producción de anticuerpos, algunos aspectos de las invenciones son susceptibles de investigación y producción para el diagnóstico y la terapéuticos basados en las principales clases de anticuerpos, es decir, IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. La IgG es la clase preferida e incluye las subclases IgG1 (incluyendo IgG1 λ y IgG1 κ), IgG2, IgG3, y IgG4. En algunos aspectos, la proteína de interés o polipéptido de interés es un anticuerpo, un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo multiespecífico, un anticuerpo biespecífico, un fragmento de anticuerpo, un fragmento de anticuerpo de unión al antígeno, un anticuerpo de cadena sencilla, un diacuerpo, triacuerpo o tetracuerpo, un fragmento Fab o un fragmento F(ab')₂, un anticuerpo IgD, un anticuerpo IgE, un anticuerpo IgM, un anticuerpo IgG, un anticuerpo IgG1, un anticuerpo IgG2, un anticuerpo IgG3, un anticuerpo IgG4, una proteína de fusión, una proteína de fusión de receptor, una proteína derivada de anticuerpo, o combinaciones de los mismos. En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1. En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2. En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo IgG4. En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2/IgG4 quimérico. En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2/IgG1 quimérico. En un aspecto, el anticuerpo es un anticuerpo IgG2/IgG1/IgG4 quimérico. También se incluyen derivados, componentes, dominios, cadenas, y fragmentos de los anteriores.

En algunos aspectos, el anticuerpo se selecciona a partir del grupo que consiste de un anticuerpo anti-Muerte Celular Programada 1 (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-PD1 como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente No. US2015/0203579A1), un anticuerpo anti-Ligando de Muerte Celular Programada-1 (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-PD-L1 como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente No. US2015/0203580A1), un anticuerpo anti-DII4, un anticuerpo anti-Angiopoyetina-2 (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-ANG2 como se describe en la Patente Estadounidense No. 9,402,898), un anticuerpo anti-Angiopoyetina-Similar a 3 (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-AngPtI3 como se describe en la Patente Estadounidense No. 9,018,356), un anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-PDGFR como se describe en la Patente Estadounidense No. 9,265,827), un anticuerpo anti-Erb3, un anticuerpo anti-Receptor de Prolactina (*por ejemplo*, anticuerpo anti-PRLR como se describe en la Patente

Estadounidense No. 9,302,015), un anticuerpo anti-Complemento 5 (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-C5 como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. US2015/0313194A1), un anticuerpo anti-TNF, un anticuerpo anti-receptor del factor de crecimiento epidermal (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-EGFR como se describe en la Patente Estadounidense No. 9,132,192 o un anticuerpo anti-EGFRvIII como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. US2015/0259423A1), un anticuerpo anti-Proteína Convertasa de Subtilisina Kexina-9 (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-PCSK9 como se describe en la Patente Estadounidense No. 8,062,640 o Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. US2014/0044730A1), un anticuerpo anti-Factor 8 de Crecimiento y Diferenciación (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-GDF8, también conocido como anticuerpo anti-miostatina, como se describe en las Patentes Estadounidenses Nos. 8,871,209 o 9,260,515), un anticuerpo anti-Receptor de Glucagón (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-GCGR como se describe en las Publicaciones de Solicitud de Patentes Estadounidenses Nos. US2015/0337045A1 o US2016/0075778A1), un anticuerpo anti-VEGF, un anticuerpo anti-IL1R, un anticuerpo del receptor de interleucina 4 (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-IL4R como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. US2014/0271681A1 o Patentes Estadounidenses Nos. 8,735,095 u 8,945,559), un anticuerpo anti-receptor de interleucina 6 (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-IL6R como se describe en las Patentes Estadounidenses Nos. 7,582,298, 8,043,617 o 9,173,880), un anticuerpo anti-IL1, un anticuerpo anti-IL2, un anticuerpo anti-IL3, un anticuerpo anti-IL4, un anticuerpo anti-IL5, un anticuerpo anti-IL6, un anticuerpo anti-IL7, una anti-interleucina 33 (*por ejemplo*, anticuerpo anti-IL33 como se describe en las Publicaciones de Solicitudes de Patentes Estadounidenses Nos. US2014/0271658A1 o US2014/0271642A1), un anticuerpo anti-Cluster de diferenciación 3 (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-CD3, como se describe en las Publicaciones de Solicitudes de Patentes Estadounidenses Nos. US2014/0088295A1 y US20150266966A1, y en la Solicitud Estadounidense No. 62/222,605), un anticuerpo anti-Cluster de diferenciación 20 (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-CD20 como se describe en las Publicaciones de Solicitudes de Patentes Estadounidenses Nos. US2014/0088295A1 y US20150266966A1, y en la Patente Estadounidense No. 7,879,984), un anticuerpo anti-CD19, un anticuerpo anti-CD28, un anticuerpo anti-Cluster de Diferenciación-48 (*por ejemplo*, el anticuerpo anti-CD48 como se describe en la Patente Estadounidense No. 9,228,014), un anticuerpo anti-Fel d1 (*por ejemplo*, como se describe en la Patente Estadounidense No. 9,079,948), un anticuerpo anti-virus de la

influenza, un anticuerpo anti-virus Sincitial Respiratorio (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-RSV como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. US2014/0271653A1), un anticuerpo anti-virus del Síndrome Respiratorio de Oriente Medio (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-MERS-CoV descrito como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. US2015/0337029A1), un anticuerpo anti-virus del Ébola (*por ejemplo*, como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. US2016/0215040), un anticuerpo anti-virus del Zika, un anticuerpo anti-Síndrome Respiratorio Agudo Severo (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-SARS-CoV), un anticuerpo anti-COVID-19 (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-SARS-CoV-2), un anticuerpo anti-Gen 3 de Activación del Linfocito (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-LAG3, o un anticuerpo anti-CD223), un anticuerpo anti-Factor de Crecimiento del Nervio (*por ejemplo*, un anticuerpo anti-NGF como se describe en la Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. US2016/0017029 y Patentes Estadounidenses Nos. 8,309,088 y 9,353,176) y un anticuerpo anti-Activina A. En algunos aspectos, el anticuerpo biespecífico se selecciona a partir del grupo que consiste de un anticuerpo biespecífico anti-CD3×anti-CD20 (como se describe en las Publicaciones de Solicitudes de Patentes Estadounidenses Nos. US2014/0088295A1 y US20150266966A1), un anticuerpo biespecífico anti-CD3×anti-Mucina 16 (*por ejemplo*, un anticuerpo biespecífico anti-CD3×anti-Muc16), un anticuerpo biespecífico anti-CD3×BCMA, y un anticuerpo biespecífico anti-CD3×anti-antígeno de la membrana específico de la próstata (*por ejemplo*, un anticuerpo biespecífico anti-CD3×anti-PSMA). Véase también la Publicación de Patente Estadounidense No. US 2019/0285580 A1. También se incluyen un anticuerpo Met×Met, un anticuerpo agonista de NPR1, un anticuerpo agonista de LEPR, un anticuerpo MUC16×CD28, un anticuerpo GITR, un anticuerpo IL-2Rg, un anticuerpo EGFR×CD28, un anticuerpo del Factor XI, anticuerpos contra variantes del SARS-CoV-2, una terapia de multi-anticuerpos Fel d 1 y una terapia de multi-anticuerpos Bet v 1. También se incluyen derivados, componentes, dominios, cadenas y fragmentos de los anteriores. En un aspecto, la proteína de interés o el polipéptido de interés comprende una combinación de cualquiera de los anteriores.

Las células que producen anticuerpos ejemplares pueden ser cultivadas de conformidad con las invenciones. En algunos aspectos, la proteína de interés o polipéptido de interés se selecciona a partir del grupo que consiste de Alirocumab, Atoltivimab, Maftivimab, Odesivimab, Odesivimab-ebgn, Casirivimab, Imdevimab, Cemprimab and Cemprimab-rwlc (anticuerpo monoclonal humano IgG4 que se une a PD-1), Sarilumab, Fasinumab, Nesvacumab, Dupilumab (anticuerpo monoclonal

humano de la subclase IgG4 que se une a la subunidad alfa (α) del IL-4R y, por tanto, inhibe la señalización de la interleucina 4 (IL-4) y la interleucina 13 (IL-13)), TTrevogrumab, Evinacumab, Evinacumab-dgnb, Fianlimab, Garetosmab, Itepekimab, Odrnonextamab, Pozelimab, Rinucumab, y modificaciones, truncaciones, y variaciones de los mismos.

Anticuerpos ejemplares adicionales incluyen Ravulizumab-cwvz, Abciximab, Adalimumab, Adalimumab-atto, Ado-trastuzumab, Alemtuzumab, Atezolizumab, Avelumab, Basiliximab, Belimumab, Benralizumab, Bevacizumab, Bezlotoxumab, Blinatumomab, Brentuximab vedotin, Brodalumab, Canakinumab, Capromab pendetide, Certolizumab pegol, Cetuximab, Denosumab, Dinutuximab, Durvalumab, Eculizumab, Elotuzumab, Emicizumab-kxwh, Emtansine alirocumab, Evolocumab, Golimumab, Guselkumab, Ibritumomab tiuxetan, Idarucizumab, Infliximab, Infliximab-abda, Infliximab-dyyb, Ipilimumab, Ixekizumab, Mepolizumab, Necitumumab, Nivolumab, Obiltoxaximab, Obinutuzumab, Ocrelizumab, Ofatumumab, Olaratumab, Omalizumab, Panitumumab, Pembrolizumab, Pertuzumab, Ramucirumab, Ranibizumab, Raxibacumab, Reslizumab, Rinucumab, Rituximab, Secukinumab, Siltuximab, Tocilizumab, Trastuzumab, Ustekinumab, y Vedolizumab.

Además de los productos de próxima generación, las invenciones también son aplicables a la producción de biosimilares. Los biosimilares se definen de diversas maneras dependiendo de la jurisdicción, pero comparten la característica común de comparación con un producto biológico previamente aprobado en tal jurisdicción, usualmente referido como un "producto de referencia". De conformidad con la Organización Mundial de la Salud, un biosimilar es un producto bioterapéutico similar a un producto bioterapéutico de referencia ya autorizado en términos de calidad, seguridad y eficacia, y se usa en muchos países, tales como en Filipinas.

Un biosimilar en los Estados Unidos se define actualmente como (A) un producto biológico que es muy similar al producto de referencia, a pesar de pequeñas diferencias en componentes clínicamente inactivos; y (B) sin diferencias clínicamente significativas entre el producto biológico y el producto de referencia en términos de seguridad, pureza y potencia del producto. En los Estados Unidos, un biosimilar o producto intercambiable puede ser sustituido por el producto anterior sin la intervención del profesional sanitario que prescribió el producto previo. En la Unión Europea, un biosimilar es un medicamento biológico altamente similar a otro medicamento biológico ya aprobado en la EU (denominado "medicamento de referencia") e incluye consideraciones de estructura, actividad biológica, eficacia y seguridad, entre otras cosas, y estas directrices

también se siguen en Rusia. En China, un producto biosimilar se actualmente se refiere a productos biológicos que contienen sustancias activas similares al fármaco biológico original y que son similares al fármaco original en términos de calidad, seguridad, y eficacia, sin diferencias clínicamente significativas. En Japón, un biosimilar actualmente es un producto que tiene una calidad, calidad, seguridad y eficacia equivalentes de la calidad/bioequivalentes, a un producto de referencia ya aprobado en Japón. En India, los biosimilares actualmente son referidos como "biológicos similares", y se refieren a un producto biológico similar en términos de calidad, seguridad y eficacia a un producto biológico de referencia aprobado, con base en la comparabilidad. En Australia, un medicamento biosimilar actualmente es una versión altamente similar a un medicamento biológico de referencia. En México, Colombia y Brasil, un biosimilar actualmente es un producto bioterapéutico que es similar en términos de calidad, seguridad y eficacia a un producto de referencia ya autorizado. En Argentina, un biosimilar actualmente se deriva de un producto original (un comparador) con el que tiene características comunes. En Singapur, un biosimilar actualmente es un producto terapéutico biológico que es similar a un producto biológico existente registrado en Singapur en términos de características fisicoquímicas, actividad biológica, seguridad y eficacia. En Malasia, un biosimilar actualmente es un nuevo producto medicinal biológico desarrollado para ser similar en términos de calidad, seguridad y eficacia a un producto farmacéutico ya registrado y bien establecido. En Canadá, un biosimilar actualmente es un fármaco biológico altamente similar a un fármaco biológico ya autorizado para su venta. En Sudáfrica, un biosimilar actualmente es un medicamento biológico desarrollado para ser similar a un medicamento biológico ya aprobado para uso humano. La producción de biosimilares y sus sinónimos, bajo estas y cualquier definición revisada, puede realizarse de conformidad con las invenciones.

De conformidad con ciertos aspectos de la presente descripción, el anticuerpo anti-hIL-4R, o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada HCDR1-HCDR2-HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEC ID NOs: 3-4-5. De conformidad con ciertos aspectos de la presente descripción, el anticuerpo anti-hIL-4R, o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEC ID NOs: 6-7-8. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-hIL-4R, o el fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende las CDRs HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-

LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEC ID NOs: 3-4-5-6-7-8.

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

En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-hIL-4R, o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 1. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-hIL-4R, o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 2. En ciertos aspectos, el anticuerpo anti-hIL-4R, o fragmento de unión al antígeno del mismo, comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEC ID NOs: 1/2. En algunos

aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R comprende una HCVR/LCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEC ID NOs: 1/2, respectivamente, y una región constante de cadena pesada IgG1 humana. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R comprende una HCVR/LCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEC ID NOs: 1/2, respectivamente, y una región constante de cadena pesada IgG4 humana. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R comprende una HCVR/LCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEC ID NOs: 1/2, respectivamente, y una región constante de cadena pesada IgG humana. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R comprende una HCVR/LCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEC ID NOs: 1/2, respectivamente, y una región constante de cadena pesada IgG1 o IgG4 humana. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEC ID NO: 10. En algunos aspectos, el anticuerpo anti-IL-4R es dupilumab.

Otros anticuerpos anti-IL-4R que pueden usarse en el contexto de los métodos de la presente descripción 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 MEDI 9314, o cualquiera de los anticuerpos anti-IL-4R α como se exponen en la Patente Estadounidense No. 7,186,809, Patente Estadounidense No. 7,605,237, Patente Estadounidense No. 7,638,606, Patente Estadounidense No. 8,092,804, Patente Estadounidense No. 8,679,487, Patente Estadounidense No. 8,877,189, Patente Estadounidense No. 10,774,141; Publicación de Solicitud de Patente Estadounidense No. US2021/0238294; o Publicaciones de Patentes Internacionales Nos. WO2019/228405, WO2020/096381, WO 2020/135471, WO2020/135710, o WO 2020/239134, contenidos de cada una de las cuales se incorporan por referencia en este documento.

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

La cantidad de anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, contenida en las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción puede variar dependiendo de las propiedades específicas deseadas de las formulaciones, así como también de las circunstancias y propósitos particulares para los que se pretenden usar las formulaciones. En ciertos aspectos, las formulaciones farmacéuticas pueden contener aproximadamente 1 mg/mL hasta aproximadamente 500 mg/mL de anticuerpo; aproximadamente 5 mg/mL hasta aproximadamente 250 mg/mL de anticuerpo;

aproximadamente 5 mg/mL hasta aproximadamente 200 mg/mL de anticuerpo; aproximadamente 15 mg/mL hasta aproximadamente 200 mg/mL de anticuerpo; aproximadamente 25 mg/mL hasta aproximadamente 200 mg/mL de anticuerpo; aproximadamente 50 mg/mL hasta aproximadamente 200 mg/mL de anticuerpo; aproximadamente 100 mg/mL hasta aproximadamente 200 mg/mL de anticuerpo; aproximadamente 125 mg/mL hasta aproximadamente 175 mg/mL de anticuerpo; o aproximadamente 150 mg/mL hasta aproximadamente 200 mg/mL de anticuerpo. Por ejemplo, las formulaciones de la presente descripción 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; aproximadamente 190 mg/mL; aproximadamente 195 mg/mL; o aproximadamente 200 mg/mL de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo que se une específicamente a hIL-4R α . En ciertos aspectos, las formulaciones farmacéuticas son formulaciones líquidas que pueden contener $5 \pm 0,5$ mg/mL hasta 200 ± 20 mg/mL de anticuerpo; $15 \pm 1,5$ mg/mL hasta 200 ± 20 mg/mL de anticuerpo; $25 \pm 2,5$ mg/mL hasta 200 ± 20 mg/mL de anticuerpo; 50 ± 5 mg/mL hasta 200 ± 20 mg/mL de anticuerpo; 100 ± 10 mg/mL hasta 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 mg/mL ± 5 mg/mL a 185 mg/mL ± 5 mg/mL del anticuerpo anti-IL-4R. En algunos casos, las formulaciones farmacéuticas contienen 150 mg/mL ± 5 mg/mL del anticuerpo anti-IL-4R. En algunos

casos, las formulaciones farmacéuticas contienen $175 \text{ mg/mL} \pm 5 \text{ mg/mL}$ del anticuerpo anti-IL-4R.

La presente descripción abarca anticuerpos que tienen secuencias de aminoácidos que varían de aquellas de las moléculas ejemplares descritas en este documento pero que retienen la capacidad de unirse al antígeno cognado, por ejemplo hIL-4R. Tales moléculas variantes pueden comprender una o más adiciones, supresiones o sustituciones de aminoácidos en comparación con la secuencia original, pero presentan una actividad biológica esencialmente equivalente a aquella de los anticuerpos descritos en este documento.

La presente descripción incluye moléculas de unión al antígeno que son bioequivalentes a cualquiera de los anticuerpos ejemplares expuestos en este documento. En algunos aspectos, la molécula de unión al antígeno es un bioequivalente de dupilumab. Dos anticuerpos se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya tasa y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, ya sea en dosis única o múltiple. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en su grado de absorción pero no en su tasa de absorción y, aún pueden considerarse bioequivalentes porque tales diferencias en la tasa de absorción son intencionadas y se reflejan en el etiquetado, no son esenciales para alcanzar concentraciones corporales efectivas del fármaco en, por *ejemplo*, el uso crónico, y se consideran insignificantes desde el punto de vista médico para producto farmacéutico 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 puede ser cambiado una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, incluyendo un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o disminución de la eficacia, en comparación con la terapia continuada sin tal cambio.

La bioequivalencia puede demostrarse usando métodos *in vivo* e *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) un ensayo *in vivo* en humanos u otros mamíferos, en donde se mide la concentración del anticuerpo o sus metabolitos en sangre, plasma, suero u otro fluido biológico como una función del tiempo; (b) un ensayo *in vitro* que se ha correlacionado con los datos de biodisponibilidad *in vivo* en

humanos y es razonablemente predictivo de los mismos; (c) un ensayo *in vivo* en humanos u otros mamíferos en donde se mide el efecto farmacológico agudo apropiado del anticuerpo (o su objetivo) como una función del tiempo; y (d) un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia, o biodisponibilidad o bioequivalencia de una proteína de unión al antígeno.

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Como se usa en este documento, una "muestra" puede obtenerse de cualquier paso de un bioproceso, tal como el fluido de cultivo celular (CCF), el fluido de cultivo celular recolectado (HCCF), cualquier paso del procesamiento posterior, la sustancia farmacéutica (DS) o un producto farmacéutico (DP) que comprende el producto formulado final.

Los términos "composición", "formulación" y "sustancia farmacéutica formulada" (FDS), como se usan en la presente descripción, se refieren a una combinación de dos o más ingredientes farmacéuticos para su inclusión en un producto farmacéutico. 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, tales como proteínas de células hospederas co-purificadas con una proteína de interés.

El término "producto farmacéutico" (DP), como se usa en la presente descripción, se refiere a una forma de dosificación que comprende una cantidad de un FDS para su envasado, envío, o administración. Por ejemplo, un producto farmacéutico puede ser una jeringa precargada que contenga un volumen de FDS para administración a un paciente.

Como se usa en este documento, un "producto farmacéutico de proteína", "producto biofarmacéutico", "formulación farmacéutica", "composición farmacéutica" o "bioterapéutico" incluye un ingrediente activo que puede ser totalmente o parcialmente de naturaleza 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, diseñada por ingeniería genética, 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 la viscosidad. Pueden incluirse componentes adicionales en las formulaciones de la presente descripción si tales componentes no interfieran significativamente en la viscosidad y estabilidad de la formulación. Componentes y formulaciones ejemplares específicos incluidos dentro de la presente descripción se describen en detalle a continuación

Las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción pueden, en ciertos aspectos, ser formulaciones fluidas. Como se usa en este documento, la expresión "formulación fluida" significa una mezcla de al menos dos componentes que existen predominantemente en estado fluido de aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 45°C. Las formulaciones fluidas incluyen, pero no se limitan a, las formulaciones líquidas. Las formulaciones fluidas pueden ser de viscosidad baja, moderada o alta, dependiendo de sus constituyentes particulares.

PROTEÍNAS DE LA CÉLULA HOSPEDERA

Como se usa en este documento, el término "proteína de célula hospedera" (HPC) incluye la proteína derivada de una célula hospedera en la producción de una proteína recombinante. La proteína de la célula hospedera puede ser una impureza relacionada con el proceso que puede derivarse del proceso de manufacturación y puede incluir tres categorías principales: derivada del sustrato celular, derivada del cultivo celular y derivada del proceso posterior. Las impurezas derivadas del sustrato celular incluyen, pero no se limitan a, proteínas derivadas del organismo hospedero y ácido nucleico (ADN genómico, vectorial o total de la célula hospedera). Las impurezas derivadas del cultivo celular incluyen, pero no se limitan a, inductores, antibióticos, suero y otros componentes del medio. Las impurezas derivadas del proceso posterior 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.

La presencia de una proteína de célula hospedera en un producto bioterapéutico puede considerarse de mayor o menor riesgo basado en una serie de factores medibles.

Uno de tales factores es la concentración o abundancia (cantidad) de una impureza de HCP en un producto bioterapéutico. Una HCP puede no tener un impacto perceptible en una abundancia suficientemente baja, medida, por ejemplo, usando ELISA o espectrometría de masas. El nivel al que una HCP puede presentar un riesgo considerable, que puede considerarse un nivel inaceptable en un producto y puede ser monitoreado como un atributo crítico de calidad (CQA), puede depender de la identidad específica de la HCP. Las HCP particulares pueden ser conocidas por presentar un riesgo a un nivel particular, por ejemplo, dependiendo del nivel de actividad enzimática de una HCP que sea una enzima.

En relación con esto, la criticidad de la presencia de una HCP puede depender de la función de tal HCP, en particular en relación con los componentes del producto bioterapéutico. Por ejemplo, una esterasa o lipasa de HCP que pueda o se conozca por degradar el polisorbato que está presente en el producto bioterapéutico de interés puede ser estrechamente monitoreada y puede tener un umbral bajo para la cantidad de impureza de HCP que puede permitirse en el producto bioterapéutico. Otras HCP de particular interés pueden ser, por ejemplo, proteasas que pueden o se conoce que degradan una proteína de interés en el producto bioterapéutico, o HCP inmunogénicas que pueden o se conoce que provocan una reacción inmunitaria cuando se administran a un sujeto.

CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA

Como se usa en este documento, el término "cromatografía líquida" se refiere a un proceso en donde una mezcla biológica/química transportada por un líquido puede separarse en componentes como resultado de la distribución diferencial de los componentes a medida que fluyen a través de (o hacia) una fase estacionaria líquida o sólida. 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 hidrofóbica, cromatografía de interacción hidrofílica o cromatografía de modo mezclado. Los analitos separados usando cromatografía presentarán tiempos de retención distintivos característicos, que reflejan la velocidad a la que un analito se mueve a través de la columna cromatográfica. Los analitos pueden ser comparados usando un cromatograma, que traza el tiempo de retención en un eje y la señal medida en otro eje, donde la señal medida puede producirse 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 farmacéutica, puede someterse a estrés, por ejemplo

estrés por agitación o estrés térmico, y subsecuentemente someterse a un paso de cromatografía para eliminar cualquier especie de HMW.

En ciertos 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 selectivamente o específicamente con la proteína de interés. Ejemplos no limitantes de tal material cromatográfico incluyen la proteína A y la proteína G. También se incluye el 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 involucrar someter una muestra biológica a una columna que comprende una resina de Proteína A adecuada. Cuando se usa en este documento, el término "Proteína A" abarca la Proteína A recuperada de una fuente nativa de la misma, la Proteína A producida sintéticamente (*por ejemplo*, por síntesis peptídica o por técnicas recombinantes), y las variantes de la misma 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 la afinidad y el aislamiento de una variedad de isotipos de anticuerpos por interacción específica con la porción Fc de una molécula en caso de que posea tal región.

Existen 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 JSR Life Sciences.

Una columna de afinidad puede equilibrarse con un amortiguador adecuado antes de cargar la muestra. Después de cargar la columna, la columna puede lavarse una o varias veces usando un amortiguador de lavado adecuado. La columna puede entonces ser eluida usando un amortiguador de elución adecuado, por ejemplo, glicina-HCl, ácido acético o ácido cítrico. El eluido puede monitorearse usando técnicas bien conocidas por aquellos expertos en la técnica, tal como un detector de UV. Las fracciones eluidas de interés pueden ser recolectadas y luego preparadas para procesamiento adicional.

La cromatografía de intercambio catiónico (CEX) usa un material de cromatografía de intercambio catiónico. La cromatografía de intercambio catiónico puede además subdividirse 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 ácido sulfónico (S) pueden usarse en intercambiadores catiónicos fuertes, mientras que los materiales de cromatografía de intercambio catiónico con un grupo carboximetilo (CM) pueden usarse en intercambiadores catiónicos débiles. Intercambiadores de cationes fuertes incluyen, por ejemplo, SOURCE S, que usa un grupo funcional de sulfato de metilo, y SP Sefarosa, que usa un grupo funcional de sulfopropilo. Los intercambiadores de cationes débiles incluyen, por ejemplo, la celulosa CM-, que usa un grupo funcional de carboximetilo. El SCX puede ser preferible porque se puede usar un rango más amplio de amortiguadores de pH sin perder la carga del intercambiador de cationes fuertes, lo que permite la separación efectiva de analitos con un amplio rango de pI.

Los materiales de cromatografía de intercambio catiónico están disponibles bajo diferentes nombres de una multitud de compañías tales como, por ejemplo, Bio-Rex, Macro-Prep CM (disponible de BioRad Laboratories, Hercules, Calif., EE. UU.), intercambiador de catión 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, hiper-D, y partiesfera (disponible de Whatman plc, Brentford, GB), 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 de GE Healthcare, Life Sciences, Alemania). Además, resinas de intercambio catiónico comercialmente disponibles incluyen además, carboximetilcelulosa, Bakerbond ABX, sulfopropilo (SP) inmovilizado en agarosa (*por ejemplo*, SP-Sepharose Fast Flow o SP-Sepharose High Performance, disponibles 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 mezclado que realizan una combinación de tecnologías de intercambio iónico y de interacción hidrofóbica (*por ejemplo*, Capto Adhere, Capto MMC, MEP HyperCell, Eshmuno HCX, etc.), materiales de cromatografía de modo mezclado que realizan una combinación de tecnologías de intercambio aniónico y de intercambio catiónico (*por ejemplo*, hidroxapatita, hidroxapatita cerámica, etc.), y similares. En algunos aspectos, el CEX puede usarse para eliminar especies de HMW a partir de una muestra, por ejemplo para eliminar proteínas que se han agregado en especies de HMW

después de la agitación o estrés térmico.

En algunos aspectos, una muestra que comprende una proteína de interés se somete al menos a un paso de separación por intercambio aniónico (AEX). La cromatografía de lecho empacado de intercambio aniónico se basa en interacciones iónicas entre la entidad de unión (proteína objetivo o impureza) y el grupo funcional inmovilizado en el medio cromatográfico. El rendimiento puede ser una función de la fase móvil, el grupo funcional y el esqueleto de la resina. El uso de un material de intercambio aniónico contra uno catiónico se basa, en parte, de las cargas locales de la proteína de interés. La cromatografía de intercambio aniónico puede usarse en combinación con otros procedimientos cromatográficos tales como la cromatografía de afinidad, cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de interacción hidrofóbica, así como también otros modos de cromatografía conocidos por aquellos expertos en la técnica.

En el contexto de la separación cromatográfica, una columna cromatográfica se usa para alojar material de soporte cromatográfico (resina o fase sólida). Una muestra que comprende una proteína de interés se carga en una columna cromatográfica particular. La columna puede entonces someterse 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 pueden ser eluidos diferencialmente usando un amortiguador de elución adecuado.

Un agente aniónico puede ser seleccionado a partir del grupo que consiste de acetato, cloruro, formiato y combinaciones de los mismos. Un agente catiónico puede ser seleccionado a partir del grupo que consiste de Tris, arginina, sodio y combinaciones de los mismos. Un amortiguador puede ser seleccionado a partir del grupo que consiste de 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 un medio filtrante de profundidad pueden funcionar en ya sea modo bind-elute, en modo flujo continuo o en un modo híbrido en donde las proteínas presentan unión al material cromatográfico y, sin embargo, aún pueden lavarse de tal material usando un amortiguador que es el mismo o sustancialmente similar al

amortiguador de carga.

En el modo bind-elute, una columna o un dispositivo de membrana se acondiciona primero con un amortiguador con la intensidad iónica y el pH adecuados bajo condiciones donde ciertas proteínas se adsorberán a la matriz basada en resina. Por ejemplo, durante la carga de alimentación, una proteína de interés puede adsorberse 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 aumentando la intensidad iónica (*es decir*, la conductividad) del amortiguador de elución para que compita con el soluto por los sitios cargados de la matriz de intercambio aniónico. Cambiar el pH y de este modo alterar la carga del soluto es otra forma de lograr la elución del soluto. El cambio de conductividad o pH puede ser gradual (elución en gradiente) o por etapas (elución escalonada).

En el modo de flujo continuo, una columna o un dispositivo de membrana funciona a un pH y una conductividad seleccionados, de forma que la proteína de interés no se une a la resina o a la membrana, mientras que las especies ácidas serán ya sea retenidas en la columna o tendrán un perfil de elución distinto al de la proteína de interés. En el contexto de esta estrategia, las especies acídicas interactuarán con o se unirán al material cromatográfico bajo condiciones adecuadas, mientras 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 cargado positivamente inmovilizado, y la proteína de interés fluye a través.

Ejemplos no limitantes de resinas de intercambio aniónicas incluyen grupos de dietilaminoetilo (DEAE), aminoetilo cuaternario (QAE) y amina cuaternaria (Q). Ejemplos no limitantes adicionales incluyen: Poros 50PI y Poros 50HQ, que son esferas poliméricas rígidas con un esqueleto que consiste de poli[estireno-divinilbenceno] reticulado; Poros 50XQ; Capto Q Impres y Capto DEAE, que son esferas 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 tentacular; 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 aniónico fuerte; CUNO BioCap, que es un medio filtrante de profundidad zeta-plus construido a partir de auxiliares de filtración inorgánicos, celulosa refinada y una resina de intercambio iónico; XOHC, que es un medio filtrante de profundidad construido a partir de auxiliares de filtración inorgánicos, celulosa y ésteres de celulosa mezclados; y Unosphere Q. En algunos aspectos, se elige una resina con un tamaño de poro relativamente más grande, para un área de superficie incrementada expuesta a las especies cargadas negativamente.

Pueden añadirse aditivos tales como polietilenglicol (PEG), detergentes, aminoácidos, azúcares, agentes caotrópicos para mejorar el rendimiento de la separación y lograr una mejor separación, recuperación y/o calidad del producto.

En algunos aspectos, el AEX puede usarse para eliminar especies de HMW de una muestra, por ejemplo para eliminar proteínas que se han agregado en especies de HMW después de la agitación o estrés térmico.

Mientras que la cromatografía de intercambio iónico se basa en la carga local de la proteína de interés para la separación selectiva, la cromatografía de interacción hidrofóbica (HIC) explota las propiedades hidrofóbicas de las proteínas para lograr una separación selectiva. Las resinas de HIC son típicamente funcionalizadas con ligandos de hidrocarburos aromáticos o alifáticos. Los grupos hidrofóbicos en o dentro de una proteína interactúan con los grupos hidrofóbicos de la resina cromatográfica o de una membrana. Típicamente, bajo condiciones adecuadas, cuanto más hidrofóbica sea una proteína (o partes de una proteína), más fuerte será su interacción con la columna o la membrana. De este modo, en condiciones adecuadas, la HIC puede usarse para facilitar la separación de impurezas relacionadas con el proceso (*por ejemplo*, HCP), así como de sustancias relacionadas con el producto (*por ejemplo*, agregados y fragmentos) de una proteína de interés en una muestra. En algunos aspectos, la HIC puede usarse para eliminar especies de HMW de una muestra, por ejemplo para eliminar proteínas que se han agregado en especies de HMW después de la agitación o estrés térmico.

Al igual que la cromatografía de intercambio iónico, una columna de HIC o un dispositivo de membrana de HIC también puede funcionar en un modo de elución, de flujo o híbrido, en donde el producto presenta unión a, o interactúa con un material cromatográfico, aún puede lavarse a partir de tal material usando un amortiguador que es el mismo o sustancialmente similar al amortiguador de carga. En algunas modalidades, un paso de HIC se lleva a cabo en modo negativo, donde las impurezas relacionadas con el proceso se unen a un ligando inmovilizado, y la proteína de interés fluye a través de este.

Como las interacciones hidrofóbicas son más fuertes a alta intensidad iónica, esta forma de separación puede realizarse convenientemente después de un paso de elución salina tal como aquella típicamente usada en conjunto con la cromatografía de intercambio iónico. Alternativamente, se pueden añadir sales a una muestra antes de emplear un paso de HIC. La adsorción de una proteína en una columna de HIC se ve favorecida por las altas concentraciones de sal, pero las concentraciones actuales pueden variar sobre un amplio rango dependiendo de la naturaleza de la proteína de interés, el tipo de sal y el ligando de HIC particular elegido. Diversos iones pueden organizarse en una denominada serie solufóbica, dependiendo de si promueven interacciones hidrofóbicas (efectos de salinización) o alteran la estructura del agua (efecto caotrópico) y provocan el debilitamiento de la interacción hidrofóbica. Los cationes se clasifican en términos de su efecto salino creciente tales como Ba^{2+} ; Ca^{2+} ; Mg^{2+} ; Li^{+} ; Cs^{+} ; Na^{+} ; K^{+} ; Rb^{+} ; NH_4^{+} , mientras que los aniones pueden clasificarse en términos de su efecto caotrópico creciente tales como PO_4^{3-} ; SO_4^{2-} ; $\text{CH}_3\text{CO}_3^{-}$; Cl^{-} ; Br^{-} ; NO_3^{-} ; ClO_4^{-} ; I^{-} ; SCN^{-} .

Los medios de HIC comprenden normalmente una matriz base (*por ejemplo*, agarosa reticulada o material copolímero sintético) a la que se acoplan ligandos hidrofóbicos (*por ejemplo*, grupos alquilo o arilo). Un medio HIC adecuado comprende una resina de agarosa o una membrana funcionalizada con grupos fenilo (*por ejemplo*, una Phenyl Sepharose™ de Cytiva o una Phenyl Membrane de Sartorius). Existen varias resinas de HIC comercialmente disponibles. Ejemplos incluyen, pero no se limitan a, Capto Phenyl, Capto Butyl, Phenyl Sepharose™ 6 Fast Flow con baja o alta sustitución, Phenyl Sepharose™ High Performance, Octyl Sepharose™ High Performance (GE Healthcare); Fractogel™ EMD Propyl o Fractogel™ EMD Phenyl (E. Merck, Alemania); Macro-Prep™ Methyl o columnas t-Butilo de Macro-Prep™ (Bio-Rad, California); WP HI-Propilo (C3)™ (J. T. Baker, New Jersey); y éter, fenilo o butilo de Toyopearl™ (TosoHaas, PA); Toyo PPG; Toyo Fenilo; Toyo Butilo; y Toyo Hexilo.

Dado que el pH seleccionado para cualquier proceso de producción particular debe ser compatible con la estabilidad y la actividad de las proteínas, las condiciones particulares de pH pueden ser específicas para cada aplicación. Sin embargo, debido a que a pH 5,0-8,5 los valores particulares de pH tienen muy poca importancia en la selectividad final y la resolución de una separación de HIC, se pueden favorecer tales condiciones. Un aumento del pH debilita las interacciones hidrofóbicas y la retención de proteínas cambia más drásticamente a valores de pH por arriba de 8,5 o por debajo de 5,0. Además, los cambios en la intensidad iónica, la presencia de solventes

orgánicos, la temperatura y el pH (especialmente en el punto isoeléctrico, pI , cuando no hay carga superficial neta) pueden afectar a la estructura y solubilidad de la proteína y, en consecuencia, a la interacción con otras superficies hidrofóbicas, tales como aquellas de los medios de HIC y, por lo tanto, en ciertas modalidades, la presente descripción incorpora estrategias de producción en donde uno o más de los anteriores se ajustan para lograr la reducción deseada de impurezas relacionadas con el proceso y/o sustancias relacionadas con el producto.

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) o filtración en gel se basa en la separación de componentes en 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 del poro. Además, la capacidad de una sustancia para penetrar en los poros viene determinada por la movilidad de difusión de las macromoléculas, que es mayor para las macromoléculas pequeñas. Las macromoléculas muy grandes pueden no penetrar en absoluto en los poros de la fase estacionaria; y para las macromoléculas muy pequeñas, la probabilidad de penetración es cercana a la unidad. Mientras que los componentes de mayor tamaño molecular se desplazan más rápidamente a través de la fase estacionaria, los componentes de menor tamaño molecular tienen un recorrido más largo a través de los poros de la fase estacionaria y, de este modo, se retienen durante más tiempo en la fase estacionaria.

El material cromatográfico puede comprender un material de exclusión por tamaño en donde el material de exclusión por tamaño es una resina o una membrana. La matriz usada para la exclusión por tamaño es preferiblemente 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 presentes en las perlas de gel hinchadas. Las moléculas mayores de un determinado tamaño no entran en las perlas de gel y, de este modo, se mueven a través del lecho cromatográfico con mayor rapidez. Las moléculas más pequeñas, tales como detergentes, proteínas, ADN y similares, que entran en las perlas de gel en medida variante dependiendo de su tamaño y forma, son retrasadas en su pasaje a través del lecho. Las moléculas de este modo se eluyen en general en orden decreciente de tamaño molecular.

Los analitos que eluyen de una columna de SEC pueden ser separados en fracciones basados en el tiempo de elución. Por ejemplo, los analitos que eluyen antes que la forma funcional de una proteína de interés, por ejemplo la forma monomérica,

pueden ser ampliamente clasificados como especies de alto peso molecular (HMW). Una fracción de HMW puede subdividirse además en, por ejemplo, en una fracción de muy alto peso molecular (vHMW) y una fracción de dímeros (que representa el tiempo de elución de un dímero de la proteína de interés). Los analitos que eluyen más tarde que la forma funcional de una proteína de interés pueden ser ampliamente clasificados como especies de bajo peso molecular (LMW), y pueden subdividirse además en una fracción de LMW y una fracción de cola posterior. Las variantes de una proteína de interés que tienen un peso molecular mayor o peso molecular menor que la especie principal, o que el producto previsto, pueden ser referidas como "variantes de tamaño"

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 pueden separarse usando SEC. Las especies de HMW pueden ser reducidas de una muestra usando una técnica de purificación que incluye, por ejemplo, filtración, enriquecimiento o cromatografía, por ejemplo cromatografía de exclusión por tamaño o cromatografía de intercambio catiónico. En algunos aspectos, la SEC puede usarse para eliminar especies de HMW de una muestra, por ejemplo para eliminar proteínas que se han agregado en especies de HMW después de la agitación o estrés térmico. Como se usa en este documento, el término "reducido en HMW" se refiere a una muestra que ha sido sometida a un paso de purificación o enriquecimiento para eliminar sustancialmente (pero no necesariamente por completo), o reducir la abundancia relativa de, cualquier especie de HMW, en comparación con la muestra antes de el paso de purificación o enriquecimiento, y/o en comparación con una muestra que no fue sometida al paso de purificación o enriquecimiento. Una muestra reducida en HMW puede comprender, por ejemplo, especies de HMW como porcentaje del total de especies de HMW, principales y LMW que sea que son menos de 10%, menos de 5%, menos de 4%, menos de 3%, menos de 2% o menos de 1%. Para las composiciones farmacéuticas, un umbral particular usado en el campo para la reducción de HMW es un porcentaje de especies de HMW de menos de 5%.

Distinguir una especie de HMW de una especie principal es fácilmente realizado para un experto en la técnica, por ejemplo por la distinción visible en los picos de SEC entre las diferentes especies.

ESPECTROMETRÍA DE MASAS

Como se usa en este documento, el término "espectrómetro de masas" incluye un dispositivo capaz de identificar especies moleculares específicas y medir sus masas exactas. El término significa incluir cualquier detector molecular en el cual un polipéptido

o péptido puede ser caracterizado. Un espectrómetro de masas puede incluir tres partes principales: la fuente de iones, el analizador de masas y el detector. La función de la fuente de iones es crear iones en fase gaseosa. Los átomos, moléculas o grupos de analitos pueden transferirse a la fase gaseosa e ionizarse simultáneamente (como en la ionización por electropulverización) o usando 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 serie. Como se usa en este documento, el término "espectrometría de masas en serie" incluye una técnica en donde la información estructural sobre las moléculas de la muestra se obtiene usando múltiples etapas de selección de masas y separación de masas. Un requisito previo es que las moléculas de la muestra se transforman en fase gaseosa y se ionizan de manera que los fragmentos se forman en una forma predecible y controlable después del primer paso de selección de masas. La MS/MS, o MS^2 , puede realizarse seleccionando y aislando primero un ion precursor (MS^1), y fragmentándolo para obtener información significativa. La MS en serie se ha realizado de manera exitosa con una amplia variedad de combinaciones de analizadores. Se puede determinar cuales analizadores combinar para una cierta aplicación por muchos factores diferentes, tales como la sensibilidad, selectividad y velocidad, pero también el tamaño, costo y disponibilidad. Las dos categorías principales de métodos de MS en serie son la serie en el espacio y serie en el tiempo, pero también hay híbridos en los que los analizadores de serie en el tiempo se acoplan en el espacio o con analizadores en serie en el espacio. Un espectrómetro de masas en serie en el espacio comprende una fuente de iones, un dispositivo de activación de iones precursores y al menos dos analizadores de masas sin captura. Las funciones específicas de separación m/z pueden diseñarse de forma que en una sección del instrumento se seleccionen los iones, se disocian en una región intermedia y los iones producto se transmitan a otro analizador para la separación m/z y la adquisición de datos. En serie-en-tiempo, los iones del espectrómetro de masas producidos en la fuente de iones pueden ser atrapados, aislados, fragmentados y separados m/z en el mismo dispositivo físico.

Los péptidos identificados por el espectrómetro de masas pueden usarse como representantes sustitutos de la proteína intacta y de modificaciones post-traduccionales u otras modificaciones. Pueden usarse para la caracterización de proteínas usando 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, la secuenciación de aminoácidos de los fragmentos de proteínas, la determinación de la secuenciación de proteínas, la determinación de la secuenciación *de novo* de proteínas, la localización de modificaciones post-traduccionales, o la identificación de modificaciones post-traduccionales, o el análisis de comparabilidad, o combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos ejemplares, el espectrómetro de masas puede funcionar con nanoelectropulverización o nanopulverización. El término "nanoelectropulverización" o "nanopulverización", como se usa en este documento, se refiere a la ionización por electropulverización a una velocidad de flujo de solvente muy bajo, 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 por electropulverización que forma una nanoelectropulverización puede usar un emisor estático de nanoelectropulverización o un emisor dinámico de nanoelectropulverización. Un emisor estático de nanoelectropulverización realiza un análisis continuo de pequeños volúmenes de solución de muestra (analito) durante un periodo de tiempo prolongado. Un emisor dinámico de nanoelectropulverización usa una columna capilar y un sistema de suministro de solvente para realizar separaciones cromatográficas en mezclas antes de su análisis por el espectrómetro de masas.

En algunos aspectos, la espectrometría de masas puede realizarse bajo condiciones nativas. Como se usa en este documento, el término "condiciones nativas" puede incluir la realización de espectrometría de masas en condiciones que preserven las interacciones no covalentes en un analito. Para una revisión detallada sobre la MS nativa, se refiere a la revisión: Elisabetta Boeri Erba & 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 este documento, el término "base de datos" se refiere a una colección compilada de secuencias de proteínas que posiblemente pueden existir en una muestra, por ejemplo en forma de archivo en formato FASTA. Las secuencias de proteínas relevantes pueden derivarse de secuencias de ADNc de una especie en estudio. Las bases de datos públicas que pueden ser usadas para buscar secuencias de proteínas relevantes incluyen las bases de datos alojadas mediante, por ejemplo, Uniprot o Swiss-prot. Las bases de datos pueden ser buscadas usando lo que aquí es referido como "herramientas bioinformáticas". Las herramientas bioinformáticas proporcionan la capacidad para buscar espectros de MS/MS no interpretados en todas las secuencias posibles de la(s) base(s) de dato(s), y proporcionan como resultado

espectros de MS/MS interpretados (anotados). Ejemplos no limitantes de tales herramientas son Mascot (www.matrixscience.com), Spectrum Mill (www.chem.agilent.com), PLGS (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 descripción comprenden uno o más excipientes. El término "excipiente", como se usa en este documento, significa cualquier agente no terapéutico añadido a la formulación para proporcionar una consistencia, viscosidad o efecto estabilizador deseados.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción también pueden comprender un amortiguador o sistema amortiguador, que sirve para mantener un pH estable y para ayudar a estabilizar la proteína de interés. En algunos aspectos, el amortiguador o sistema amortiguador comprende al menos un amortiguador que tiene un intervalo de amortiguador que se traslapa totalmente o parcialmente con el intervalo de pH 5,5 a 6,3. En varios aspectos, el pH de la formulación es de 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 en una concentración desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 40 mM, desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 30 mM, desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 15 mM; o desde aproximadamente 15 mM hasta 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 desde 10 mM hasta 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 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 descripción incluyen tanto amortiguadores de histidina como de acetato en cualquiera de las concentraciones discutidas anteriormente. En algunos casos, las formulaciones contienen un amortiguador de histidina a una concentración desde 15 mM hasta 25 mM, y un amortiguador de acetato a una concentración desde 10 mM hasta 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 descripción 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 al azúcar actuar como agente reductor. Ejemplos específicos de azúcares reductores incluyen la fructosa, glucosa, gliceraldehído, lactosa, arabinosa, manosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y maltosa. Los 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, melezitosa y rafinosa. Los 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 el estabilizador térmico de la proteína de interés.

La cantidad de azúcar (*por ejemplo*, sacarosa) contenida dentro de las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción variará dependiendo de las circunstancias específicas y de los propósitos previstos para los que se utilicen las formulaciones. En ciertos aspectos, las formulaciones pueden contener aproximadamente 0,1% hasta aproximadamente 20% de azúcar; aproximadamente 0,5% hasta aproximadamente 20% de azúcar; aproximadamente 1% hasta aproximadamente 20% de azúcar; aproximadamente 2% hasta aproximadamente 15% de azúcar; aproximadamente 3% hasta aproximadamente 8% de azúcar; o aproximadamente 4% hasta aproximadamente 6% de azúcar. Por ejemplo, las

formulaciones farmacéuticas de la presente descripción 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 indicados anteriormente corresponde a un porcentaje en peso/volumen (p/v).

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

La cantidad de aminoácido contenida en las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción puede variar dependiendo de las propiedades específicas deseadas de las formulaciones, así como también de las circunstancias particulares y los propósitos para los que se pretenden usar las formulaciones. En ciertos aspectos, las formulaciones pueden contener aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 200 mM de un aminoácido; aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 150 mM de un aminoácido; aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 100 mM de un aminoácido; aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 80 mM de un aminoácido; aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 30 mM de un aminoácido; aproximadamente 45 mM hasta aproximadamente 55 mM de un aminoácido; o aproximadamente 70 mM hasta aproximadamente 80 mM de un aminoácido. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción 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 descripción también pueden comprender uno o más cosolventes orgánicos de un tipo y en una cantidad que estabiliza la proteína de interés bajo condiciones de manipulación o agitación bruscas, tales como, *por ejemplo*, agitación orbital. En algunos aspectos, el cosolvente orgánico es un tensioactivo. Como se usa en este documento, el término "tensioactivo" significa una sustancia que reduce la tensión de superficie de un fluido en el cual se disuelve y/o reduce la tensión interfacial entre el aceite y el agua. Los tensioactivos pueden ser iónicos o no iónicos. Los tensioactivos no iónicos específicos que pueden ser incluidos en las formulaciones de la presente descripción incluyen, *por ejemplo*, polisorbatos tales como PS20 y PS80, poloxámeros tales como poloxámero 188 y polietilenglicoles (PEG) tales como PEG3350.

La cantidad de tensioactivo contenido dentro de las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción puede variar dependiendo de las propiedades específicas deseadas de las formulaciones, así como también de las circunstancias particulares y los propósitos para los que se pretenden usar 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% hasta aproximadamente 0,49% de tensioactivo; aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,39% de tensioactivo; aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,29% de tensioactivo; aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,19% de tensioactivo; aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,15% de tensioactivo; aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,12%; aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,11% de tensioactivo; aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,1% de tensioactivo; o aproximadamente 0,01% hasta aproximadamente 0,09% de tensioactivo. *Por ejemplo*, las formulaciones de la presente descripción 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). Cada uno de los porcentajes indicados anteriormente corresponde a un porcentaje en peso/volumen (p/v).

POLISORBATOS

En algunos aspectos, el tensioactivo de la composición puede ser un polisorbato. Como se usa en este documento, "polisorbato" se refiere a un excipiente común usado en el desarrollo de formulaciones para proteger los anticuerpos contra diversas tensiones físicas, TALES como la agitación, los procesos de congelación-descongelación y las interfaces de aire/agua (Emily Ha, Wei Wang & Y. John Wang, Peroxide formation in polisorbato 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 polioxietileno-sorbitán. Los ésteres pueden incluir un grupo principal de polioxietileno sorbitán 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 un rango de aproximadamente 0,001% hasta 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, con la fracción de monooleato que constituye aproximadamente el 58% de la mezcla polidispersa (Nitin

Dixit et al., Residual Host Cell Protein Promotes Polysorbate 20 Degradation in a Sulfatase Drug Product Leading to Free Fatty Acid Particles, 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 de auto-oxidación en una manera dependiente del pH y de la temperatura y, adicionalmente, 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)), que resulta en ácidos grasos en solución junto con el grupo principal de sorbitán. Los ácidos grasos libres que resultan del polisorbato pueden incluir cualquier ácido graso alifático de seis a veinte carbonos. Ejemplos no limitantes de ácidos grasos libres se incluyen ácido oleico, ácido palmítico, ácido esteárico, ácido mirístico, ácido láurico o combinaciones de los mismos.

En algunos aspectos ejemplares, el polisorbato puede formar partículas de ácidos grasos libres. Las partículas de ácidos grasos libres pueden ser al menos de aproximadamente 1 μm de tamaño o de al menos aproximadamente 5 μm de tamaño. Además, estas partículas de ácidos grasos pueden clasificarse de conformidad con su tamaño como partículas visibles (aproximadamente $> 100 \mu\text{m}$), subvisibles (aproximadamente $< 100 \mu\text{m}$, que pueden subdividirse en micras (1-100 μm) y submicras (100 nm-1000 nm)) y nanométricas (aproximadamente $< 100 \text{ nm}$) (Linda Narhi, Jeremy Schmit & Deepak Sharma, Classification of protein aggregates, 101 JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES 493–498). En algunos aspectos ejemplares, las partículas de ácidos grasos pueden ser partículas visibles. Las partículas visibles pueden determinarse mediante inspección visual. En algunos aspectos, las partículas de ácidos grasos pueden ser partículas subvisibles. Las partículas subvisibles pueden ser monitoreadas por el método de bloqueo de la luz de conformidad con la Farmacopea de los Estados Unidos (USP). Un aumento de las partículas de ácidos grasos puede hacer que un producto deje de ser de calidad aceptable y, por lo tanto, un índice de aumento de las partículas de ácidos grasos puede usarse como medida de la vida útil del producto. Las partículas de ácidos grasos pueden formarse cuando los ácidos grasos libres se liberan en una formulación y superan una concentración en donde son solubles, precipitando de este modo fuera de la solución. Por lo tanto, medir una degradación del 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. Adicionalmente, previniendo la degradación del polisorbato, la liberación de ácidos grasos libres y/o la 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 ejemplares, la concentración de polisorbato en la formulación puede ser aproximadamente 0,001% en p/v, aproximadamente 0,002% en p/v, aproximadamente 0,003% en p/v, aproximadamente 0,004% en p/v, aproximadamente 0,005% en p/v, aproximadamente 0,006% en p/v, aproximadamente 0,007% en p/v, aproximadamente 0,008% en p/v, aproximadamente 0,009% en p/v, aproximadamente 0,01% en p/v, aproximadamente 0,015% en p/v, aproximadamente 0,02% en p/v, 0,025% en p/v, aproximadamente 0,03% en p/v, aproximadamente 0,035% en p/v, aproximadamente 0,04% en p/v, aproximadamente 0,045% en p/v, aproximadamente 0,05% en p/v, aproximadamente 0,06% en p/v, aproximadamente 0,07% en p/v, aproximadamente 0,08% en p/v, aproximadamente 0,09% en p/v, aproximadamente 0,1 % en p/v, aproximadamente 0,2% en p/v, aproximadamente 0,3% en p/v, aproximadamente 0,4% en p/v, aproximadamente 0,5% en p/v, aproximadamente 0,6% en p/v, aproximadamente 0,7% en p/v, aproximadamente 0,8% en p/v, aproximadamente 0,9% en p/v, o aproximadamente 1% en p/v. En un aspecto, la concentración de polisorbato en la formulación es aproximadamente 1% en p/v.

En algunos aspectos ejemplares, la concentración de ácidos grasos libres en la formulación puede ser 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 ejemplares, el polisorbato puede ser degradado por una proteína de la célula hospedera presente en la composición. En algunos aspectos, la proteína de la célula hospedera puede ser una esterasa o lipasa. La actividad residual

de la esterasa o la lipasa en una formulación puede evaluarse indirectamente midiendo la degradación del 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 ligada a un grupo de principal usando un enlace de éster. Un enlace de éster se forma cuando un grupo hidroxilo (*por ejemplo*, un alcohol o un ácido carboxílico) es reemplazado por un grupo alcoxi. Como se usa en este documento, el grupo hidroxilo puede formar parte de un ácido carboxílico, más específicamente de un ácido graso, y/o de un alcohol, tal como glicerol, sorbitol, sorbitán, isosorbida o similares. El grupo de alcohol es en general referido en este documento como el grupo principal.

Ejemplos de ésteres de ácidos grasos en general incluyen fosfolípidos, lípidos (*por ejemplo*, el grupo principal es glicerol, incluyendo monoglicéridos, diglicéridos y triglicéridos), y tensioactivos y emulsificantes, incluyendo *por ejemplo* polisorbatos como polisorbato 20, polisorbato 60 y polisorbato 80, que son detergentes no iónicos. Los tensioactivos y emulsificantes son útiles como cosolventes y estabilizadores. Funcionan asociándose tanto a una superficie hidrófila como a una superficie lipofílica para mantener la dispersión y la estabilidad estructural de los ingredientes, como las proteínas. Los tensioactivos se añaden a las fórmulas de proteínas principalmente para mejorar la estabilidad de las proteínas contra el estrés mecánico, tal como el cizallamiento de la interfaz aire/líquido y 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 vuelven 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 hidrocarburos compuesta por carbono e hidrógeno y, en algunos casos, por sustituciones de oxígeno, azufre, nitrógeno y/o cloro. Las colas alifáticas pueden ser saturadas (como en los ácidos grasos saturados), lo que significa que todos los enlaces de 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 de carbono-carbono son enlaces dobles (alquenos), o enlaces triples (alquinos).

Los ácidos grasos se designan en general 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 conformidad con su grado de saturación, que se correlaciona con la rigidez y el punto de fusión. Los ácidos grasos más 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 vaccénico (18:1), ácido linoleico (18:2), ácido linoléico (18:2), ácido alfa-linolénico (18:3), ácido araquídico (20:0), ácido araquidónico (20:4), eicosapentaenoico (20:5), behénico (22:0), erúcico (22:1), docosahexaenoico (22:6), lignocérico (24:0) y ceroico (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 estabilizantes y emulsificantes. El polisorbato 20 comprende principalmente el éster monolaurato de polioxietileno (20) sorbitán. El polisorbato 40 comprende principalmente el éster monopalmitato del polioxietileno (20) sorbitán. El polisorbato 60 comprende principalmente el éster monoestearato de polioxietileno (20) sorbitán. El polisorbato 80 comprende principalmente el éster monooleato de polioxietileno (20) sorbitán.

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

En algunos lotes de polisorbatos comercialmente disponibles, el polisorbato contiene monoésteres de isosorbida. La isosorbida es un derivado heterocíclico de la glucosa, también preparado por deshidratación del sorbitol. Es un diol que tiene dos grupos de alcohol que pueden participar en la formación de uno o dos enlaces de éster. De este modo, 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 significantes 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 un 70% de ácido oleico, siendo el resto otros ésteres de ácidos grasos e impurezas. Un análisis de otra fuente de polisorbato 80 reveló aproximadamente 86-87% de ácido oleico. Un análisis de otra fuente de polisorbato 80 desarrollada más recientemente reveló ≥99% de ácido oleico.

En algunos aspectos, una concentración de ácido oleico en polisorbato 80 puede ser entre aproximadamente 50% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 58% y aproximadamente 100%, entre aproximadamente 60% and 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 son formulados con detergentes no iónicos como el polisorbato 20 o el polisorbato 80. Estos detergentes ayudan a estabilizar las moléculas grandes, como los anticuerpos y otras proteínas, y ayudan a prevenir la formación de complejos ternarios supermoleculares u otros agregados. Los agregados pueden llegar a ser nanopartículas o partículas subvisibles en el rango de 10 a 100 micras o de 2 a 100 micras, 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 discute en este documento, 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 en general incluyen aquellas partículas de 100 micras o menos de diámetro, pero en algunos casos incluyen partículas de menos de 150 micras (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 de la agregación de proteínas. Los agregados de proteínas pueden tener una forma blanda y amorfa y, por lo tanto, pueden ser difíciles de detectar usando métodos convencionales de oscurecimiento por luz y microscópico (Singh and Toler, "Monitoring of subvisible particles in therapeutic proteins", *Methods Mol Biol.* 2012; 899: 379-401). Las partículas subvisibles pueden comprender, *entre otros*, contaminantes de silicona (gotitas aceitosas), ácidos grasos libres (gotitas aceitosas), proteínas agregadas (partículas amorfas) y/o complejos de proteínas/ácidos grasos (partículas amorfas).

Las partículas subvisibles pueden detectarse usando uno o más de varios métodos. Los estándares de USP especifican los protocolos de oscurecimiento de la luz y de microscopía óptica. Otros métodos incluyen el análisis de imágenes de microflujo (MFI), el conteo Coulter y los métodos de seguimiento de partículas submicrónicas. En el caso del oscurecimiento por luz (LO), las partículas se cuentan con base en las sombras que proyectan sobre un detector de luz cuando atraviesan un haz de luz en una celda de flujo. El tamaño, la forma y la intensidad inversa de la sombra dependen

del tamaño, la forma y la diferencia del índice de refracción de la partícula con respecto a la solución. El intervalo de tamaño inferior para la detección usando LO es aproximadamente 2 micras. Un dispositivo de LO comúnmente usado es el instrumento HIAC (Beckman Coulter, Brea, California). 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 discuten en, *por ejemplo*, Narhi et al., "Subvisible (2-100 μm) 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, tales como las imágenes de micro-flujo (MFI) (Brightwell Technologies, Ottawa, Ontario), es un método más sensible para detectar las partículas subvisibles proteináceas de forma irregular, frágiles y transparentes, y para diferenciar aquellos tipos de partículas de las micro-gotas de silicona, las 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, dado que la medición y caracterización de la SVP mediante el análisis de oscurecimiento de la luz es menos sensible que el MFI, los conteos de partículas detectados mediante el MFI tenderán a ser superiores a los conteos de partículas detectados mediante el análisis de oscurecimiento de la luz. Brevemente, la MFI es una microscopía de flujo en la cual se toman y analizan en tiempo real imágenes sucesivas de campo claro. Se aplican algoritmos de análisis de imagen a las imágenes para discriminar burbujas de aire, gotas de aceite de silicona y agregados proteináceos. Se pueden analizar volúmenes tan bajos como aproximadamente 250 microlitros hasta decenas de mililitros. Dependiendo del sistema usado, pueden detectarse partículas en el rango de dos hasta 300 micras, o de una a 70 micras (Id).

En algunos aspectos, las partículas visibles o subvisibles de una formulación pueden detectarse y analizarse usando espectroscopia de Raman. Como se usa en este documento, el término "espectroscopia de Raman" se refiere a un método espectroscópico basado en el método de dispersión de Raman. La espectroscopia de Raman puede proporcionar un espectro Raman, que puede identificar la presencia y posición de bandas en la región de la huella dactilar (2000 a 400 cm^{-1}), lo que permite la identificación química del material analizado por comparación con una base de datos de espectros de Raman (C. V. Raman and 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 farmacéuticas parenterales. La principal preocupación expresada es la incertidumbre que rodea a 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 therapeutics", J. Pharma. Sci. 99(8): 3302-21 (2010)). Para los productos farmacéuticos parenterales de pequeño volumen (*por ejemplo*, 100 mL o por debajo), la farmacopea limita las partículas subvisibles (SVP) mayores que o iguales a 10 micras a no más de 6,000 SVP por contenedor, y las SVP mayores que o iguales a 25 micras a no más de 600 por contenedor, cuando se determinan usando el análisis de oscurecimiento por luz; y las SVP mayores que o iguales a 10 micras a no más de 3,000 SVP por contenedor, y las SVP mayores que o iguales a 25 micras a no más de 300 por contenedor, cuando se determinan usando la prueba microscópica de membrana. (Farmacopea y Formulario Nacional de los Estados Unidos (USP 40-NF 28), <787>Materia Particulada Subvisible en Inyecciones de Proteínas Terapéuticas). Para los fármacos oftálmicos, los límites de SVP son 50 por mL de 10 micras o más, 5 por mL de 25 micras o más y 2 por mL de 50 micras o más (Id. en <78922 Particulate Matter in Ophthalmic Solutions). Los organismos reguladores contemplan cada vez más que los fabricantes establezcan especificaciones para las SVP de 2 micras o más (véase Singh et al., "An industry perspective on the monitoring of subvisible particles as a quality attribute for protein therapeutics", J. Pharm. Sci. 99(8): 3302-21 (2010)).

El término "esterasa" significa una enzima que cataliza la hidrólisis de un enlace de éster para crear un ácido y un alcohol. Las esterases son una categoría diversa de enzimas, que incluyen las acetil esterases (*por ejemplo*, acetilcolinesterasa), las fosfatasas, las nucleasas, las tiolesterasas, las lipasas y otras carboxilester hidrolasas. Como su nombre indica, una carboxilesterasa hidrolasa (también conocida como carboxilesterasa, carboxiléster hidrolasa y EC 3,1,1,1) usa agua para hidrolizar un éster carboxílico en un alcohol y un carboxilato. Una lipasa es una carboxilesterhidrolasa que cataliza la hidrólisis de los lípidos, que incluyen los triglicéridos, las grasas y los aceites, en ácidos grasos y un grupo principal de alcohol. Por ejemplo, los triglicéridos son hidrolizados por lipasas como la lipasa pancreática para formar monoacilglicerol y dos cadenas de ácidos grasos.

Las fosfolipasas son lipasas que hidrolizan los fosfolípidos en ácidos grasos y

otros productos. Las fosfolipasas se dividen en cuatro grandes categorías: la fosfolipasa A (que incluye la fosfolipasa A1 y la fosfolipasa A2), la 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, participan en la catálisis lipídica. Por ejemplo, se postula que la fosfolipasa B-similar a 2 (PLBL2) tiene actividad esterasa basándose en 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: 449-458 (2007)).

Como se usa en este documento, la frase "porcentaje de hidrólisis de éster graso" significa la proporción molar de éster de ácido graso que se ha hidrolizado. Dado que la hidrólisis de un éster de ácido graso resulta en la liberación de un ácido graso libre, el porcentaje de hidrólisis de éster graso puede determinarse midiendo el ácido graso libre en una muestra. Por lo tanto, el porcentaje de hidrólisis de ésteres grasos puede determinarse calculando los moles de ácido graso libre divididos 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, tal número puede determinarse calculando los moles de ácido graso libre y dividiendo por los moles totales de polisorbato restante más los moles de ácido graso libre.

Por "inhibidor de la 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 la esterasa en una formulación de proteína que contiene un tensioactivo de éster de ácido graso puede ayudar a mantener la estabilidad de la proteína y la estabilidad del éster de ácido graso y ayudar a reducir la formación de SVP. Las esterases comunes conocidas en la técnica incluyen el orlistat (tetrahidrolipistatina; un inhibidor de la carboxilesterasa 2 y la lipoproteína lipasa), el fosfato de dietilumbeliferilo (un inhibidor de la colesterol esterasa [lipsasa A]), el URB602 (ciclohexiléster del ácido [1-1'-bifenil]-3-yl-carbámico; inhibidor de la monoacilglicerollipasa) y ácido 2-butoxifenilborónico (inhibidor de la lipasa sensible a las hormonas). Se espera que la inclusión de un inhibidor de la esterasa durante la purificación de una proteína de interés o en la formulación final prevenga o reduzca la hidrólisis de detergentes no iónicos como el polisorbato 20 y el polisorbato 80, lo que a su vez se espera prevenga o reduzca la formación de partículas subvisibles.

En cualquiera de los varios aspectos de las formulaciones farmacéuticas discutidas anteriormente o en este documento, el anticuerpo IL-4R humano puede

comprender una región constante de cadena pesada de IgG1 humana.

En cualquiera de los varios aspectos de las formulaciones farmacéuticas discutidas anteriormente o en este documento, el anticuerpo IL-4R humano puede comprender una región constante de cadena pesada de IgG4 humana.

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

Ejemplos no limitantes de formulaciones farmacéuticas abarcadas por la presente descripción se exponen en otras partes del presente documento, que incluyen los Ejemplos de trabajo que se presentan a continuación.

ESTABILIDAD DE LAS FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción presentan altos niveles de estabilidad. El término "estable", como se usa en este documento 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 de su almacenamiento durante un periodo de tiempo definido. Una formulación puede ser estable aunque la proteína contenida en esta no mantenga el 100% de su estructura y/o función y/o actividad biológica después de su almacenamiento durante una cantidad de tiempo definido. 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 de su almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida puede considerarse como "estable".

La estabilidad puede medirse, *entre otras cosas*, determinando el porcentaje de proteína que forma un agregado dentro de la formulación después de su almacenamiento durante un tiempo definido a una temperatura definida, o bajo 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 puede determinarse, *entre otras cosas*, mediante cromatografía de exclusión por tamaño (*por ejemplo*, cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión por tamaño (SE-HPLC) o cromatografía líquida de ultra alto rendimiento con exclusión por tamaño (SE-UPLC)). Un "grado aceptable de estabilidad", como se usa esta frase en este documento, significa que como máximo puede detectarse aproximadamente 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2,5%, 2%, 1,5%, 1%, 0,5%, o 0,1% de la proteína en un agregado

de la formulación después de su almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura determinada, o bajo 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 puede almacenarse la formulación farmacéutica cuando se evalúa la estabilidad puede ser cualquier temperatura desde aproximadamente -80 °C hasta 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 cual la proteína formulada de interés puede ser sometida, puede ser estrés por agitación (*por ejemplo*, vórtice) 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 puede considerarse 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 forma agregada. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si, después de 56 días de almacenamiento a 45 °C, se detecta menos de aproximadamente el 12% de la proteína en forma agregada. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 42 días de almacenamiento a 45 °C, se detecta menos de aproximadamente el 10% o menos de aproximadamente el 9% de la proteína en forma agregada. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 28 días de almacenamiento a 45 °C, se detecta menos de aproximadamente el 8% o menos de aproximadamente el 7,5% o menos de aproximadamente el 7% de la proteína en forma agregada. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si, después de 14 días de almacenamiento a 45 °C, se detecta menos de aproximadamente el 6% de la proteína en forma agregada. Una formulación farmacéutica también puede considerarse 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 forma agregada. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 120 minutos de agitación (*por ejemplo*, usando vórtex) a temperatura ambiente se detecta menos de 3% o menos de 2,5% de la proteína en forma agregada.

La estabilidad también puede medirse, *entre otras cosas*, determinando la formulación en partículas dentro de la formulación después del almacenamiento durante un tiempo definido a una temperatura definida. La formación de partículas puede determinarse, por ejemplo, mediante técnicas de microscopía o técnicas de formación de imágenes de micro-flujos.

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

Por consiguiente, una formulación farmacéutica (que contiene una esterasa o lipasa) puede considerarse estable si después de almacenarse 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 se identifica más de un número especificado de partículas de ácidos grasos $\geq 10\ \mu\text{m}$ o $\geq 25\ \mu\text{m}$ de tamaño (*por ejemplo*, 3000 partículas, 1000 partículas, 500 partículas, 250 partículas, 100 partículas o 50 partículas) dentro de un volumen de 2,25 mL. Por ejemplo, una formulación farmacéutica puede considerarse estable si después de 24 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 3000 partículas de ácidos grasos en un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. En otro aspecto, una formulación farmacéutica puede considerarse estable si después de 24 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 1000 partículas de ácidos grasos en un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 24 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 500 partículas de ácidos grasos en un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 24 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 250 partículas de ácidos grasos en un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 24 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 150 partículas de ácidos grasos en un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también

puede considerarse estable si después de 36 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 1000 partículas de ácidos grasos en un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 36 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 500 partículas de ácidos grasos en un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 36 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 250 partículas de ácidos grasos en un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 36 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 150 partículas de ácidos grasos en un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 36 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 100 partículas de ácidos grasos en un volumen de 2,25 mL mediante microscopía. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 36 meses de almacenamiento a 5 °C no se identifican más de 50 partículas de ácidos grasos en un volumen de 2,25 mL mediante microscopía.

La estabilidad también puede medirse, *entre otras cosas*, determinando el porcentaje de proteína nativa de interés que permanece en la formulación después de su almacenamiento durante un tiempo definido a una temperatura determinada. El porcentaje de proteína nativa de interés puede determinarse, *entre otras cosas*, mediante cromatografía de exclusión por tamaño (*porejemplo*, cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión por tamaño (SE-HPLC)). Un "grado aceptable de estabilidad", como se usa esta frase en este documento, significa que al menos 90% de la forma nativa de la proteína puede detectarse en la formulación después de su almacenamiento durante un periodo de tiempo definido a una temperatura determinada. En ciertos aspectos, al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o 100% de la forma nativa de la proteína puede detectarse en la formulación después de su almacenamiento durante un tiempo definido a una temperatura determinada. La cantidad de tiempo definida después de lo cual la estabilidad se midió puede ser 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 en la cual la formulación farmacéutica puede ser almacenada cuando se evalúa la estabilidad puede ser cualquier temperatura desde

aproximadamente -80 °C hasta 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 puede medirse, *entre otras cosas*, 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. La desamidación de la proteína puede provocar que la proteína llegue a ser cargada más negativavemnte y, de este modo, más ácida en relación con la proteína no desamidada (véase, *por ejemplo*, Robinson, N., Protein Deamidation, *PNAS*, 16 de abril de 2002, 99(8): 5283-5288). El porcentaje de proteína "acidificada" puede determinarse mediante cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio catiónico (CEX-HPLC) o cromatografía líquida de ultra alto rendimiento de intercambio catiónico (CEX-UPLC)). Un "grado aceptable de estabilidad", como se usa esta frase en este documento, significa que como máximo el 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0,5% o 0,1% de la proteína puede detectarse en una forma ácida en la formulación después de su almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura determinada. 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 puede almacenarse la formulación farmacéutica cuando se evalúa la estabilidad puede ser cualquier temperatura desde aproximadamente -80 °C hasta 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 objetivo también puede usarse para evaluar la estabilidad. Por ejemplo, una formulación de la presente descripción puede considerarse estable si, después de su almacenamiento a,

por *ejemplo*, -80 °C, -30 °C, -20 °C, 5 °C, 25 °C, 37 °C, 45 °C, etc. durante una cantidad de tiempo definida (*por ejemplo*, 14 días a 9 meses), un anticuerpo anti-IL-4R contenido en 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 tal almacenamiento. La afinidad de unión puede determinarse por cualquier método, tal como *por ejemplo* ELISA o resonancia de plasmón. La actividad biológica puede determinarse, por ejemplo, midiendo la actividad posterior del sistema IL-4R en presencia del anticuerpo, y comparando la actividad con la actividad del sistema IL-4R en ausencia del anticuerpo.

Las referencias a la estabilidad de las formulaciones farmacéuticas "después" de un periodo 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 periodo de tiempo específico, y no pretenden significar 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 realizó en o aproximadamente 12 meses después del inicio del estudio.

ENVASES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

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

Las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción pueden estar contenidas dentro de jeringas de "tungsteno normal" o de "bajo contenido de tungsteno". Como podrán apreciar las personas de habilidad ordinaria en la técnica, el proceso de elaboración de jeringuillas de vidrio implica en general el uso de una varilla de tungsteno caliente que perfora el vidrio creando así un orificio por el que se pueden extraer y

expulsar los líquidos de la jeringa. Este proceso resulta en la deposición de cantidades trazas de tungsteno en la superficie interior de la jeringa. El lavado subsecuente y otros pasos de procesamiento se pueden usar para reducir la cantidad de tungsteno en la jeringa. Como se usa en este documento, el término "tungsteno normal" significa que la jeringa contiene más de 500 partes por billón (ppb) de tungsteno. El término "bajo contenido de tungsteno" significa que la jeringa contiene menos de 500 ppb de tungsteno. Por ejemplo, una jeringa baja en tungsteno, de conformidad con la presente descripción, 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 usados en las jeringuillas y los tapones de goma usados para cerrar las aberturas de los viales pueden estar recubiertos para evitar la contaminación del contenido medicinal de la jeringa o el vial y/o para preservar su estabilidad. De este modo, las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción, de conformidad con ciertos aspectos, pueden estar contenidas dentro de una jeringa que comprende un émbolo revestido, o dentro de un vial que está sellado con un tapón de goma revestido. Por ejemplo, el émbolo o el tapón pueden estar recubiertos con una película de fluorocarbono. Ejemplos de tapones y/o émbolos recubiertos adecuados para su uso con viales y jeringas que contienen las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción se mencionan, por ejemplo, en las Patentes Estadounidenses Nos. 4,997,423; 5,908,686; 6,286,699; 6,645,635; and 7,226,554, cuyos contenidos se incorporan por referencia en este documento en su totalidad. Ejemplos particulares de tapones y émbolos de goma recubiertos que pueden usarse en el contexto de la presente descripción están comercialmente disponibles bajo el nombre comercial "FluroTec®", disponible de West Pharmaceutical Services, Inc. (Lionville, PA). De conformidad con ciertos aspectos de la presente descripción, las formulaciones farmacéuticas pueden estar contenidas dentro de una jeringa de bajo contenido en tungsteno que comprende un émbolo recubierto de fluorocarbono. En algunos aspectos, el contenedor es una jeringa, tal como una jeringa Ompi EZ-Fill™ o una jeringa BD Neopak™. En algunos casos, la jeringa es una jeringa larga de vidrio de 1 mL con un pistón iWest de 1 mL, una aguja de pared fina 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 una jeringa 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, 7,0 mL, 7,5 mL, 8,0 mL, 8,5 mL, 9,0 mL, 9,5 mL, o 10 mL (*por ejemplo*, una jeringa de vidrio).

Las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse a un paciente por vías parenterales tales como la inyección (*por ejemplo*, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, etc.) o la administración percutánea, mucosa, nasal, pulmonar y/u oral. Numerosos dispositivos de suministro autoinyectores y/o de pluma reutilizables pueden usarse para la administración subcutánea de las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción. Algunos ejemplos incluyen, pero no se limitan a, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), pluma DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, y OPTICLIK™ (sanofi-aventis, Frankfurt, Alemania), por nombrar sólo algunos. Ejemplos de dispositivos de suministro autoinyectores y/o pluma desechable que tienen aplicaciones en la administración subcutánea de una composición farmacéutica de la presente descripción incluyen, pero no se limitan a, la pluma SOLOSTAR™ (sanofi-aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y KWIKPEN™ (Eli Lilly), autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), EPIPEN (Dey, L.P.), y Pluma HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), por nombrar sólo algunos. En algunos casos, la formulación farmacéutica está contenida en una jeringa específicamente adaptada para su uso con un autoinyector. Las inyecciones subcutáneas pueden ser administradas usando una aguja de calibre 20-30, o una aguja de calibre 25-30. En algunos casos, las inyecciones subcutáneas pueden ser administradas usando una aguja de calibre 25. En algunos casos, las inyecciones subcutáneas pueden ser administradas usando una aguja de calibre 27. En algunos casos, las inyecciones subcutáneas pueden ser administradas usando una aguja de calibre 29.

Otro tipo de dispositivo de suministro puede incluir un sistema de seguridad. Tales dispositivos pueden ser relativamente baratos y funcionan para extender manualmente o automáticamente un manguito de seguridad sobre la aguja una vez que la inyección es finalizada. Ejemplos de sistemas de seguridad pueden ser el dispositivo ERIS de West Pharmaceutical, o el dispositivo UltraSafe de Becton Dickinson. Además,

también se contempla el uso de un dispositivo de gran volumen ("LVD"), o inyector en bolo, para administrar las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción. En algunos casos, el LVD o inyector de bolo puede estar configurado para inyectar un medicamento en un paciente. Por ejemplo, un inyector de LVD o de bolo puede estar configurado para suministrar un volumen "grande" de medicamento (típicamente de aproximadamente 2 mL hasta aproximadamente 10 mL).

Las formulaciones farmacéuticas de la presente descripción también pueden estar contenidas en una forma de dosificación unitaria. El término "forma de dosificación unitaria", como se usa en este documento, se refiere a una unidad físicamente discreta adecuada como dosificación unitaria para el paciente que será tratado, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico, diluyente o excipiente requerido. En varios aspectos, la forma de dosificación unitaria está contenida dentro de un contenedor, como se discute en este documento. Los niveles de dosificación actuales del ingrediente activo (por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-4R) en las formulaciones de la presente descripción pueden variarse para obtener una cantidad del ingrediente activo que sea efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particulares, sin efectos adversos para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos, incluyendo la actividad de las composiciones particulares de la presente descripción empleadas, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular siendo empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y el historial médico previo del paciente que está siendo tratado, y factores similares bien conocidos en las artes médicas. El término "diluyente", como se usa en este documento, se refiere a una solución adecuada para alterar o lograr una concentración o concentraciones ejemplares o apropiadas, como se describe en este documento.

En varios aspectos, la forma de dosificación unitaria contiene una cantidad de ingrediente activo (por ejemplo, un anticuerpo anti-IL-4R) destinada a un solo uso. En varios aspectos, la cantidad del ingrediente activo en la forma de dosificación unitaria es desde aproximadamente 0,1 mg hasta aproximadamente 5000 mg, desde aproximadamente 100 mg hasta aproximadamente 1000 mg, y desde aproximadamente 100 mg hasta aproximadamente 500 mg, desde aproximadamente 100 mg hasta

aproximadamente 400 mg, desde aproximadamente 100 mg hasta aproximadamente 200 mg, desde aproximadamente 250 mg hasta aproximadamente 350 mg, desde aproximadamente 125 mg hasta aproximadamente 175 mg, desde aproximadamente 275 mg hasta aproximadamente 325 mg, o rangos o intervalos de los mismos. Por ejemplo, se pretende incluir rangos de valores que utilicen una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente (o valores contenidos dentro de los rangos 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 principio 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 conformidad con la presente descripción es adecuada para la administración subcutánea a un paciente.

La presente descripción también incluye métodos de preparación de una forma de dosificación unitaria. En un aspecto, un método para preparar una forma de dosificación unitaria incluye combinar la formulación de cualquiera de los aspectos anteriores en un contenedor adecuado (*por ejemplo*, los contenedores descritos en este documento).

USOS TERAPÉUTICOS DE LAS FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

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

Los métodos terapéuticos de la presente descripción comprenden administrar a un sujeto cualquier formulación que comprenda un anticuerpo anti-hIL-4R como se describe en este documento. El sujeto al que se administra la formulación farmacéutica puede ser, *por ejemplo*, cualquier animal humano o no humano que necesita tal tratamiento, prevención y/o alivio, o que de otro modo podría beneficiarse de la inhibición o atenuación de la actividad mediada por IL-4R y/o IL-4R. La presente descripción incluye además el uso de cualquiera de las formulaciones farmacéuticas descritas en este documento en la manufacturación de un medicamento para el tratamiento, prevención y/o alivio 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 afección inflamatoria, afección alérgica, trastorno pulmonar/respiratorio, trastorno gastrointestinal o trastorno dermatológico. En algunos aspectos, la enfermedad o trastorno es un trastorno inflamatorio de Tipo 2. En algunos aspectos, la enfermedad o trastorno es una enfermedad atópica. Ejemplos no limitantes de enfermedades y trastornos asociados con la actividad de la IL-4R incluyen la alergia (*por ejemplo*, alergia a alimentos, alergia ambiental, alergia a las gramíneas, alergia a los cacahuates, alergia a los productos lácteos), reacciones alérgicas, aspergilosis broncopulmonar alérgica, rinosinusitis fúngica alérgica (AFRS), rinitis alérgica, alopecia areata, asma (incluyendo asma leve, moderada o grave o asma persistente), artritis (incluyendo artritis séptica), dermatitis atópica (incluyendo 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, bronquiectasias, penfigoide bulloso, síndrome de Churg-Strauss, urticaria idiopática crónica, urticaria inducible por frío, urticaria crónica inducible, urticaria crónica espontánea (UCE), dermatitis de contacto (*por ejemplo*, dermatitis alérgica de contacto), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), esofagitis eosinofílica, gastroenteritis eosinofílica, enfermedad de Grave, herpetiforme, 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, anemia falciforme, síndrome de Sjogren, tuberculosis, colitis ulcerosa y enfermedad de Whipple.

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

Un sumario de las secuencias y los correspondientes SEC ID NOs a las que se hace referencia en este documento se muestra en la Tabla 1, a continuación.

Tabla 1. Listado Informal de Secuencias

SEC ID NO:	Secuencia	Descripción
1	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWV RQAPGKGLEWVSSISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLSITIRPRYYGLDV WGQGTTVTVS	Secuencia de aminoácidos de HCVR de Dupilumab
2	DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLYSIGYNYLD WYLQKSGQSPQLLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGFYYCMQALQTPYTFGQGTKLEIK	Secuencia de aminoácidos 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	QSLLYSIGYNY	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	EVQLVESGGGLEQPGGSLRLSCAGSGFTFRDYAMTWV RQAPGKGLEWVSSISGSGGNTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRLSITIRPRYYGLDV WGQGTTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYG PPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISK AKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDK SRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de Dupilumab
10	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLYSIGYNYLD WYLQKSGQSPQLLIYLGSNRASGVDPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDVGFYYCMQALQTPYTFGGGTKLEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de Dupilumab
11	MKVLQEPTCVSDYMSISTCEWKMNGPTNCSTELRLLYQ LVFLLSEAHTCIPENNGGAGCVCHLLMDDVVSADNYTLD LWAGQQLLWKGSKPSEHVKPRAPGNLTVHTNVSDTLL LTWSNPYPDNLYNLHTYAVNIWSENDPADFRIYNVTY LEPSLRIAASTLKSGISYRARVRAWAQCYNNTTWSEWSP STKWHNSYREPFEQH	IL-4R α humana
12	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSN SYLAWYQ QKPGQAPRLLIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPPWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-39
13	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPPWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-40

14	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIFGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPPWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-41
15	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSNSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPPWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-42
16	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSNSYLAWYQ QKPGQAPRLLIFGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPPWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-43
17	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPPWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-44
18	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDHSPPWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-45
19	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSAGWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-46
20	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDHSAGWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-47
21	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSNSYLAWYQ QKPGQAPRLLIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDHSPPWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-48
22	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDHSPPWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-49
23	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIFGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDHSPPWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-50
24	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDHSAGWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-51
25	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSNSYLAWYQ	SCB-VL-52

	QKPGQAPRLLIFGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDHSAGWTFGQGTKVEIK	
26	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSNSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDHSAGWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-53
27	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIFGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDHSAGWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-54
28	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDHSAGWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-55
29	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSNSYLAWYQ QKPGQAPRLLIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDHSAGWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-56
30	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQ QKPGQAPRLLIFGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYGSSPPWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-57
31	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSNSYLAWYQ QKPGQAPRLLIYGASSRAPGIPDRFSGSGSGTDFTLTIS RLEPEDFAVYYCQQYDHSAGWTFGQGTKVEIK	SCB-VL-58
32	EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYFDYWGQGLVT VSS	SCB-VH-59
33	EVQLVQSGGGLVQPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYFDYWGQGLVT VSS	SCB-VH-60
34	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYFDYWGQGLVT VSS	SCB-VH-61
35	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDN AK	SCB-VH-62

	NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYFFDYWGQGTLVT VSS	
36	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYFFDYWGQGTLVT VSS	SCB-VH-63
37	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYFFDYWGQGTLVT VSS	SCB-VH-64
38	EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYFFDYWGQGTLVT VSS	SCB-VH-65
39	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYFFDYWGQGTLVT VSS	SCB-VH-66
40	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYFFDYWGQGTLVT VSS	SCB-VH-67
41	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYFFPWWGQGTLVT VSS	SCB-VH-68
42	EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYFFPWWGQGTLVT VSS	SCB-VH-69
43	EVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYFFPWWGQGTLVT VSS	SCB-VH-70

44	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAASGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYYPWWGQGLVT VSS	SCB-VH-71
45	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYYPWWGQGLVT VSS	SCB-VH-72
46	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYYPWWGQGLVT VSS	SCB-VH-73
47	EVQLVQSGGGLVHPGRSLRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYYPDYWGQGLVT VSS	SCB-VH-74
48	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLTCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYYPDYWGQGLVT VSS	SCB-VH-75
49	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMHWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYYPDYWGQGLVT VSS	SCB-VH-76
50	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGEGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYYPDYWGQGLVT VSS	SCB-VH-77
51	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDE AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYYPDYWGQGLVT VSS	SCB-VH-78
52	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK	SCB-VH-79

	NSLYLQMNSLRAGDMAVYYCARGRYFFDYWGQGLVT VSS	
53	EVQLVQSGGGLVHPGGLRLSCAGSGFTFDDYAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYFFDYWGQGLVT VSS	SCB-VH-80
54	EVQLVQSGGGLVQPGGLRLSCAASGFTFSRNAMEFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYFFPWWGQGLVT VSS	SCB-VH-81
55	EVQLVESGGGLVHPGGLRLSCAASGFTFSRNAMEFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYFFPWWGQGLVT VSS	SCB-VH-82
56	EVQLVESGGGLVQPGGLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYFFPWWGQGLVT VSS	SCB-VH-83
57	EVQLVESGGGLVQPGGLRLSCAASGFTFSRNAMEFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYFFPWWGQGLVT VSS	SCB-VH-84
58	EVQLVESGGGLVQPGGLRLSCAASGFTFSRNAMEFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYFFPWWGQGLVT VSS	SCB-VH-85
59	EVQLVQSGGGLVHPGGLRLSCAASGFTFSRNAMEFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYFFPWWGQGLVT VSS	SCB-VH-86
60	EVQLVQSGGGLVQPGGLRLSCAGSGFTFSRNAMEFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDN AK NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYFFPWWGQGLVT VSS	SCB-VH-87

61	EVQLVESGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYYPWWGQGLT VTVSS	SCB-VH-88
62	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYYPWWGQGLT VTVSS	SCB-VH-89
63	EVQLVESGGGLVQPGGSRLSCAASGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYYPWWGQGLT VTVSS	SCB-VH-90
64	EVQLVESGGGLVQPGGSRLSCAASGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYYPWDYWGQGLT VTVSS	SCB-VH-91
65	EVQLVQSGGGLVHPGGSRLSCAGSGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATNYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDMAVYYCARGRYYPWDYWGQGLT VTVSS	SCB-VH-92
66	EVQLVESGGGLVQPGGSRLSCAASGFTFSRNAMFWV RQAPGKGLEWVSGIGTGGATSYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGRYYPWWGQGLT VTVSS	SCB-VH-93
67	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGKWWLDYWGKGTL VTVSS	MEDI-1-VH
68	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWDTSLSANYVFGTGTKLTVL	MEDI-1-VL
69	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGKWWLYNWGKGTL	MEDI-2-VH

	VTVSS	
70	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWDTSQPPNPLFGTGTKLTVL	MEDI-2-VL
71	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKLLKNPWGKGTLV TVSS	MEDI-3-VH
72	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWFGTPASNYVFGTGTKLTVL	MEDI-3-VL
73	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYNWGKGTL VTVSS	MEDI-4-VH
74	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWDTSPPQPIFGTGTKLTVL	MEDI-4-VL
75	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYDWGKGTL VTVSS	MEDI-5-VH
76	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWDTSPPQPIFGTGTKLTVL	MEDI-5-VL
77	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-6-VH
78	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ LPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGL QTGDEADYYCGTWDTSSTYHPIFGTGTKLTVL	MEDI-6-VL
79	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT	MEDI-7-VH

	STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWWQYWGKGT LVTVSS	
80	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWD TSSPPQPIFGTGTKLTVL	MEDI-7-VL
81	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWWQYWGKGT LVTVSS	MEDI-8-VH
82	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ LPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGL QTGDEADYYCGTWD TSTTYHPIFGTGTKLTVL	MEDI-8-VL
83	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYNWGKGTL VTVSS	MEDI-9-VH
84	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ LPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGL QTGDEADYYCGTWD TSTMYPLFGTGTKLTVL	MEDI-9-VL
85	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYDWGKGTL VTVSS	MEDI-10-VH
86	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWD TSTVLTPIFGTGTKLTVL	MEDI-10-VL
87	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWFYDWGKGTL VTVSS	MEDI-11-VH
88	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ LPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGL QTGDEADYYCGTWD TSPSMIPLFGTGTKLTVL	MEDI-11-VL
89	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA	MEDI-12-VH

	RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWFYDWGKGT LVTVSS	
90	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ LPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGL QTGDEADYYCGTWD TSTTMYPLFGTGKLTVL	MEDI-12-VL
91	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYDWGKGT LVTVSS	MEDI-13-VH
92	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWD TSTTLQPLFGTGKLTVL	MEDI-13-VL
93	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYNWGKGT LVTVSS	MEDI-14-VH
94	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWD TSPPTKPLFGTGKLTVL	MEDI-14-VL
95	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYNWGKGT LVTVSS	MEDI-15-VH
96	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ LPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGL QTGDEADYYCGTWD TSTHRHPLFGTGKLTVL	MEDI-15-VL
97	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWLYNWGKGT LVTVSS	MEDI-16-VH
98	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWD TSTTYHPIFGTGKLTVL	MEDI-16-VL

99	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWWQHWGKGT LVTVSS	MEDI-17-VH
100	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWD TSPVDRPIFGTKLTVL	MEDI-17-VL
101	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWWQHWGKGT LVTVSS	MEDI-18-VH
102	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ LPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGL QTGDEADYYCGTWD TSTTPMPVFGTGKLTVL	MEDI-18-VL
103	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKWWWQHWGKGT LVTVSS	MEDI-19-VH
104	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWD TSTTYHPIFGTGKLTVL	MEDI-19-VL
105	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-20-VH
106	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWD TSTVWEWPFGTKLTVL	MEDI-20-VL
107	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGG SASYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-21-VH
108	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ LPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGL	MEDI-21-VL

	QTGGDEAVYFCGTWDTSTVWEWPFGTKLTVL	
109	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-22-VH
110	QPVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ LPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGL QTGDEADYFCGTWDTSTVWEWPFGTKLTVL	MEDI-22-VL
111	QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-23-VH
112	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNNYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPPGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWDTSTVWEWPFGTKLTVL	MEDI-23-VL
113	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPRGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-24-VH
114	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYFCGTWDTSTVWEWPFGTKLTVL	MEDI-24-VL
115	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPRGGSASYAQKFQGRVSMTRDT STSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-25-VH
116	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTTATLAITG LQTGDEADYYCGTWVTSTVWEWPFGTKLTVL	MEDI-25-VL
117	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-26-VH
118	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ	MEDI-26-VL

	QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYFCGTWDTSTVWEWPFGTKLTVL	
119	QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRPEDTAVYYCARGKYWMYDWGKGTQ VTVSS	MEDI-27-VH
120	QSVLTQPPLVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ RLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWDTSTVWEWPFGTKLTVL	MEDI-27-VL
121	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGNGTL VTVSS	MEDI-28-VH
122	LPVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSSIGNSYVSWYQL PGAAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGFRSGTSATLAITGLQ TGDEADYYCGTWDTSPVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-28-VL
123	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTR VTVSS	MEDI-29-VH
124	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWDTSPVWEWPFGTKLTVL	MEDI-29-VL
125	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-30-VH
126	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ RLPGAAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWDTSTVWEWPFGTKLTVL	MEDI-30-VL
127	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-31-VH

128	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSSIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWATSPVWEWPFGTGTKLTVL	MEDI-31-VL
129	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-32-VH
130	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ LPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGL QTGDEADYFCGTWDTSTAWEWPFGTGTKLTVL	MEDI-32-VL
131	QVQLVQSGAEKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-33-VH
132	QSALTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ LPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGL QTGDEADYFCGTWDTSTVWEWPFGTGTKLTVL	MEDI-33-VL
133	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVSMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-34-VH
134	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYFCGTWDTSTVWEWPFGTGTKLTVL	MEDI-34-VL
135	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-35-VH
136	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWDTSPVWEWPFGTGTKLTVL	MEDI-35-VL
137	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSASYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSED TAVYYCARGKYWMYDWGKGTL	MEDI-36-VH

	VTVSS	
138	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ LPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGL QTGDEADYYCGTWDSSTVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-36-VL
139	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPRGGSTSYAQKFQGRVAMTRDT STSTVYMELSSLRPEDTAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-37-VH
140	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDRFSGSKSGTSATLAIT GLQTGDEADYYCGTWDTSPVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-37-VL
141	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSASYSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-38-VH
142	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYFCGTWDTSTVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-38-VL
143	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPRGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-39-VH
144	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWDTSTAWEWPFGTGKLTVL	MEDI-39-VL
145	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSS	MEDI-40-VH
146	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ LPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITGL QTGDEADYYCGTWDSSTVWEWPFGTGKLTVL	MEDI-40-VL
147	QVQLVQSGAEVRKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWMGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT	MEDI-41-VH

	STSTVYMELSSLRPEDTAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVSG	
148	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSTNIGNSYVSWYQ RLPGTAPKLLIYDNNKRPPGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWDSTVWEWPFGTKLTVL	MEDI-41-VL
149	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWA RQAPGQGLEWVGIINPSGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSGDTAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVVSS	MEDI-42-VH
150	QAVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGSSNIGNSYVSWYQ RLPGAAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLAITG LQTGDEADYYCGTWDSTGWEPFGTKLTVL	MEDI-42-VL
151	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFTSYMHWW RQAPGQGLEWMGIINPRGGSTSYAQKFQGRVTMTRDT STSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGKYWMYDWGKGTL VTVVSS	MEDI-37GL- VH
152	QSVLTQPPSVSAAPGQKVTISCSGGGSSIGNSYVSWYQ QLPGTAPKLLIYDNNKRPSGIPDRFSGSKSGTSATLGITG LQTGDEADYYCGTWDSTSPWEWPFGTKLTVL	MEDI-37GL- VL
153	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISSGGGNIYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLRRYFDYWGGQGLTV VSS	AJOU-1-VH
154	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISSGGSSIYYADSVKGRFTISRDN NTLHLQMNSLRAEDTAVYYCARGPQRSATAVFDYWGG GTLVTVSS	AJOU-2-VH
155	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSWISPNSGNIYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRPLSAAWSHSSYYNA MDVWGGQGLTVTVSS	AJOU-3-VH
156	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYAMSWV RQAPGKGLEWVSLISHSGSNTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARPHRAFDYWGGQGLTV	AJOU-4-VH

	TVSS	
157	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSGISHGSIYYADSVKGRFTISRDNKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARPHRAFDYWGQGTLVTVS S	AJOU-5-VH
158	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSGISHGNGSIYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTGRHFDYWGQGTLV TVSS	AJOU-6-VH
159	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSSISPSGSSIYYADSVKGRFTISRDN NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSYRAFDYWGQGTLVT SS	AJOU-7-VH
160	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISPSGSSIYYADSVKGRFTISRDN NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAKRAFDYWGQGTLVT SS	AJOU-8-VH
161	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISPSGSGSTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKFRHFDYWGQGTLVT VSS	AJOU-9-VH
162	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSAISSGGGNIYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVHRAFDYWGQGTLV TVSS	AJOU-10-VH
163	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSAITSSGRSIYYADSVKGRFTISRDN NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVHRAFDYWGQGTLVT VSS	AJOU-69-VH
164	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSAITSSGANIYYADSVKGRFTISRDN NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVHRAFDYWGQGTLVT VSS	AJOU-70-VH
165	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV	AJOU-71-VH

	RQAPGKGLEWVSAITSSGGNIYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVHRAFDYWGQGT LVT VSS	
166	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWV RQAPGKGLEWVSAITAGGGSIIYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVHRAFDYWGQGT LVT VSS	AJOU-72-VH
167	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRHAMAWV RQAPGKGLEWVSAITSSGRSIIYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARVHRAFDYWGQGT LVT VSS	AJOU-83-VH
168	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGNNNYVNWYQ LPGTAPKLLIYDNSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCGTWDASLSAYVFGGGTKLTVL	AJOU-33-VL
169	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSNIGNNNVSWY QQLPGTAPKLLIYANSKRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCGSWDDSL SAYVFGGGTKLTVL	AJOU-34-VL
170	QSVLTQPPSAPGTPGQRTVISC TGSSSNIGSNSVNWYQ QLPGTAPKLLIYDDSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCDAWDSSLSAYVFGGGTKLTVL	AJOU-35-VL
171	QSVLTQPPSASGTPGQRTVLSCTGSSSNIGSNYVSWYQ QLPGTAPKLLIYADSQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCGTWDDSLSGYVFGGGTKLTVL	AJOU-36-VL
172	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSSSSNIGSNYVSWYQ QLPGTAPKLLIYSDSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCGSWDYSL SAYVFGGGTKLTVL	AJOU-37-VL
173	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC TGSSSNIGNNTVSWYQ LPGTAPKLLIYDNSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LQSEDEADYYCGSWDYSL SAYVFGGGTKLTVL	AJOU-38-VL
174	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC TGSSSNIGNNDVNWYQ QLPGTAPKLLIYDSQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCATWDASLSAYVFGGGTKLTVL	AJOU-39-VL
175	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC TGSSSNIGSNAVNWYQ QLPGTAPKLLIYDNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS	AJOU-40-VL

	GLRSEDEADYYCGTWDDSLNGYVFGGGTKLTVL	
176	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNAVWYQ LPGTAPKLLIYDDSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCGSWDYSL SAYVFGGGTKLTVL	AJOU-41-VL
177	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTFNWYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCGTDYSLSGYVLGGGTKLTVL	AJOU-42-VL
178	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTFNWYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCGTDYSLSGYVLGGGTKLTVL	AJOU-77-VL
179	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTFNWYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCGTDYSLRGYVLGGGTKLTVL	AJOU-78-VL
180	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTFNWYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCGYWDYSLSGYVLGGGTKLTVL	AJOU-79-VL
181	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTFNWYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCGTDYSLSGYVLGGGTKLTVL	AJOU-80-VL
182	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSANSRTDGFNWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCGTDYSLSGYVLGGGTKLTVLG	AJOU-86-VL
183	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSAQFGSRDNFNWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCGTDYSLSGYVLGGGTKLTVLG	AJOU-87-VL
184	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSTKQMHNYQFNWY QQLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAI SGLRSEDEADYYCGTDYSLSGYVLGGGTKLTVLG	AJOU-88-VL
185	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLLRGENLQFNWYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCGTDYSLSGYVLGGGTKLTVLG	AJOU-89-VL
186	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSPLFPDSGSFNWYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCGTDYSLSGYVLGGGTKLTVLG	AJOU-90-VL

187	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISCSSAALDLSPSFNWFYQ QLPGTAPKLLIYADSHRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAIS GLRSEDEADYYCGTWDYSLSGYVLGGGTKLTVLG	AJOU-91-VL
188	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVR QAPGQGLEWMGWISVYNGKTNYAQKLQGRVTMTTDTST TTTAYMRLSRSDDTAVYYCARGSGYDLDYWGQGTLSV VSS	REGN-VH-3
189	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFWMTWR QAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRFTISRDNAL NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDPGRMTVRGGIRYYYG MDVWGQGTTVTVSS	REGN-VH-19
190	EVKLAESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHWMNWW RQAPGKGLEWVANIKQDGSDKYYVDSVKGRFTISRDNAL KNSLYLQLNSLIAEDTAVYYCARDRGVRPPRGAFDIWG QGTMTVTVSS	REGN-VH-35
191	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFNSYGISWVR QAPGQGLEWMGWIRTYNGNTNYAQKLQGRVTMTTDTST TSTAYMELRLSRSDDTAVYYCARDEARIVVAGTTPYYYG MDVWGQGTTVTVVSS	REGN-VH-51
192	QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFTISDHYSWIR QAPGKGLEWISYISSSGSKIYYADSVKGRFTISRDNALN SLFLQMNSLRAEDTAVYYCARTRQLVGDYWGQGTSLV TVSS	REGN-VH-67
193	EVQLVESGGGLVQPGSRSLRLSCAASGFTFDNYAMHWV RQAPGKGLEWVSGIRWNSGSIGYADSVKGRFTISRDNAL KNSLYLQMNSLRAEDTALYYCAKEGGYSGYRPGPFDDY WGQGTSLVTVVSS	REGN-VH-83
194	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVR QAPGQGLEWMGWISVYNGHTNYAQKLQGRVTMTTDTST TSTAYMELRLSRSDDTAVYYCARGSGYDFDSWGQGT LTVVSS	REGN-VH-99
195	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASRYTFTSYDINWVR QATGQGLEWMGWMNPNSGNTGYAQKFQGRVTMTRN TSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARVRRFFDYWGQGT L	REGN-VH- 115

	VTWVSS	
196	QVQLVQSGPEVKKPGASVKVSCASGYFTNRYGISWVR QAPGQGLEWMGWISVYNGNINYAQLQGRVTMTTDS TSTAYMDLRSLRSDDTAVYYCARGSGYDFDYWGQGT LVTWVSS	REGN-VH- 147
197	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCDSAYTFNRYGISWVR QAPGQGLEWMGWISAYTGNTVYAQLQGRVTMTTDS TSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARDKSIFGVVRGFDYWG QGTLVTVWSS	REGN-VH- 163
198	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGIRNALGWYQQ KPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGTDFTLTFS SLQPEDFATYYCLQDFNYPYTFGQGTKLEIK	REGN-VL-11
199	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTISCRASQGVSSWLAWYQ QKPGNAPKLLISAASSIQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCQQANSFPLTFGGGTTKVEIK	REGN-VL-27
200	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSWLAWYQQ KPGKAPKLLIYAASSFQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYFCQQANSFPLTFGGGTTVEIK	REGN-VL-43
201	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISIWLAWYQ QS PGKAPKLLINVASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT INSLQPEDFVTYCQQANSFPITFGQGTRLATK	REGN-VL-59
202	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCWAQGISSYLAWYQ QK PGKAPKLLIFAASTLQSGVPSRFSGSGTEFTLT ISSLPEDFATYYCQLNSYPLTFGGGTTKVEIR	REGN-VL-75
203	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVNYNLAWYQ H KPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPLTFGGGTTKVEIK	REGN-VL-91
204	AIQMTQSSSSLSASVGDRVTITCRASQAIRNALGWYQ KP GKAPKVLIIYAASSLQSGIPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLPEDFATYYCLQDYPYTFGQGTKLEIK	REGN-VL- 107
205	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCWAQGISSYLAWYQ KP GKAPKLLIYAASTLHSGVPSRFSGSGTEFTLT ISSLPEDFATYYCHQLKSYPTFGQGTRLEIK	REGN-VL- 123
206	AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNALGWYQ KP	REGN-VL-

	GKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSASGTDFTLTISLQP EDFAAAYYCLQDYNYPYTFGQGTKLEIK	155
207	EIVMTQSPVTLSPGERATLPCRASQSVSSSLAWYQQKA GQSPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTEFTLTISNLQS EDFAVYYCQQYNNWPLTFGGGGTKVEIK	REGN-VL- 171

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos se exponen con el fin de proporcionar a aquellos de habilidad ordinaria una divulgación y descripción completa de cómo elaborar y usar los métodos y composiciones de la invención, y no pretenden limitar el alcance de lo que los inventores consideran su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la exactitud con respecto a los números usados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse 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 medio, la temperatura es en grados centígrados y la presión es atmosférica o cercana a la atmosférica.

Determinación de Partículas Subvisibles

Para la determinación de partículas subvisibles, los métodos adecuados incluyen el "Método 1" (Ensayo de Conteo de Partículas por Oscurecimiento por Luz) y el "Método 2" (Ensayo de Conteo de Partículas Microscópicas). Utilizando el oscurecimiento por luz, el requerimiento de la FDA para partículas subvisibles en productos farmacéuticos parenterales es $\leq 6,000$ partículas por contenedor para partículas ≥ 10 micrómetros de diámetro, y ≤ 600 partículas por contenedor para partículas ≥ 25 micrómetros de diámetro. Utilizando el método microscópico, el requerimiento de la FDA para partículas subvisibles en productos farmacéuticos parenterales es $\leq 3,000$ partículas por contenedor para partículas ≥ 10 micrómetros de diámetro, y ≤ 300 partículas por contenedor para partículas ≥ 25 micrómetros de diámetro. Actualmente, no existe ninguna especificación para las partículas de menos de 10 micrómetros de diámetro, pero la FDA ha solicitado que se midan las partículas de 2 a 10 micrómetros.

Las partículas de más de 1 micrómetro de diámetro se midieron usando el oscurecimiento por luz HIAC y la imagen de micro-flujo Brightwell (MFI). La HIAC combina el oscurecimiento de la luz con la dispersión de luz láser, lo que permite detectar y contar partículas de entre 500 nm-350 μ m en una corriente de fluido en movimiento. Las partículas se clasificaron por tamaño con base en la respuesta de estrés generada en el detector y se clasificaron en rangos de tamaño predeterminados

con base en la respuesta de estrés.

Para los ensayos de HIAC, se agruparon muestras de una línea de manufacturación (lotes GMP) que contiene un anticuerpo monoclonal a 150 mg/mL 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 anticuerpos de 150 mg/mL también se examinaron usando HIAC. Se mezclaron muestras de al menos tres viales (2,5 mL/vial), siete jeringas de 1 mL (1,14 mL/jeringa) o cinco jeringas de 2,25 mL (2 mL/jeringa) y se realizaron tres lecturas de un mililitro por lectura. Se usaron los instrumentos HIAC 9703 y HIAC 8000A (Hach Company, Loveland, Colo.) usando la sonda HRLD 400 (que lee hasta 18,000 conteos acumulativos por mL) y la sonda MC05 (que lee hasta 10,000 conteos acumulativos por mL) respectivamente, para realizar las lecturas de oscurecimiento por luz.

El método MFI utilizó menos material(es *decir*, 1 mL de formulación, o 1 vial o jeringa de estabilidad) que el oscurecimiento por luz HIAC y produjo un mayor número de partículas que el HIAC. Dado que el MFI se basa en la 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 las muestras de jeringa precargada. El MFI se realizó en una muestra de laboratorio que contiene 150 mg/mL de un anticuerpo monoclonal (como en los análisis HIAC). Para el IFM, se realizó una lectura de un mililitro por lectura.

Determinación de la Degradación del Polisorbato

La degradación del polisorbato se examinó usando uno o más de varios métodos. El primer método emplea un ensayo enzimático colorimétrico para cuantificar los ácidos grasos no esterificados (NEFA). Se utilizó el kit de NEFA-HR(2) (Wako Diagnostics, Richmond, Va.) para detectar ácidos grasos en la sustancia farmacéutica formulada que contiene polisorbato. Brevemente, 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 reaccionó con oxígeno y acil-CoA oxidasa para producir trans-2,3-dehidroacil-CoA y peróxido de hidrógeno. La peroxidasa catalizó la reacción del peróxido de hidrógeno con 4-aminoantipirina y 3-metil-N-etil-N-(β-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, véase Duncombe, "The Colorimetric Micro-Determination of Non-Esterified Fatty Acids in Plasma," Clin Chim Acta. 9: 122-5 (1964); Itaya and 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); and Elphick, M. C., “Modified Colorimetric Ultramicro Method for Estimating NEFA in Serum,” J. Clin. Pathol. 21(5): 567-70 (1968).

La muestra de ensayo que contiene la proteína de interés (y la putativa proteína contaminante de la célula hospedera) se aplicó a un filtro de corte de peso molecular de 10 kDa. El retentado se recuperó en 10 mM de histidina (pH 6,0) a más de 100 g/L de proteína y se le añadió polisorbato para obtener una muestra de ensayo de 100 g/L de proteína, 0,8% (p/v) de polisorbato, 10 mM de histidina, pH 6,0 ($t_{inicial}$). La muestra de ensayo se sometió a 45 °C durante 44 horas ($t_{inicial}$). Algunas muestras se enriquecieron con ácido oleico para evaluar la eficacia de la recuperación de NEFA en las muestras. El porcentaje de degradación del polisorbato se calculó de la siguiente manera:

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

El segundo método para determinar la degradación del polisorbato se basa en la espectrometría de masas. Usando el análisis de LC-MS, este ensayo permitió la medición y comparación del porcentaje inicial de ésteres y el porcentaje restante de ésteres en los polisorbatos después de la incubación a 45 °C en diferentes puntos de tiempo.

Brevemente, se aplicaron 15 mg de muestra de anticuerpo (del orden de 5-10 mg/mL, o 7 mg/mL $\pm$ 1,5 mg/mL) a un ultra-filtro (Amicon Ultra 50K, Millipore, Billerica, Mass.) y se centrifugó a 14,000 $\times$ g durante 15 minutos o hasta que el volumen restante estuviera ligeramente por debajo de la marca de 100 μ L del dispositivo. Se añadió 1 μ L de polisorbato al 10% en el filtro de centrifugado con la proteína concentrada seguido por agitación en vórtex. La muestra se recuperó mediante centrifugación invertida durante 5 minutos a 1000 g para recuperar todo el volumen en el tubo de recolección.

El volumen recuperado se midió y se calculó la concentración de polisorbato. Se diluyó 100 veces 1 μ L de cada muestra recuperada en un tubo separado y se midió la concentración de proteínas con Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Inc., Wilmington, Del.). Las muestras entonces se diluyeron en amortiguador de histidina (10 mM, pH 6,0) y solución base de polisorbato para alcanzar una concentración de proteína de 150 mg/mL y una concentración de polisorbato del 0,2% (p/p).

Se reservó la muestra de tiempo cero (T_0) (2 μ L) de cada muestra y se almacenó a -80 °C hasta su uso. Las muestras que serán analizadas se sellaron bajo argón y se incubaron a 45 °C para inducir la degradación, y se retiraron para analizarlas en los

puntos temporales prescritos. Se tomaron 2 μL de cada una de las muestras en cada punto temporal y se diluyeron con agua hasta 100 μL . Cada muestra diluida del punto temporal se almacenó a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Después de la recolección de cada punto temporal, el espacio de la cabeza del tubo de muestra se llenó con gas argón, el contenedor de muestra se volvió a cerrar y la muestra se regresó a la incubadora para reanudar la incubación.

Las muestras de los puntos temporales se analizaron usando una columna de intercambio aniónico (columna Oasis MAX, 30 μm , 2,1 mm $\times$ 20 mm; Waters Corporation, Milford, Mass.) seguida a $t=5$ minutos de cromatografía en fase inversa (columna ACQUITY UPLC® BEH 130 C4, 1,7 μm , 2,1 mm $\times$ 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 fase móvil A al 99% (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 inyección de blanco. Los parámetros del espectrómetro de masas fueron los siguientes: rango de masas 150-2000 m/z ; temperatura del calentador a $250\text{ }^{\circ}\text{C}$; estrés 3,8 kv; gas de la cubierta 40; gas auxiliar 10; temperatura del capilar $350\text{ }^{\circ}\text{C}$; y lente S 50. Cuando no fue necesaria una identificación basada en la espectrometría de masas, se utilizó la detección de aerosoles cargados (CAD) con una velocidad de flujo analítico y una temperatura de desolvatación a $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Lisa et al., "Quantitation of triacylglycerols from plant oils using charged aerosol detection with gradient compensation", J Chromatogr A. 1176(1-2): 135-42 (2007); Plante et al., "The use of charged aerosol detection with HPLC for the measurement of lipids", Methods Mol Biol. 579: 469-82 (2009)).

Tabla 2. Condiciones cromatográficas para la determinación de la degradación del polisorbato

Sistema UPLC	Waters ACQUITY UPLC I-Class/Dionex UltiMate 3000
Fase móvil	A: 0,1% de ácido fórmico en agua B: 0,1% de ácido fórmico en acetonitrilo
Columna	Waters Oasis ® MAC 30 μm , 2,1 $\times$ 20 mm, Parte No. 186002052 ACQUITY UPLC® BEH130 Columna C4, 1,7 μm , 2,1 mm $\times$ 50 mm de Waters, Parte No. 186004496
Temperatura de	$40^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$

la columna					
Temperatura del Automuestreador	5 °C ± 2 °C				
Volumen de inyección	20,0 µL				
	Tiempo (minuto)	% A	% B	Flujo (µL/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	1,0	100	Lineal

Para estimar la cantidad total de polioxietileno (POE), se extrajo el cromatograma de masas usando el intervalo 300-800 *m/z* para evitar interferencias de proteínas degradadas, y se integró el grupo de picos de aproximadamente 8-15 minutos. En los cromatogramas de CAD, el primer grupo de picos de POE se integró directamente de aproximadamente 8-15 minutos (de nuevo, el tiempo de retención puede desplazarse ligeramente). Cuando hubo otras especies co-eluyendo con el POE, se ajustó la línea de base para minimizar su impacto en el área de pico.

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

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

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

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

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

en donde n=2, 4 o 10 días.

Pruebas de Estabilidad de Producto Farmacéuticos

De conformidad con la Directriz de la Agencia Europea de Medicamentos sobre las Pruebas de Estabilidad de Sustancias Activas Existentes y Productos Terminados Relacionados (CPMP/QWP/122/02, rev 1 corr), las sustancias activas almacenadas en condiciones de almacenamiento a largo plazo (por ejemplo, a 5 °C para sustancias activas destinadas a ser almacenadas en un frigorífico, o a 25 °C para sustancias activas destinadas a ser almacenadas a temperatura ambiente) deben probarse cada 3 meses durante el primer año, cada 6 meses durante el segundo año, y anualmente a partir de entonces durante el periodo de reanálisis propuesto. Las sustancias activas almacenadas en condiciones de almacenamiento acelerado (por ejemplo, a 25 °C en el caso de las sustancias activas destinadas a ser almacenadas en un frigorífico, o a 40 °C en el caso de las sustancias activas destinadas a ser almacenadas a temperatura ambiente) deberán someterse a prueba en un mínimo de tres puntos, que incluyen los puntos de tiempo inicial y final, para un estudio de 6 meses (por ejemplo, pruebas a los 0, 3 y 6 meses). Se requieren 6 meses iniciales de datos de estabilidad para su presentación a la EMA.

Del mismo modo, un producto acabado almacenado en condiciones de almacenamiento a largo plazo (por ejemplo, a 5 °C para productos acabados destinados a almacenarse en un frigorífico, o a 25 °C para productos acabados destinados a almacenarse a temperatura ambiente) debe analizarse cada 3 meses durante el primer año, cada 6 meses durante el segundo año, y anualmente a partir de entonces durante toda la vida útil propuesta. Un producto acabado almacenado en condiciones de almacenamiento acelerado (por ejemplo, a 25 °C para productos acabados destinados a ser almacenados en un frigorífico, o a 40 °C para productos acabados destinados a ser almacenados a temperatura ambiente) debe probarse en un mínimo de tres puntos, que incluyen los puntos de tiempo inicial y final, para un estudio de 6 meses (por ejemplo, pruebas a los 0, 3 y 6 meses). Para las formas de dosificación convencionales en las que se sabe que las sustancias activas son estables, se requiere una presentación inicial de 6 meses de datos de estabilidad a la EMA.

Ejemplo 1. Reducción de la actividad lipasa usando estrés por agitación y estrés térmico

Con el fin de reducir la actividad de la esterasa y la lipasa, la formación de partículas de ácidos grasos libres y/o la degradación del polisorbato en los productos terapéuticos, se investigaron métodos para reducir la actividad de la esterasa y la lipasa en la sustancia farmacéutica formulada. Se descubrió de manera sorprendente que

someter la sustancia farmacéutica a condiciones de estrés, tales como el estrés por agitación o el estrés térmico, podía usarse para reducir la actividad de la esterasa y la lipasa y aumentar la estabilidad a largo plazo de las moléculas terapéuticas y los tensioactivos de la sustancia farmacéutica y los productos farmacéuticos posteriores. Debido a la estabilidad superior de un bioterapéutico en comparación con una lipasa de HCP en una sustancia farmacéutica, las lipasas en una sustancia farmacéutica se inactivan, degradan y agregan de forma desproporcionada en respuesta al estrés. Por lo tanto, las condiciones de estrés pueden seleccionarse y optimizarse para proporcionar la máxima inactivación de las lipasas preservando suficientemente la estructura y la función de un bioterapéutico. Cualquier bioterapéutico que forme una variante de tamaño o carga puede eliminarse antes de la formulación, por ejemplo usando CEX o SEC como se describe en el Ejemplo 2.

El dupilumab producido a partir de células CHO, denominado en este documento sustancia farmacéutica (DS) de mAb1, se sometió a estrés por agitación. Se usaron 30 mL de 200 mg/mL de DS de mAb1. Se llenaron dos botellas de polycarbonato de 125 mL 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 sin estrés. Se analizaron 2 mL de cada SD como SD pre-estresada (control) (0 horas de agitación) o DS post-estresada (24 o 48 horas de agitación).

La DS de control o estresada se utilizó para preparar 150 mg/mL de sustancia farmacéutica final (FDS), que comprende 150 mg/mL de mAb1, 20 mM de histidina, 12,5 mM de acetato, 5% de sacarosa, 0,2% de PS20 de alta pureza y 25 mM de HCl de arginina, a pH 5,9. La FDS se esterilizó por filtración y luego se almacenó durante 0 semanas, 4 semanas u 8 semanas a 45 °C. El almacenamiento a 45 °C se seleccionó para acelerar el estudio de estabilidad. La estabilidad física de cada una de las muestras recolectadas anteriormente se analizó usando inspección visual para detectar partículas y agregados visibles, SE-UPLC para especies de alto y bajo peso molecular, imágenes de micro-flujo para el análisis de partículas subvisibles (2-300 μ m) y CAD-UPLC para determinar los niveles de PS20.

La sustancia farmacéutica de mAb1 sometida a los pasos de estrés por agitación y filtrado mostró una menor formación de partículas y una mayor retención de polisorbato a lo largo del tiempo, como se muestra en la Tabla 3. Para contextualizar, la Farmacopea de los Estados Unidos especifica ≤ 3000 partículas de ≥ 10 μ m de diámetro por contenedor, y ≤ 300 partículas de ≥ 25 μ m de diámetro por contenedor,

medidas usando imágenes de micro-flujo. En las tablas de esta descripción, CAD se refiere a un detector de aerosol cargado, CEX se refiere a cromatografía de intercambio catiónico, FCP se refiere a una mezcla concentrada final, HMW se refiere a especies de alto peso molecular, LMW se refiere a especies de bajo peso molecular, MFI se refiere a imágenes de micro-flujo, NR indica una medición que no es necesaria, OD se refiere a densidad óptica, RH se refiere a humedad relativa, SE se refiere a exclusión por tamaño, UPLC se refiere a cromatografía líquida de ultra rendimiento, y "-" indica que no hay datos disponibles.

Tabla 3. Estabilidad térmica de las formulaciones sometidas a estrés por 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		Pa sa	Pa sa	Pas a	Pa sa	Pa sa	Pa sa	Pa sa	Pas a	Pas a
% de Cuantificación de Polisorbato por CAD		10 0	32	25	10 0	59	48	10 0	65	33
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	1,7	-	-	16,6	-	-	30,9	-	-
	% Principal	98,3	-	-	83,5	-	-	69,1	-	-
	% de LMW	0	-	-	0	-	-	0	-	-
MFI (# 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

También se investigaron otras formas de estrés. La sustancia farmacéutica de mAb1 se sometió a estrés térmico. La DS se almacenó a 45 °C durante 0, 0,5 o 1 mes para provocar la degradación, agregación y/o inactivación de las lipasas. El control y la

DS sometida a estrés se usaron para preparar 150 mg/mL de FDS, que comprende 150 mg/mL de mAb1, 20 mM de histidina, 12,5 mM de acetato, 5% de sacarosa, 0,2% de polisorbato 20 de alta pureza y 25 mM de HCl de arginina, a pH 5,9. La FDS se esterilizó por filtración y luego se almacenó en las condiciones establecidas en la Tabla 4.

Tabla 4. Condiciones de incubación/almacenamiento de SDF a partir de SD sometidas a estrés térmico

Condición de Estrés	Duración de la 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

La estabilidad física de las muestras sometidas a estrés térmico y de las muestras de control no sometidas a estrés descritas anteriormente se analizó usando inspección visual para detectar partículas y agregados visibles, SE-UPLC para detectar especies de alto y bajo peso molecular, imágenes de micro-flujo para el 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 5-10. Someter la DS a estrés térmico antes de la formulación provocó una disminución significativa de la actividad de la lipasa, mejorando la recuperación del polisorbato y disminuyendo la formación de partículas de ácidos grasos libres. Las muestras no sometidas a estrés mostraron un aumento significativo de partículas subvisibles con el tiempo que no se observó en las muestras sometidas a estrés. Al someter la DS a estrés térmico se produjo un aumento significativo del nivel de HMW, pero tal nivel se mantuvo estable durante la incubación adicional.

Tabla 5. Estabilidad de una formulación a partir 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	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	-
% de 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
	% 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
MFI (# partículas/mL)	2 - 10 μ m	264	12265	81,203	141583	243895	273027	371554
	$\geq$ 10 μ m	20	2273	8446	16902	26739	3042	38956
	$\geq$ 25 μ m	3	9	47	530	1780	113	3602

Tabla 6. 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		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	-
% de Cuantificación de Polisorbato por CAD		100	-	89	-	-	-	-
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	10,9	10,7	11	12	12	11,6	11,7
	% 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 (# partículas/mL)	2 - 10 μ m	349	6691	5828	1794	3052	21842	258288
	$\geq$ 10 μ m	16	216	61	34	222	3641	3586

	≥ 25 µm	2	21	8	6	36	248	119
--	------------	---	----	---	---	----	-----	-----

Tabla 7. 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		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	-
% de 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
	% 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 (# partículas/mL)	2 - 10 µm	160	3898	2081	35220	4806	824	5189
	≥ 10 µm	7	52	14	1017	119	39	109
	≥ 25 µm	2	6	1	30	5	2	8

Tabla 8. 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	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	-	Pasa	-
Nivel 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
	% 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 (# partículas/mL)	2 - 10 μm	264	19609	146335	25146	2532	8226	263410
	≥ 10 μm	20	492	23326	750	47	206	41033
	≥ 25 μm	3	19	3825	60	5	20	9790

Tabla 9. 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		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	-	Pasa	-
Nivel 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
	% 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 (# partículas/	2 - 10 μm	349	6232	8660	4838	9249	18683	7797

mL)	≥ 10 μm	16	52	169	60	172	426	272
	≥ 25 μm	2	4	3	8	0	29	6

Tabla 10. 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		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	-	Pasa	-
Nivel 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
	% 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 (# 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

Ejemplo 2. Eliminación de especies de alto peso molecular de la sustancia farmacéutica pretratada por estrés

Como se describe en el Ejemplo 1, someter una sustancia farmacéutica a estrés por agitación o estrés térmico puede resultar en un aumento de las especies de HMW. Comparar, por ejemplo, el 2,2% de especies de HMW en el tiempo cero para la DS no

tratada en las Tablas 5 y 8, comparado con el 10,9% para la DS tratada a 0,5 meses de estrés térmico en las Tablas 6 y 9, y el 17,3% para la DS tratada a 1 mes de estrés térmico en las Tablas 7 y 10. Las especies de HMW pueden estar formadas por HCP, proteína de fármaco o una combinación de ambas. Las especies de HMW pueden eliminarse usando otros pasos de procesamiento, tales como la filtración o la cromatografía.

La SD de mAb1 se sometió a 1 o 2 semanas de estrés térmico a 45 °C o 50 °C. La DS sometida a estrés térmico 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 redujeron eficazmente de la SD sometida a estrés, tal como se muestra en la Tabla 11. Las muestras de la sustancia farmacéutica reducida en HMW tienen un porcentaje comparable de especies de HMW (2,3% o 2,5%) en comparación con una sustancia farmacéutica que no fue sometida a estrés o purificación (1,7%). El porcentaje de especies de HMW se redujo a un nivel aceptable para una composición farmacéutica, en particular por debajo del 5%.

Tabla 11. Eliminación de las especies de HMW de la sustancia farmacéutica sometida a estrés

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 CEX	% de HMW	1,7	10,2	26,2	17,0	33,6
	% Principal	98,3	89,8	73,8	83,0	66,4
Pureza por SE-UPLC después de la purificación CEX	% de HMW	1,3	2,3	2,3	2,5	2,5
	% Principal	98,7	97,7	97,7	97,5	97,5

La DS reducida en HMW se formuló en FDS que comprende 150 mg/mL de mAb1, 20 mM de histidina, 12,5 mM de acetato, 5% de sacarosa, 0,2% de PS80 y 25 mM de HCl de arginina, a pH 5,9. Se comparó la estabilidad de la FDS de la DS reducida en HMW sometida a estrés térmico con la de la FDS de la DS reducida en HMW no sometida a estrés. En particular, la SD no sometida a estrés (Tabla 12) se comparó con la SD sometida a estrés a 45 °C durante 1 semana (Tabla 13), 50 °C durante 1 semana (Tabla 14), 45 °C durante 2 semanas (Tabla 15) y 50 °C durante 2 semanas (Tabla 16). Cada FDS se almacenó 1, 3 o 6 meses a 25 °C, o 1 semana, 2 semanas, 1 mes o 3

meses a 45 °C antes del análisis. Se caracterizaron el aspecto visual, la turbidez, el pH, la recuperación de PS80, la pureza medida por SE-UPLC, las variantes de carga, la recuperación de mAb1, el número de partículas/mL $\geq 10 \mu\text{m}$ de tamaño y el número de partículas/mL $\geq 25 \mu\text{m}$ de tamaño.

Como se muestra en la Tabla 12, el FDS de la DS de control muestra una pérdida sustancial de PS80 después de 3 meses de almacenamiento, hasta un 50% después del almacenamiento a 25 °C y un 47% después del almacenamiento a 45 °C, lo que ilustra la importancia de la actividad de la lipasa en la muestra de FDS. Una pérdida del 50% de PS80 podría ser considerada típicamente inaceptable para una composición farmacéutica. Por consiguiente, el número de partículas/mL contadas mediante imágenes de microflujo también aumentó mucho con el tiempo, hasta llegar a 815 partículas/mL $\geq 10 \mu\text{m}$ después de 3 meses de almacenamiento a 25 °C. La degradación de PS80 continuó después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C, y el porcentaje de PS80 recuperado disminuyó al 43%. El número de partículas/mL medido siguió siendo elevado. Cabe señalar que, dado que las partículas pueden formarse y deshacerse dinámicamente, no es sorprendente que el conteo de partículas no aumente linealmente, sino que se mantenga elevado de 3 a 6 meses.

Como se muestra en la Tabla 13, la FDS de la DS pretratada a 45 °C durante 1 semana muestra un perfil sustancialmente diferente. Después de 3 meses de almacenamiento, los niveles de PS80 se mantuvieron en el 90% a 25 °C y en el 85% a 45 °C, y se mantuvieron en el 83% después de 6 meses a 25 °C. Una pérdida por debajo del 20% de PS80 puede considerarse aceptable para una composición farmacéutica. El número de partículas/mL se mantuvo bajo después de 3 meses y 6 meses de almacenamiento, aumentando sólo a 21 partículas/mL $\geq 10 \mu\text{m}$ y 2 partículas/mL $\geq 25 \mu\text{m}$ después de 3 meses de almacenamiento a 45 °C, lo que está dentro del rango de ruido de fondo para este ensayo (por debajo de aproximadamente 100). Por lo tanto, incluso la condición de pretratamiento más suave mostró un marcado mejoramiento en comparación con el control no sometido a estrés en términos de retención de polisorbato, reducción de la actividad de la lipasa y reducción de la formación de partículas.

Como se muestra en la Tabla 14, la FDS de DS pretratada a 50 °C durante 1 semana muestra una estabilidad PS80 aún mayor. Aproximadamente 96% y 94% de PS80 se recuperó después de 3 meses de almacenamiento a 25 °C y 45 °C, respectivamente, y aproximadamente 98% después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C. Teniendo en cuenta un margen de error de aproximadamente el 10% usando

este ensayo, esto es estadísticamente indistinguible de la recuperación total en todos los puntos temporales y condiciones de almacenamiento. El número de partículas/mL se mantuvo bajo, dentro del rango del ruido de fondo. En general, la estabilidad de la FDS de DS pretratada a 50 °C durante 1 semana es similar a la que podría esperarse en una FDS sin contaminación alguna de lipasa.

Como se muestra en la Tabla 15, la FDS de DS pretratada a 45 °C durante 2 semanas muestra una estabilidad del polisorbato mejorada similar a la observada en la condición de pretratamiento a 45 °C durante 1 semana, con una recuperación de PS80 por arriba de 90% incluso después de 6 meses. No se recolectaron datos de partículas de las muestras pretratadas con estrés térmico durante 2 semanas debido a la escasa cantidad de muestra restante.

Como se muestra en la Tabla 16, la FDS de la DS pretratada a 50 °C durante 2 semanas muestra una actividad de lipasa efectivamente nula y una estabilidad completa del polisorbato, con un 100% de PS80 medido como recuperado después de 3 meses de almacenamiento a 25 °C, y un 97% (dentro del error de medición del 100%) después de 6 meses.

La estabilidad del mAb1 (en términos de variantes de tamaño y variantes de carga) y la recuperación no se vieron afectadas significativamente por el tratamiento con DS durante el periodo de tiempo de estos experimentos, como se esperaba en un periodo de tiempo corto. Sin embargo, cabe esperar que la drástica pérdida de polisorbato observada en la condición de control (Tabla 12) se traduce en una posterior pérdida de estabilidad del mAb1 en el transcurso del almacenamiento a largo plazo.

Cabe señalar que el paso CEX que sigue al pretratamiento de estrés también puede reducir las lipasas HCP restantes de cada una de las muestras, además de las especies de HMW no funcionales. Esta característica puede estar ocultando una diferencia aún mayor en la actividad lipasa entre la SD sometida a estrés y no sometida a estrés atribuible únicamente al estrés térmico.

Tabla 12. Estabilidad térmica de una formulación a partir de DS de control sin HMW

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

Apariencia visual		Pas a	Pas a	Pas a	Pas a	Pas a	Pas a	Pas a	Pas a
Aumento de la turbidez (DO 405 nm)		0,00	0,01	0,03	0,08	0,03	0,07	0,09	0,29
pH		6,2	6,3	6,2	6,2	6,2	6,1	6,3	6,2
Nivel PS-80 (CAD-UPLC)		100	68	50	43	68	59	59	47
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	2,2	2,7	3,0	3,8	4,0	4,9	7,3	24,5
	% Principal	97,7	97,1	95,6	95,6	95,7	94,5	92,2	64,8
	% de LMW	0,2	0,2	1,4	0,6	0,3	0,6	0,4	10,7
Análisis de variantes de carga por CEX-UPLC	% Acídico	26,9	29,5	32,8	37,6	34,5	46,9	50,2	59,5
	% Principal	72,8	68,8	64,9	59,4	61,6	49,3	48,4	39,6
	% Básico	0,3	1,7	2,3	3,0	4,0	3,9	1,4	0,9
% de mAb1 recuperado por RP-UPLC		100	103	99	101	101	98	99	97
IMF (# partículas/mL)	≥ 10 µm	38	13	815	108	31	13	10	696
	≥ 25 µm	2	2	2	8	4	7	4	42

Tabla 13. Estabilidad térmica de una formulación de DS reducida en HMW pretratada a 45 °C durante 1 semana

Ensayo		t=0	Duración de Almacenamiento a 25°C (meses)			Duración de Almacenamiento a 45°C (meses)			
			1	3	6	0,2 5	0,5	1	3
Apariencia visual		Pas a	Pas a	Pas a	Pas a	Pas a	Pas a	Pas a	Pas a
Aumento de la turbidez (DO 405 nm)		0,0 0	0,0 0	0,0 2	0,0 6	0,0 1	0,0 5	0,0 7	0,2 7
pH		6,2	6,3	6,2	6,2	6,2	6,2	6,3	6,2
Nivel PS-80 (CAD-UPLC)		100	98	90	83	97	86	94	85
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	2,7	3,0	3,4	3,9	3,8	4,7	6,5	21, 5
	% Principal	97, 0	96, 6	95, 4	95, 2	95, 9	94, 4	92, 9	56, 6

	% de LMW	0,3	0,4	1,2	0,9	0,3	1,0	0,6	21,9
Análisis de variantes de carga por CEX-UPLC	% Acídico	18,0	34,1	38,0	41,7	38,8	48,0	53,9	65,6
	% Principal	76,3	60,9	60,0	56,8	56,2	47,9	44,7	33,8
	% Básico	5,7	5,0	2,0	1,5	5,0	4,2	1,4	0,7
% de mAb1 recuperado por RP-UPLC		100	102	99	102	103	100	99	98
IMF (# partículas/mL)	≥ 10 µm	2	10	2	19	23	8	10	21
	≥ 25 µm	0	2	2	0	2	0	2	2

Tabla 14. Estabilidad térmica de una formulación de DS reducida en HMW pretratada a 50 °C durante 1 semana

Ensayo		t=0	Duración de Almacenamiento a 25°C (meses)			Duración de Almacenamiento a 45°C (meses)			
			1	3	6	0,25	0,5	1	3
Apariencia visual		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Aumento de la turbidez (DO 405 nm)		0,00	0,00	0,01	0,04	0,00	0,03	0,03	0,14
pH		6,1	6,1	6,0	6,1	6,0	6,0	6,1	6,0
Nivel PS-80 (CAD-UPLC)		100	101	96	98	101	93	101	94
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	3,0	3,3	3,5	4,1	4,0	4,3	6,2	18,9
	% Principal	96,7	96,2	95,3	95,0	95,7	94,6	93,2	70,4
	% de LMW	0,3	0,5	1,2	0,9	0,3	1,1	0,6	10,7
Análisis de variantes de	% Acídico	30,5	36,1	38,7	42,2	41,0	53,9	54,8	60,1

carga por CEX-UPLC	% Principal	62,8	61,1	59,3	56,3	53,7	43,7	43,5	38,9
	% Básico	6,7	2,8	2,0	1,4	5,4	2,3	1,8	1,1
% de mAb1 recuperado por RP-UPLC		100	102	99	101	103	95	99	97
IMF (# partículas/mL)	≥ 10 µm	27	21	35	77	-	19	13	2
	≥ 25 µm	8	4	6	27	-	4	2	0

Tabla 15. Estabilidad térmica de una formulación de DS reducida en HMW pretratada a 45 °C durante 2 semanas

Ensayo		t=0	Duración de Almacenamiento a 25°C (meses)			Duración de Almacenamiento a 45°C (meses)			
			1	3	6	0,25	0,5	1	3
Apariencia visual		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Aumento de la turbidez (DO 405 nm)		0,00	0,02	0,03	0,03	0,03	0,01	0,01	0,24
pH		6,1	6,2	6,1	6,2	6,1	6,1	6,1	6,2
Nivel PS-80 (CAD-UPLC)		100	92	96	92	91	95	88	91
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	2,9	3,1	3,4	3,9	5,5	4,1	9,5	19,2
	% Principal	96,5	96,0	95,3	95,1	94,1	95,0	86,2	71,7
	% de LMW	0,6	0,9	1,4	1,0	0,4	0,9	4,4	9,2
Análisis de variantes de carga por CEX-UPLC	% Acídico	36,4	38,9	41,6	45,7	59,1	46,0	58,8	58,8
	% Principal	56,4	58,7	56,4	51,7	39,3	52,3	39,7	39,7
	% Básico	7,3	2,4	2,1	2,6	1,6	1,7	1,5	1,5
% de mAb1 recuperado por RP-UPLC		100	98	99	102	107	103	101	99

Tabla 16. Estabilidad térmica de una formulación de DS reducida en HMW

pretratada a 50 °C durante 2 semanas

Ensayo		t=0	Duración de Almacenamiento a 25°C (meses)			Duración de Almacenamiento a 45°C (meses)			
			1	3	6	0,2 5	0,5	1	3
Apariencia visual		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Aumento de la turbidez (DO 405 nm)		0,00	0,09	0,03	0,03	0,03	0,01	0,07	0,22
pH		6,0	6,2	6,1	6,2	6,1	6,1	6,1	6,1
Nivel PS-80 (CAD-UPLC)		100	94	100	97	91	99	94	95
Pureza por SE-UPLC	% de HMW	2,8	3,0	3,1	3,7	5,1	3,9	8,2	17,8
	% Principal	96,5	96,1	95,3	95,0	94,4	95,1	85,9	69,6
	% de LMW	0,7	1,0	1,7	1,3	0,5	1,0	5,9	12,6
Análisis de variantes de carga por CEX-UPLC	% Acídico	42,4	42,6	47,2	50,7	43,8	51,0	60,9	65,2
	% Principal	50,6	54,7	51,1	46,6	53,9	46,8	35,3	33,8
	% Básico	7,0	2,7	1,7	2,7	2,3	2,2	3,8	1,0
% de mAb1 recuperado por RP-UPLC		100	97	99	101	119	104	101	100

Estos resultados demuestran que los métodos descritos de someter la sustancia farmacéutica a estrés por agitación o estrés térmico, opcionalmente seguido de reducción de HMW, producen una composición farmacéutica mejorada con actividad reducida de lipasa, degradación reducida de polisorbato y formación reducida de partículas de ácidos grasos libres.

La presente invención no se limita a los aspectos específicos descritos en este documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las en este

documento descritas, resultarán evidentes para aquellos expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Tales modificaciones se incluyen dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.