

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 974 961**

(51) Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/58 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.08.2017 E 20191942 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.02.2024 EP 3761035**

(54) Título: **Ensayo para determinar la capacidad de autoasociación de una proteína usando espectroscopía de autointeracción de nanopartículas dependiente de la concentración**

(30) Prioridad:

18.08.2016 US 201662376788 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2024

(73) Titular/es:

REGENERON PHARMACEUTICALS, INC.
(100.0%)
777 Old Saw Mill River Road
Tarrytown, NY 10591, US

(72) Inventor/es:

MARLOW, MICHAEL;
SENNETT, MICHAEL y
SCHNEIDER, MICHAEL

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 974 961 T3

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

DESCRIPCIÓN

Ensayo para determinar la capacidad de autoasociación de una proteína usando espectroscopía de autointeracción de nanopartículas dependiente de la concentración

5

Campo

La invención se refiere en general a la selección de proteínas terapéuticas para su desarrollo y comercialización; y más específicamente a la selección de proteínas que tienen una mayor probabilidad de lograr fácilmente una alta concentración de proteínas con una probabilidad concomitante menor de formar agregados. La invención se refiere específicamente a evaluar interacciones coloidales de proteínas y seleccionar proteínas para formular a alta concentración.

Antecedentes

15

Las grandes moléculas biológicas - "agentes bioterapéuticos" - son una clase importante de fármacos. Los anticuerpos monoclonales, por ejemplo, ofrecen una especificidad terapéutica exquisita, semivida biológica larga y perfiles de seguridad altos.

20 Los agentes bioterapéuticos, dado su tamaño y complejidad, son difíciles de fabricar y formular. La mayoría de los agentes bioterapéuticos se formulan como formulaciones sólidas liofilizadas o líquidas, y la estabilidad de estas moléculas es un problema importante. La estabilidad no solo afecta la vida útil del producto final, sino también el proceso de fabricación.

25 Una molécula grande por definición tiene una gran masa molecular. Por lo tanto, unos pocos moles de fármaco abarcan una masa relativamente grande. Por ejemplo, un anticuerpo tiene una masa molecular de aproximadamente 150.000 gramos por mol, mientras que un fármaco de moléculas pequeñas como la atorvastatina tiene una masa molecular de aproximadamente 560 gramos por mol. Por lo tanto, para alcanzar una dosis eficaz, se necesita una gran masa de fármaco proteico. A medida que se formulan más fármacos para inyección subcutánea, esa gran masa tiene que caber en un pequeño volumen. Para adaptarse a dosis terapéuticamente eficaces, las formulaciones subcutáneas de fármacos bioterapéuticos deben alcanzar concentraciones altas (aproximadamente 50 mg/ml o más) o muy altas (aproximadamente 100 - 250 mg/ml), todo mientras se mantiene la viscosidad a un nivel manejable.

30 35 A medida que las moléculas grandes se apiñan en un espacio pequeño y la distancia entre las moléculas de proteínas disminuye, la frecuencia de interacciones coloidales, es decir, el efecto a través del espacio de una molécula sobre otra, aumenta. Las autointeracciones (interacciones coloidales) proteicas son generalmente energéticamente débiles, normalmente reversibles y no específicas. Las interacciones dependen de las proteínas y se ven afectadas por el pH, sal y otros aditivos. En algunos casos, las interacciones pueden ser netamente atractivas, repulsivas o neutras. La naturaleza y magnitud de la interacción pueden depender de la concentración de la proteína.

40 45 Las interacciones coloidales abarcan un amplio espectro de interacciones (energía potencial) que se cuantifican con coeficientes viriales. B_{22} representa interacciones por pares, B_{222} representa interacciones de 3 cuerpos, B_{2222} representa interacciones de 4 cuerpos, y así sucesivamente. Un valor de coeficiente virial positivo representa interacciones repulsivas, un coeficiente virial negativo representa interacciones atractivas y un coeficiente virial cero representa un estado ideal.

50 Las interacciones coloidales generalmente están presentes en soluciones de proteínas que exceden ~ 2 mg/ml y se vuelven significativas en soluciones que exceden ~ 40 mg/ml. En las concentraciones más bajas, tienden a dominar las fuerzas estéricas y electrostáticas. La situación se vuelve más compleja con el aumento de la concentración de proteínas. A medida que aumenta la concentración de proteínas durante la producción y formulación, las interacciones coloidales se vuelven problemáticas.

55 Las interacciones coloidales afectan una variedad de procesos aguas abajo durante la producción de proteínas. Esas fuerzas pueden ser beneficiosas o perjudiciales dependiendo de la naturaleza y la magnitud de las interacciones. Las interacciones coloidales afectan al rendimiento cromatográfico, ultrafiltración y diafiltración (UF/DF), diálisis, viscosidad y manipulación de la solución y a la estabilidad de la proteína en solución. Las interacciones coloidales también afectan a la estabilidad a largo plazo durante el almacenamiento, donde se pueden formar oligómeros y multímeros, así como agregados de proteínas. Por lo tanto, la evaluación del coeficiente virial de una proteína proporciona información importante antes de dedicar recursos al desarrollo de un agente terapéutico proteico en particular.

60 65 El análisis de coeficientes viriales es un área de investigación establecida y muy activa. Los métodos actuales para evaluar el coeficiente virial (B_{22} , o el estrechamente relacionado A_2) para proteínas particulares incluyen osmometría de membrana, ultracentrifugación analítica de equilibrio de sedimentación, cromatografía de autointeracción, dispersión de luz estática (SLS, por sus siglas en inglés), parámetros de interacción de difusión o sedimentación y espectroscopía de autointeracción de nanopartículas (SINS).

Por ejemplo, Cohen y Benedek (documento US4080264A, publicado el 3 de marzo de 1978) describen un método espectroscópico de dispersión de luz cuasi elástica para medir la agregación de antígenos o anticuerpos. Publicover y Vincze (documento US7514938B2, publicado el 7 de abril de 2009) describen el uso de la espectroscopía de relajación dieléctrica (DRS, por sus siglas en inglés) para probar la interacción y agregación de partículas de escala de micras y submicras recubiertas con proteína, que incluyen anticuerpos. Holman *et al.*, (documento US20070291265A1, publicado el 20 de diciembre de 2007) describen un sistema de fibra óptica bifurcado para medir la dispersión de la luz y las señales de concentración para medir la agregación de macromoléculas. Obrezanova *et al.* (mAbs, 7(2): 352-363, 2015) describen el uso de cromatografía de líquidos de alta presión de exclusión por tamaño (SE-HPLC) y un ensayo de detección de oligómeros, que es un ensayo de captura de anticuerpos en placas de microtitulación de densidad óptica, para medir sistemáticamente la propensión a la agregación de más de 500 anticuerpos. Geoghegan *et al.* (mAbs, 8(5): 941-950, 2016) describen el uso del tiempo de retención de la cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés), SINS de captura por afinidad y dispersión dinámica de la luz para medir la autointeracción, viscosidad y estabilidad de la autointeracción de anticuerpos monoclonales. Geng proporciona una descripción general de los métodos actuales utilizados para evaluar las interacciones coloidales de proteínas, *et al.* (J Pharm Sci, 103(11): 3356-3363, 2014).

La espectroscopía de autointeracción de nanopartículas (SINS) para la evaluación de la autoasociación de anticuerpos monoclonales está descrita por Sule *et al.*, (Biophys. J., 101: 1749-1757, 2011). En resumen, los anticuerpos se adsorben en nanopartículas de oro, que después se combinan con un tampón en placas de microtitulación de 96 pocillos. A medida que las nanopartículas se agregan debido a la autoasociación de los anticuerpos adherentes, el espectro de absorbancia de las nanopartículas cambia. Este cambio en la resonancia de plasmón superficial se correlaciona con la asociación de las partículas. El ensayo proporciona una lectura binaria de "autoasociación" o "no autoasociación" en función de si el máximo de absorbancia se desplaza o cambia en amplitud. Sule *et al.* (Mol. Pharmaceutics, 10: 1322-1331, 2013) describen un método SINS mejorado llamado espectroscopía de autointeracción de nanopartículas de captura por afinidad (AC-SINS). En este caso, los anticuerpos policlonales humanos se fijan primero a las nanopartículas, después, las partículas recubiertas se ponen en contacto con muestras de anticuerpos de baja concentración/baja pureza, que después se capturan por el recubrimiento antihumano. AC-SINS permite la exploración rápida de sobrenadantes celulares sin la necesidad de una purificación de anticuerpos extensa. AC-SINS, como SINS, proporciona una evaluación binaria de autoasociación positiva o no autoasociación de los anticuerpos del sujeto.

Las proteínas son moléculas complejas y, con frecuencia, muestran un comportamiento impredecible en diversas condiciones. El estado de la técnica proporciona algunos medios para observar la autoasociación de proteínas, pero no proporciona un medio rápido y preciso para determinar la propensión de una proteína a experimentar autoasociación en un gran número de condiciones diferentes. Algunas proteínas son estables en determinadas condiciones, pero inestables en otras condiciones. Sigue existiendo la necesidad en la técnica de un ensayo para determinar el intervalo dinámico de atracción y repulsión de la proteína en condiciones cambiantes.

Se mencionan también los siguientes documentos:

- Geng *et al.* (2016) Bioconjugate Chemistry 27(10): 2287-2300, que se refiere a la preparación fácil de conjugados de oro de anticuerpos estables y la aplicación a la espectroscopía de autointeracción de nanopartículas de captura por afinidad.
- Geng *et al.* (2016) Molecular Pharma 13:5): 1636-1645, que se refiere a la medición de la autoasociación de anticuerpos monoclonales que se correlaciona con propiedades biofísicas complejas.
- Wu *et al.* (2015) Protein Engineering, Design and Selection 28(10): 403-414, que se ocupa del descubrimiento de anticuerpos altamente solubles antes de la purificación utilizando espectroscopía de autointeracción de nanopartículas de captura por afinidad.
- El documento WO 2016/115475, que se ocupa de formulaciones de anticuerpos anti-CD40.
- Tessier *et al.* (2008) Journal of American Chemical Society, 130(10): 3106-3112, que trata de la espectroscopía de autointeracción de nanopartículas como ensayo de interacción de proteínas basado en nanopartículas.
- Sule *et al.* (2012) Molecular Pharmaceutics, 9(4): 744-751, que se refiere al pH de la solución que reduce al mínimo la autoasociación de tres anticuerpos monoclonales fuertemente dependientes de la fuerza iónica.
- Zheng *et al.* (2015) Applied Materials & Interfaces, 7: 6819-6827, que trata de un análisis de sangre basado en nanopartículas de oro para la detección precoz del cáncer y la evaluación del riesgo.
- Jans *et al.* (2009) Analytical Chemistry, 81(22): 9425-9432, que trata de la dispersión dinámica de la luz como potente herramienta para la bioconjugación de nanopartículas de oro y los estudios de unión biomolecular.
- Wang *et al.* (2011) Biomaterials 32:7988-7998, que trata del uso de un adyuvante basado en nanopartículas de

oro para mejorar la eficacia terapéutica de la inmunización con proteína hNgR-Fc en ratas que presentan lesiones de la médula espinal.

- 5 • El documento WO 2009/039502, que trata de métodos y composiciones nanoterapéuticas a base de metales coloidales.

Sumario

10 Los inventores desarrollaron un método para determinar la capacidad de una proteína para autoensamblarse (es decir,, repulsión o atracción inherente de la proteína) en un intervalo dinámico de condiciones. En consecuencia, el método puede entenderse como un método para determinar la estabilidad de proteínas autoasociadas o como un método para determinar la estabilidad de proteínas agregadas. En particular, la presente invención proporciona un método para determinar la capacidad de una proteína para autoasociarse, comprendiendo el método:

- 15 a. combinar una proteína, una nanopartícula de oro y una sal tamponada para formar una muestra, en donde la sal tamponada es un tampón y una sal o una sal que es también un tampón;
 b. excitar la muestra con luz;
 c. medir la luz transmitida a través de la muestra a múltiples longitudes de onda que varían desde aproximadamente 450 nm hasta aproximadamente 750 nm;
- 20 d. calcular la relación de intensidad de la absorbancia de la muestra, en donde la relación de intensidad de la absorbancia es la intensidad de la absorbancia a la longitud de onda de absorbancia máxima ($A_{\text{máxima}}$) de la muestra dividida por la intensidad de la absorbancia a 450 nm (A_{450} o A_{inicial}),

25 en donde la proteína es estable a alta concentración cuando la relación de intensidad de la absorbancia es superior a 1,7, y
 en donde el método comprende, además, la repetición de las etapas (a) - (d) al menos una vez más usando una fuerza iónica diferente.

30 Como se explica con más detalle en el presente documento, la proteína puede ser un solo tipo de proteína o una combinación de cualquier proteína de diferentes orígenes. El método, llamado espectroscopía de autointeracción de nanopartículas dependiente de la concentración (CD-SINS, por sus siglas en inglés) mide la propensión de una proteína a autoensamblarse en concentraciones cambiantes y en diversas condiciones de fuerza iónica y pH. El método permite la predicción de la proteína en condiciones de concentración alta o muy alta e informa de la selección de proteínas para el desarrollo comercial. El método también proporciona información sobre cómo formular una 35 composición farmacéutica que comprende altas concentraciones de uno o más fármacos biofarmacéuticos mientras se mantiene una vida útil prolongada sin asociación del fármaco o de los fármacos biofarmacéuticos. El método también permite obtener información sobre cómo formular una composición que cumpla las especificaciones necesarias sobre propiedades físicas tales como, p. ej., una reología/viscosidad adecuadas para permitir una ruta de administración deseada específica. La invención también permite una exploración más rápida de agentes 40 biofarmacéuticos utilizando menos cantidad de material para llegar a una formulación adecuada o la selección de candidatos adecuados para el desarrollo de fármacos adicionales.

45 También se divulga una mezcla bioanalítica que comprende una pluralidad de nanopartículas, una proteína y una sal tamponada. La proteína existe en al menos dos fases en la mezcla: una fase adherente y una fase soluble. La fase adherente incluye proteínas que están adheridas a (es decir, recubrimiento) las nanopartículas. La fase soluble incluye proteínas que están disueltas en la solución salina tamponada. En algunos casos, la proteína existe en una tercera fase, donde las proteínas están autoasociadas como dímeros, trímeros, tetrameros, o multímeros de orden superior, incluyendo nanopartículas recubiertas agregadas.

50 En un ejemplo, la nanopartícula es una nanopartícula de oro. En algunos casos, la nanopartícula tiene un diámetro de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 100 nm. En un ejemplo particular, la nanopartícula es una nanopartícula de oro que tiene un diámetro de aproximadamente 20 nm.

55 En un ejemplo, cada nanopartícula está recubierta de proteína. En algunos casos, la mayoría o todas las superficies de las nanopartículas están saturadas con proteína, lo que significa que la superficie está completamente ocupada por proteínas y no queda ninguna superficie descubierta para que se adhiera una proteína. En algunos casos, la mayoría o todas las superficies de las nanopartículas están saturadas con proteína antes de añadir otros componentes a la mezcla, tal como una sal adecuada o una sal tamponada.

60 En un ejemplo, la mezcla contiene de aproximadamente 6×10^{11} a aproximadamente 7×10^{11} nanopartículas por mililitro de mezcla. En un ejemplo particular, la mezcla contiene aproximadamente $6,3 \times 10^{11}$ nanopartículas por ml. Sin querer estar ligado a la teoría y asumiendo que una proteína promedio puede modelarse como una esfera de 10 nm, el límite superior teórico para el número de esferas de 10 nm necesarias para recubrir una esfera de 20 nm es de aproximadamente 30. Se puede estimar que aproximadamente de 15 a 20 moléculas de anticuerpo se unen a una sola nanopartícula de 20 nm. Por lo tanto, se estima que ~ 2,5 µg/ml de un anticuerpo es la concentración mínima necesaria para cubrir completamente $6,3 \times 10^{11}$ nanopartículas (20 nm)/ml. En algunos casos, la mezcla comprende de

aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 512 µg/ml de proteína.

En algunos casos, la proteína incluida en la mezcla es un anticuerpo terapéutico. En algunos casos, la proteína comprende un dominio Fc de inmunoglobulina. En algunos casos, la proteína es una proteína de unión a antígeno.

5 Las proteínas de unión a antígeno incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, derivados de anticuerpos, proteínas de fusión con Fc y proteínas de fusión receptor-Fc. En un ejemplo, la proteína es un anticuerpo monoclonal. En un ejemplo más específico, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano o humanizado. En algunos casos, el anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo monoespecífico o un anticuerpo biespecífico.

10 En algunos casos, la sal tamponada comprende un tampón y una sal. En algunas realizaciones, el tampón proporciona fuerza iónica. En algunos casos, la sal tampona la mezcla. En principio, la sal puede ser cualquier sal adecuada conocida en la técnica y puede ser, p. ej., cualquier cloruro, bromuro, fosfato, sulfato o sal de amonio, o cualquier combinación de las mismas. Ejemplos no limitantes son, p. ej., cloruro de sodio, cloruro de potasio, fosfato de potasio, cloruro amónico etc.

15 En un ejemplo, la sal comprende cloruro de sodio. La sal (p. ej., cloruro de sodio) puede estar presente en una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 300 mM. En realizaciones particulares, la sal está presente en la mezcla a una concentración de aproximadamente 2 mM, aproximadamente 20 mM o aproximadamente 200 mM.

20 En un ejemplo, el tampón comprende ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES). En un ejemplo específico, el MES está presente en la mezcla a una concentración de aproximadamente 10 mM y un pH de aproximadamente 6.

En el método para determinar la capacidad de una proteína para autoasociarse, la luz transmitida a través de la muestra se mide en múltiples longitudes de onda que varían desde aproximadamente 450 nm hasta aproximadamente 750 nm; Las múltiples relaciones de intensidad de la absorbancia obtenidas a partir de una proteína determinada

25 pueden representarse gráficamente para su análisis. Esos parámetros incluyen el tipo de sal (es decir, neutra, caotrópica, cosmotrópica), concentración de sal, pH, concentración de proteínas, la inclusión o exclusión de ingredientes adicionales. Cuando la relación de intensidad de la absorbancia excede un valor umbral, se considera que la proteína es favorable para la dispensación a alta concentración. Se espera que una proteína considerada favorable para la dispensación a alta concentración permanezca estable a alta concentración y sea menos propensa

30 a la agregación. La proteína es estable a alta concentración cuando la relación de intensidad de la absorbancia es superior a 1,7.

35 En algunas realizaciones, la proteína es un anticuerpo terapéutico. En algunas realizaciones, la proteína comprende un dominio Fc de inmunoglobulina. En algunas realizaciones, la proteína es una proteína de unión a antígeno. Las proteínas de unión a antígeno incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpo, derivados de anticuerpos, proteínas de fusión con Fc y proteínas de fusión receptor-Fc. En una realización, la proteína es un anticuerpo monoclonal. En una realización más específica, el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo humano o humanizado. En algunas realizaciones, el anticuerpo monoclonal puede ser un anticuerpo monoespecífico o un anticuerpo biespecífico.

40 En algunas realizaciones, la proteína se añade a la muestra a una concentración final de aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 512 µg/ml.

45 En algunas realizaciones, la nanopartícula es una nanopartícula de oro. En algunas realizaciones, la nanopartícula de oro tiene un diámetro de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 100 nm. En una realización, el diámetro de la nanopartícula de oro es de aproximadamente 20 nm.

50 En algunas realizaciones, las nanopartículas se añaden a la muestra hasta una concentración final de aproximadamente 5×10^{11} a aproximadamente 8×10^{11} nanopartículas por ml, de aproximadamente 6×10^{11} a aproximadamente $6,5 \times 10^{11}$ nanopartículas por ml, o aproximadamente $6,3 \times 10^{11}$ nanopartículas por ml.

55 La sal tamponada puede contener un tampón, un tampón que confiere fuerza iónica, una sal, una sal que tiene capacidad tamponante o una sal y un tampón. En una realización, la sal comprende cloruro de sodio. La sal (p. ej., cloruro de sodio) puede estar presente en una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 300 mM. En algunas realizaciones específicas, la sal está presente en la mezcla a una concentración de aproximadamente 2 mM, aproximadamente 5 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 75 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 110 mM, aproximadamente 120 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 175 mM, aproximadamente 200 mM o aproximadamente 300 mM.

60 En una realización, el tampón comprende ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico (MES). En una realización específica, el MES está presente en la mezcla a una concentración de aproximadamente 10 mM y un pH de aproximadamente 6.

65 En algunas realizaciones, la luz de excitación es luz blanca que comprende longitudes de onda que abarcan el espectro visible. La luz transmitida se mide a múltiples longitudes de onda que varían desde aproximadamente 450 nm hasta aproximadamente 750 nm.

La relación de intensidad de la absorbancia es una medida de la intensidad relativa de la absorbancia de luz en relación

con un patrón o control. El control puede ser externo o interno. El método proporcionado por la invención comprende calcular la relación de intensidad de la absorbancia de la muestra, en donde la relación de intensidad de la absorbancia es la intensidad de la absorbancia a la longitud de onda de absorbancia máxima ($A_{máxima}$) de la muestra dividida por la intensidad de la absorbancia a 450 nm (A_{450} o $A_{inicial}$). Por lo tanto, la relación de intensidad de la absorbancia se

5 calcula dividiendo la intensidad máxima (densidad óptica o absorbancia) de la longitud de onda de absorbancia máxima de la muestra por la intensidad de la absorbancia inicial observada. La intensidad de la absorbancia observada inicial es la intensidad de la absorbancia observada a 450 nm. Por lo tanto, la relación de intensidad de la absorbancia es la absorbancia máxima ($A_{máx}$)/absorbancia a 450 nm (A_{450} o $A_{inicial}$). La proteína es estable a alta concentración cuando la relación de intensidad de la absorbancia es superior a 1,7. En una realización, el valor umbral de la relación de intensidad de la absorbancia es de aproximadamente 1,7 a aproximadamente 2. En una realización específica, el valor umbral de la relación de intensidad de la absorbancia es aproximadamente 1,7.

10 En una realización, una proteína considerada favorable para la dispensación en alta concentración se combina con un excipiente para formar una sustancia farmacéutica formulada (FDS, por sus siglas en inglés) o un medicamento (DP, por sus siglas en inglés). En una realización, la proteína se formula a una concentración final de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml.

15 En una realización, el excipiente incluye un tonificante, un tampón, un tensioactivo, un estabilizante o una combinación de dos o más de los mismos. En una realización, el tonificante es una sal. En una realización específica, la sal es cloruro de sodio. En una realización, el tampón tampona de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 7. En una realización específica, el tampón es histidina. En otra realización específica, el tampón es fosfato. En una realización, el tensioactivo es un polisorbato, tal como polisorbato 20 o polisorbato 80. En una realización, el estabilizante es un azúcar, tal como sacarosa o trehalosa. En otra realización, el estabilizante es un aminoácido, tal como prolina o arginina.

20 25 También se divulga un método para fabricar una proteína terapéutica. En un ejemplo, el método comprende la etapa de seleccionar una proteína que tenga una alta estabilidad coloidal de una pluralidad de proteínas diferentes de estabilidad coloidal desconocida variable; producir la proteína seleccionada en una célula hospedadora; purificar la proteína; y combinar la proteína a una alta concentración con un excipiente para formar una sustancia farmacéutica o un medicamento formulado donde la proteína es estable. En un ejemplo, se añade menos del 10 % de la proteína en la sustancia farmacéutica o medicamento formulados.

30 35 La presente invención proporciona además un método para preparar una formulación farmacéutica de baja viscosidad que contiene una proteína, comprendiendo el método

- 35 a. determinar la capacidad de la proteína para autoasociarse de acuerdo con el método de la presente invención;
- b. combinar un excipiente reductor de la viscosidad con la proteína;
- c. determinar la capacidad de la proteína para autoasociarse de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en presencia del excipiente reductor de la viscosidad; y
- d. formular la proteína con el excipiente reductor de la viscosidad a un nivel que reduce la viscosidad de la solución de proteína en al menos un 50 % que sin el excipiente reductor de la viscosidad.

40 45 La determinación de la capacidad de la proteína para autoasociarse se realiza utilizando el método de la invención.

[Eliminado]

50 [Eliminado]

55 También se divulga una composición que comprende un fármaco bioterapéutico (como, p. ej., una proteína o un anticuerpo) en alta concentración. Específicamente, la composición puede ser de tal manera que no esté presente más de aproximadamente el 10 % de la especie de proteína total como un agregado irreversible a la concentración 60 65 del fármaco bioterapéutico. Como alternativa, la composición es tal que el valor umbral como se analiza en el presente documento está, p. ej., en el intervalo de, p. ej., aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 ($A_{máxima}/A_{450}$). Otra alternativa es cuando el valor umbral es, p. ej., aproximadamente 1,5, aproximadamente 1,6, aproximadamente 1,7, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,9, o aproximadamente 2,0 ($A_{máxima}/A_{450}$). En algunas realizaciones, el valor umbral está en el intervalo de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 1,0 ($A_{máxima}/A_{control}$). Otra alternativa es cuando el valor umbral es, p. ej., aproximadamente 0,7, aproximadamente 0,8, aproximadamente 0,9, o aproximadamente 1,0 ($A_{máxima}/A_{control}$). En otro ejemplo adicional más, la composición es de tal manera que no esté presente más de aproximadamente el 10 % de la especie de proteína total como un agregado irreversible a la concentración del fármaco bioterapéutico y de tal manera que la composición tiene un valor umbral como se analiza en el presente documento, p. ej., en el intervalo de, p. ej., aproximadamente 1,7 a aproximadamente 2,0 ($A_{máxima}/A_{450}$) o cuando el valor umbral es, p. ej., aproximadamente 1,7, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,9, o aproximadamente 2,0 ($A_{máxima}/A_{450}$). La concentración del fármaco biofarmacéutico puede ser de aproximadamente 50

mg/ml o más. Como alternativa, la concentración del fármaco biofarmacéutico puede estar en el intervalo de, p. ej., aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml, tal como, p. ej., de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, tal como, p. ej., de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml.

- 5 En un ejemplo, la invención se refiere a una composición que se puede obtener mediante el método para determinar la capacidad de una proteína para autoensamblarse como se divulga en el presente documento.

También se divulga una composición que comprende un fármaco bioterapéutico (tal como, p. ej., una proteína o un anticuerpo) en alta concentración para su uso en medicina. Dependiendo del fármaco, un experto en la materia sabrá 10 cuáles o qué afecciones clínicas pueden tratarse administrando la composición a un sujeto que lo necesite. La composición puede ser de tal manera que no esté presente más de aproximadamente el 10 % de la especie de proteína total como un agregado irreversible a la concentración del fármaco bioterapéutico. Como alternativa, la composición es de tal manera que el valor umbral como se analiza en el presente documento está, p. ej., en el intervalo de, p. ej., aproximadamente 1,7 a aproximadamente 2,0 ($A_{\text{máxima}}/A_{450}$). Una alternativa adicional es cuando el valor umbral es, 15 p. ej., 1,7, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,9, o aproximadamente 2,0 ($A_{\text{máxima}}/A_{450}$). En una realización adicional más, la composición es de tal manera que no esté presente más de aproximadamente el 10 % de la especie de proteína total como un agregado irreversible a la concentración del fármaco bioterapéutico y de tal manera que la composición tiene un valor umbral como se analiza en el presente documento, p. ej., en el intervalo de, p. ej., 20 aproximadamente 1,7 a aproximadamente 2,0 ($A_{\text{máxima}}/A_{450}$) o cuando el valor umbral es, p. ej., aproximadamente 1,7, aproximadamente 1,8, aproximadamente 1,9, o aproximadamente 2,0 ($A_{\text{máxima}}/A_{450}$). La concentración del fármaco biofarmacéutico puede ser de aproximadamente 50 mg/ml o más. Como alternativa, la concentración del fármaco biofarmacéutico puede estar en el intervalo de, p. ej., aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml, tal como, p. ej., de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, tal como, p. ej., de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml. La composición se puede administrar como dosis única o dosis múltiples según 25 se considere necesario para obtener el resultado deseado en el tratamiento. Como alternativa, la invención se refiere a una composición que comprende un fármaco bioterapéutico (tal como, p. ej., una proteína o un anticuerpo) en una concentración alta para la fabricación de un medicamento en el tratamiento de una enfermedad o enfermedades tratables o curables por dicho fármaco bioterapéutico.

30 En una realización, el método de preparación de una composición biofarmacéutica (como, p. ej., una proteína o un anticuerpo) es de tal manera que la composición resultante posee una reología adecuada. Específicamente, el método para determinar la capacidad de una proteína para autoensamblarse como se divulga en el presente documento permite la determinación de una serie de provisiones de una composición estable que comprende una alta concentración de fármaco biofarmacéutico. Un atributo importante de dicha composición es la viscosidad. Por 35 consiguiente, el método de la invención permitirá la preparación de una composición con las propiedades físicas deseadas, de manera que la composición pueda administrarse mediante una vía o modo de administración deseados. Una vía de administración ilustrativa puede ser la administración mediante inyección. En tales casos, por lo tanto, es importante tener una viscosidad de la composición preparada que permita la inyección mediante, p. ej., una jeringa y una cánula. Dicha cánula puede ser una cánula de tamaño tal como, p. ej., 6G, 8G, 9G, 10G, 11G, 12G, 13G, 14G, 40 16G, 19G, 20G, 21G, 22G, 23G, 24G o 26G. El término "viscosidad" se refiere a la viscosidad dinámica o absoluta (a 20 °C y presión normal) que es una medida de la resistencia de un fluido que se está deformando por esfuerzo de cizalla o por tensión extensional. Por tanto, "viscosidad" describe la resistencia interna de un fluido al flujo y se puede considerar como una medida de la fricción del fluido. Por consiguiente, cuanto menos viscoso es algo, mayor será su facilidad de movimiento (fluidez). En el presente contexto, los intervalos de viscosidad relevantes son de 45 aproximadamente 10-10.000 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 20-9000 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 30-8000 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 40-7000 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 50-6000 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 70-5000 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 90-4000 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 100-3000 mPa·s o aproximadamente 10 mPa·s o aproximadamente 20 mPa·s o 50 mPa·s o 30 mPa·s o 40 mPa·s o 50 mPa·s o alternativamente de 50 50-6000 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 1 mPa·s a aproximadamente 20 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 2 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 3 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 4 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 5 mPa·s, tal como, p. ej., 55 aproximadamente 6 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 7 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 10 mPa·s, aproximadamente 13 mPa·s, aproximadamente 15 mPa·s, tal como, p. ej., aproximadamente 20 mPa·s. Otras unidades para medir la viscosidad son bien conocidas, por ejemplo, 1 centipoise equivale a 1 mPa·s. Sin desear quedar ligado a teoría particular alguna, una proteína típica a baja concentración (es decir, menor de o igual a 10 mg/ml) presenta una viscosidad de aproximadamente 10 mPa·s (10 cP). Como tal, una composición de proteínas altamente concentrada, p. ej., una composición de anticuerpos, que muestra una viscosidad por debajo de 60 aproximadamente 10 centipoises (por debajo de aproximadamente 10 mPa·s) es muy adecuada para su uso como composición biofarmacéutica. Una composición de proteínas (a una alta concentración) que tenga una viscosidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 15 centipoises (aproximadamente 10 mPa·s a aproximadamente 15 mPa·s) es segura para continuar en el proceso de fabricación y desarrollo de fármacos. Una composición de proteína (a una alta concentración) que tiene una viscosidad de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 centipoises (aproximadamente 15 mPa·s a aproximadamente 20 mPa·s) indica que se proceda con precaución en el proceso de fabricación y desarrollo de fármacos. Una composición de proteínas (a una alta concentración) que tiene una viscosidad mayor de aproximadamente 20 centipoises (mayor de aproximadamente 20 mPa·s) informa sobre un

proceso de fabricación y desarrollo de fármacos problemático. La viscosidad puede manipularse por los diversos componentes e ingredientes como se divulga en el presente documento. "Soluble" y "altamente soluble" también se refieren a una proteína que tiene una viscosidad adecuada para cualquiera de los usos divulgados en el presente documento, p. ej., para preparar y usar una composición biofarmacéutica.

- 5 En una realización, la proteína es una proteína de unión a antígeno, por ejemplo, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o una proteína de fusión receptor-Fc.
- 10 En una realización, la célula hospedadora en la que se produce la proteína es una célula de ovario de hámster chino (CHO) o un derivado de una célula CHO, tal como una célula CHO-K1 o una célula EESYR® (véase Chen *et al.*, US771997B2, publicado el 10 de agosto de 2010).
- 15 En una realización, la etapa de purificar la proteína comprende someter la proteína a (1) una o más etapas de cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de interacción hidrófoba, cromatografía en modo mixto y cromatografía de hidroxiapatita; y (2) una de ambas, ultrafiltración y diafiltración.
- 20 En una realización, la proteína se formula a una concentración final de al menos 50 mg/ml. En una realización, la concentración de la proteína es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml.
- 25 En una realización, el excipiente con el que se combina la proteína para formar la sustancia farmacéutica o medicamento formulados comprende uno o más de un tonificante, un tampón, un tensioactivo y estabilizante. En una realización, el tonificante es una sal. En una realización específica, la sal es cloruro de sodio. En una realización, el tampón tampona de aproximadamente pH 6 a aproximadamente pH 7. En una realización específica, el tampón es histidina. En otra realización específica, el tampón es fosfato. En una realización, el tensioactivo es un polisorbato, tal como polisorbato 20 o polisorbato 80. En una realización, el estabilizante es un azúcar, tal como sacarosa o trehalosa. En otra realización, el estabilizante es un aminoácido, tal como prolina o arginina.

Dibujos

- 30 La Figura 1 muestra un perfil de absorbancia de nanopartículas de oro de 20 nm dispersadas (línea A) y nanopartículas de oro de 20 nm aglomeradas (línea B). El eje Y representa la densidad óptica en unidades de absorbancia arbitrarias. El eje X representa la longitud de onda de la luz transmitida en nanómetros (nm).
- 35 La Figura 2 representa un diagrama de dispersión de las relaciones de intensidad de la absorbancia de diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal 2 (mAb2) y nanopartículas de oro de 20 nm en sal 2 mM (círculos), sal 20 mM (cuadrados) y sal 200 mM (triángulos). El eje Y representa la relación de intensidad de la absorbancia máxima de cada condición de muestra sobre la intensidad de la absorbancia inicial. El eje X representa la concentración de mAb2 en microgramos por mililitro.
- 40 La Figura 3 representa un diagrama de dispersión de las relaciones de intensidad de la absorbancia de diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal (mAb) 1 (símbolos abiertos) y mAb5 (símbolos cerrados) en presencia de nanopartículas de oro de 20 nm en sal 2 mM (cuadrados), sal 20 mM (triángulos) y sal 200 mM (círculos). El eje Y representa la relación de intensidad de la absorbancia máxima de cada condición de muestra sobre la intensidad de la absorbancia inicial. El eje X representa la concentración de mAb1 en microgramos por mililitro. El área encuadrada a la izquierda (A) representa condiciones repulsivas coloidales más alta que tienen un valor de selección alto, el área encuadrada en el medio (B) representa condiciones de condiciones atractivas y repulsivas mixtas que tienen un valor de selección moderado o mixto, y el área encuadrada a la derecha (C) representa condiciones de atracción que tienen un valor de selección problemático o bajo.
- 50 La Figura 4 representa una superposición de múltiples perfiles de absorbancia de nanopartículas de oro de 20 nm dispersadas combinadas con albúmina de suero humano (HSA, por sus siglas en inglés) de concentración variable (3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml y 400 µg/ml en orden de arriba a abajo en la porción más a la derecha [750 nm] de la curva). El eje Y representa la absorbancia arbitraria en unidades arbitrarias. El eje X representa la longitud de onda de la luz transmitida en nanómetros (nm).
- 55 La Figura 5 representa un diagrama de dispersión de las relaciones de intensidad de la absorbancia de diferentes concentraciones de HSA derivadas de los espectros de absorbancia sin procesar representados en la Figura 4 y nanopartículas de oro de 20 nm en sal 2 mM (círculos), sal 20 mM (cuadrados) y sal 200 mM (triángulos). El eje Y representa la relación de intensidad de la absorbancia máxima de cada condición de muestra sobre la intensidad de la absorbancia inicial. El eje X representa la concentración de HSA en microgramos por mililitro.
- 60 La Figura 6 representa un diagrama de dispersión de las relaciones de intensidad de la absorbancia de diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal 1 (mAb1) y nanopartículas de oro de 20 nm en sal 2 mM (círculos), sal 20 mM (cuadrados) y sal 200 mM (triángulos). El eje Y representa la relación de intensidad de la absorbancia máxima de cada condición de muestra sobre la intensidad de la absorbancia inicial. El eje X representa la concentración de mAb1 en microgramos por mililitro.

- 5 La Figura 7 representa un diagrama de dispersión de la intensidad de la luz dispersada de soluciones de mAb1 a diferentes concentraciones y concentraciones de sal iónica: NaCl 2 mM (círculos), NaCl 20 mM (cuadrados) y NaCl 200 mM (triángulos). El eje Y representa la intensidad de dispersión de la luz en unidades de absorbancia arbitrarias. El eje X representa la concentración de mAb1 en gramos por litro. La línea continua representa una esfera dura ideal de diámetro comparable.
- 10 La Figura 8 representa un diagrama de dispersión de las relaciones de intensidad de la absorbancia de diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal 6 (mAb6) y nanopartículas de oro de 20 nm en sal 2 mM (círculos), sal 20 mM (cuadrados) y sal 200 mM (triángulos). El eje Y representa la relación de intensidad de la absorbancia máxima de cada condición de muestra sobre la intensidad de la absorbancia inicial. El eje X representa la concentración de mAb6 en microgramos por mililitro.
- 15 La Figura 9 representa un diagrama de dispersión de la intensidad de la luz dispersada de soluciones de mAb6 a diferentes concentraciones y concentraciones de sal iónica: NaCl 2 mM (círculos), NaCl 20 mM (cuadrados) y NaCl 200 mM (triángulos). El eje Y representa la intensidad de dispersión de la luz en unidades de absorbancia arbitrarias. El eje X representa la concentración de mAb6 en gramos por litro. La línea continua representa una esfera dura ideal de diámetro comparable.
- 20 La Figura 10 representa un diagrama de dispersión de las relaciones de intensidad de la absorbancia de diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal 3 (mAb3) y nanopartículas de oro de 20 nm en sal 2 mM (círculos), sal 20 mM (cuadrados) y sal 200 mM (triángulos). El eje Y representa la relación de intensidad de la absorbancia máxima de cada condición de muestra sobre la intensidad de la absorbancia inicial. El eje X representa la concentración de mAb3 en microgramos por mililitro.
- 25 La Figura 11 representa un diagrama de dispersión de las relaciones de intensidad de la absorbancia de diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal 4 (mAb4) y nanopartículas de oro de 20 nm en sal 2 mM (círculos), sal 20 mM (cuadrados) y sal 200 mM (triángulos). El eje Y representa la relación de intensidad de la absorbancia máxima de cada condición de muestra sobre la intensidad de la absorbancia inicial. El eje X representa la concentración de mAb4 en microgramos por mililitro.
- 30 La Figura 12 representa un diagrama de dispersión de las relaciones de intensidad de la absorbancia de diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal 5 (mAb5) y nanopartículas de oro de 20 nm en sal 2 mM (círculos), sal 20 mM (cuadrados) y sal 200 mM (triángulos). El eje Y representa la relación de intensidad de la absorbancia máxima de cada condición de muestra sobre la intensidad de la absorbancia inicial. El eje X representa la concentración de mAb5 en microgramos por mililitro.
- 35 La Figura 13 representa un diagrama de dispersión de CD-SINS de las relaciones de intensidad de la absorbancia de diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal 7 (mAb7) formulado en diferentes tampones, pH y fuerzas iónicas. Cada símbolo representa un tampón, pH y formulación de fuerza iónica diferentes con concentraciones variables de mAb7 (eje X).
- 40 La Figura 14 representa un diagrama de dispersión de CD-SINS de las relaciones de intensidad de la absorbancia de diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal 7 (mAb7) formulado en presencia de diferentes azúcares, concentraciones de azúcares y/o aminoácidos. Cada símbolo representa una formulación de azúcar/aminoácido diferente con concentraciones variables de mAb7 (eje X).
- 45 La Figura 15 representa un gráfico de dispersión de CD-SINS de las relaciones de intensidad de la absorbancia de diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal 7 (mAb7) (8 µg/ml, 32 µg/ml, 128 µg/ml y 512 µg/ml de mAb7) combinado con diferentes compuestos de benzoato. Cuando se combinó con ácido p-aminobenzoico [PABA(-O-), círculos abiertos], mAb7 mostró un perfil de interacción coloidal dinámica favorable en el que la relación de intensidad de la absorbancia (eje Y) excede 1,6.
- 50 La Figura 16 representa un diagrama de dispersión de CD-SINS de las relaciones de intensidad de la absorbancia de diferentes concentraciones de anticuerpo monoclonal K (mAb7) en presencia de concentraciones variables de ácido p-aminobenzoico (PABA). El eje X representa el log2 de la concentración de mAb7 en microgramos por mililitro. El eje Y representa la relación de intensidad de la absorbancia. Los círculos abiertos (-○-) representan sin PABA, los cuadrados abiertos (-□-) representan PABA 12 mM, los triángulos abiertos (-Δ-) representan PABA 18 mM, los círculos cerrados (-●-) representan PABA 24 mM, los cuadrados cerrados (-■-) representan PABA 30 mM y los triángulos cerrados (-▲-) representan PABA 36 mM.
- 55 La Figura 17 representa un diagrama de puntos de la viscosidad de cizalla constante (en mPa*s) de una solución de mAb7 que no contiene PABA (círculos cerrados [-●-] o PABA 20 mM [triángulos cerrados [-▲-]]) en función la de concentración de mAb7 en g/l. Los símbolos abiertos representan la viscosidad extrapolada de soluciones que se espera que contengan 100 g/l de mAb7.
- 60
- 65

Descripción detallada

Antes de describir la presente invención, debe entenderse que la presente invención no se limita a los métodos ni condiciones experimentales particulares descritos, ya que dichos métodos y condiciones pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en el presente documento únicamente tiene el fin de describir realizaciones particulares, y no se pretende que sea limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado únicamente por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se definan de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende habitualmente un experto en la materia a la que pertenece la presente invención. Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico indicado particular, significa que el valor puede variar con respecto al valor indicado en no más de un 15 %. Por ejemplo, como se usa en el presente documento, la expresión "aproximadamente 100" incluye 85 y 115 y todos los valores enteros y no enteros en medio (p. ej., 86, 86,001, 87, 88, 88,3, 89, etc.).

Las cantidades absolutas y cantidades relativas de excipientes, ingredientes y otros materiales pueden describirse por masa o moles. Las unidades de masa pueden expresarse en gramos, miligramos, microgramos y similares). El término "peso" como en "peso/volumen" o "p/v" significa "masa". Las cantidades relativas pueden expresarse como porcentaje en peso (es decir, porcentaje en masa), donde un (1) por ciento de peso a volumen (p/v) significa 1 gramo de material por 100 mililitros de volumen. Además, por ejemplo, una (1) parte de ingrediente "A" por una (1) parte de ingrediente "B" en peso significa, p. ej., que por cada (1) gramo de ingrediente "A" hay un (1) gramo de ingrediente "B". Además, por ejemplo, uno por ciento (1 %) en peso del ingrediente "A" significa, p. ej., que por cada 100 gramos de masa total de una partícula hay un (1) gramo de ingrediente "A". Las cantidades relativas de un ingrediente también se pueden expresar en términos de moles o número de moléculas por volumen dado, p. ej., milimoles por litro (milimolar (mM)), o por otro ingrediente, p. ej., X parte de ingrediente "A" por Y parte de ingrediente "B" por medio de moles por cada X moles de "A" hay Y moles de "B"

Aunque puede usarse cualquier método y material similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o prueba de la presente invención, a continuación se describen los métodos y materiales ilustrativos.

Ensayo para determinar la estabilidad coloidal dinámica: Espectroscopía de autointeracción de nanopartículas dependiente de la concentración (CD-SINS)

Se proporciona un ensayo basado en SINS improvisado para determinar el intervalo virial dinámico para proteínas. Una proteína muestra un comportamiento complejo, que es muy sensible al entorno físico químico de la proteína. Por lo tanto, evaluar el coeficiente virial de una proteína en un conjunto particular de circunstancias ambientales es insuficiente para determinar el coeficiente virial de esa proteína en otros ambientes. La obtención de múltiples viriales para una proteína determinada en un gran número de condiciones es laboriosa y requiere mucho tiempo. Los inventores en el presente documento divulgan un ensayo de alto rendimiento para determinar la estabilidad coloidal dinámica de una proteína, que informa de la selección de una proteína que se puede formular o mantener de otro modo a una concentración alta sin tener problemas asociados con la agregación, o al menos minimizar los posibles problemas de agregación.

Ese ensayo emplea SINS de una manera novedosa al evaluar la agregación de nanopartículas en condiciones de concentración de proteínas variable, fuerza iónica variable, pH variable y otras condiciones. Como se describe anteriormente y en Sules (2011), las nanopartículas de oro se recubren con proteína y se colocan en una solución tamponada. A medida que las nanopartículas se agregan debido a la autoasociación de proteínas, la resonancia del plasmón superficial de las partículas cambia: la absorbancia máxima se desplaza hacia la longitud de onda más alta (desplazamiento al rojo); y la absorbancia es de menor intensidad, es decir, el perfil de absorbancia se extiende y se mueve hacia la izquierda (Figura 1). En este caso, las nanopartículas de oro de 20 nm sin recubrir tienen una absorbancia máxima de aproximadamente 520 a 530 nm.

Una comparación de SINS convencionales con el método bien establecido de dispersión de luz estática (SLS) para determinar B_{22} o A_2 muestra un acuerdo general para la mayoría de los anticuerpos que se probaron. La Tabla 1 compara la absorbancia máxima de perlas recubiertas con diferentes anticuerpos monoclonales específicos y albúmina de suero humano (HSA) en el ensayo SINS con los viriales A_2 para las mismas proteínas determinados por SLS. Como se muestra en la Tabla 1, el análisis SINS distingue fácilmente los sistemas atractivos (A_2 negativo) de los repulsivos (positivo A_2 positivo). Sin embargo, los ensayos SINS y SLS convencionales no muestran intervalo dinámico para condiciones repulsivas. Además, las pocas discrepancias entre SINS y SLS convencionales indican un comportamiento complejo de algunas proteínas.

Tabla 1

Proteína	Naturaleza del sistema	NaCl 2 mM		NaCl 20 mM		NaCl 200 mM	
		SINS	A_2	SINS	A_2	SINS	A_2
HSA	Repulsiva	526	1,17E-4	526	9,68E-5	528	7,85E-5*
mAb1	Repulsiva	530	1,72E-4	531	6,70E-5	532	1,34E-5

(continuación)

Proteína	Naturaleza del sistema	NaCl 2 mM		NaCl 20 mM		NaCl 200 mM	
		SINS	A ₂	SINS	A ₂	SINS	A ₂
mAb2	Mixta	583	-2,36E-5	536	-1,44E-5	534	1,47E-5
mAb3	Atractiva	556	-3,39E-5	555	-4,68E-5	565	NP
mAb4	Repulsiva	531	-5,90E-5	533	-1,06E-5	535	1,38E-5
mAb5	Mixta	562	-1,09E-5	535	-2,14E-5	530	-7,67E-6

Los inventores observaron que algunas proteínas son capaces de ser estables a altas concentraciones, pero muestran espectros de absorbancia máxima A2 negativos o desplazados al rojo ($\lambda_{\text{máx}}$). por ejemplo, mAb5 puede alcanzar

- 5 fácilmente una concentración de aproximadamente ~200 g/l y permanecer estable, pero su A_2 es negativo y su $\lambda_{\text{máx}}$ se desplaza al rojo a la fuerza iónica más baja. De manera similar, mAb2 puede alcanzar fácilmente una concentración de aproximadamente -175 g/l y permanecer estable, pero su A_2 es negativo a menor concentración de sal y su $\lambda_{\text{máx}}$ se desplaza al rojo a la fuerza iónica más baja.

10 En este caso, se divulga un método mejorado de SINS. El método proporciona datos de estabilidad coloidal dinámica para proteínas para evaluar fenómenos específicos de proteínas en una fase más temprana de la línea temporal de desarrollo, evitando al mismo tiempo la necesidad de grandes cantidades de proteína. El método emplea resonancia de plasmón superficial de nanopartículas recubiertas en presencia de cantidades variables de proteína en solución en exceso de las cantidades necesarias para recubrir las nanopartículas. Se observan perfiles de absorbancia, se calculan las relaciones de intensidad de la absorbancia para cada muestra variante y se representan para determinar la estabilidad coloidal dinámica determinada.

En una realización, para cada muestra en una pluralidad de muestras utilizadas para determinar múltiples valores individuales de las relaciones de intensidad de la absorbancia para una proteína determinada, se combinan las nanopartículas con cantidades variables de proteína en exceso de la cantidad mínima de proteína necesaria para recubrir completamente las partículas. La cantidad de proteína mínima utilizada depende de la masa molecular de la proteína (es decir, su radio hidrodinámico), el tamaño (área de superficie) de la nanopartícula y la concentración de nanopartículas. Por ejemplo, cuando se utilizan nanopartículas de oro de 20 nm a aproximadamente 6 a $6,5 \times 10^{11}$ partículas por ml, aproximadamente 2,5 µg/ml de una proteína de aproximadamente 50 a 150 kDa son suficientes para recubrir completamente las nanopartículas. Por lo tanto, se utiliza proteína en exceso de 2,5 µg/ml para cada muestra de la pluralidad de muestras en esas condiciones. En este caso, por ejemplo, la proteína se incluye en una muestra a aproximadamente 2,6 µg/ml - aproximadamente 512 µg/ml o más, aproximadamente 3 ± 1 µg/ml, aproximadamente 4 ± 1 µg/ml, aproximadamente 5 ± 1 µg/ml, aproximadamente 6 ± 1 µg/ml, aproximadamente 7 ± 1 µg/ml, aproximadamente 8 ± 1 µg/ml, aproximadamente 9 ± 1 µg/ml, aproximadamente 10 ± 1 µg/ml, aproximadamente 15 ± 5 µg/ml, aproximadamente 20 ± 5 µg/ml, aproximadamente 25 ± 5 µg/ml, aproximadamente 30 ± 5 µg/ml, aproximadamente 40 ± 5 µg/ml, aproximadamente 50 ± 10 µg/ml, aproximadamente 60 ± 10 µg/ml, aproximadamente 70 ± 10 µg/ml, aproximadamente 80 ± 10 µg/ml, aproximadamente 90 ± 10 µg/ml, aproximadamente 100 ± 10 µg/ml.

aproximadamente 125 ± 15 $\mu\text{g/ml}$, aproximadamente 150 ± 25 $\mu\text{g/ml}$, 175 ± 25 $\mu\text{g/ml}$, 200 ± 25 $\mu\text{g/ml}$, 225 ± 25 $\mu\text{g/ml}$, 250 ± 25 $\mu\text{g/ml}$, 300 ± 50 $\mu\text{g/ml}$, 350 ± 50 $\mu\text{g/ml}$, 400 ± 50 $\mu\text{g/ml}$, 450 ± 50 $\mu\text{g/ml}$, 500 ± 50 $\mu\text{g/ml}$ o 512 ± 50 $\mu\text{g/ml}$. En algunas realizaciones, la pluralidad de muestras incluye dos muestras, tres muestras, cuatro muestras, cinco muestras, seis muestras, siete muestras, ocho muestras, nueve muestras, 10 muestras o más que contienen una concentración de proteínas diferente.

Por ejemplo, la pluralidad de muestras en una realización incluye $6,3 \times 10^{11}$ partículas/ml de nanopartículas de oro de 20 nm y un anticuerpo a una primera concentración de aproximadamente 3,125 µg/ml, una segunda concentración de 6,25 µg/ml, una tercera concentración de aproximadamente 12,5 µg/ml, una cuarta concentración de aproximadamente 25 µg/ml, una quinta concentración de aproximadamente 50 µg/ml, una sexta concentración de aproximadamente 100 µg/ml, una séptima concentración de aproximadamente 200 µg/ml y una octava concentración de aproximadamente 400 µg/ml.

En una realización, para cada muestra en la pluralidad de muestras utilizadas para determinar múltiples valores individuales de las relaciones de intensidad de la absorbancia para una proteína determinada, cada combinación de nanopartículas/proteínas se combina con una concentración de sal variable. Por ejemplo, la muestra puede contener una proteína de sal neutra, como cloruro de sodio, a una concentración de aproximadamente 1 μ M, aproximadamente 10 μ M, aproximadamente 100 μ M, aproximadamente 1 mM, aproximadamente 2 mM, aproximadamente 4 mM, aproximadamente 6 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 40 mM, aproximadamente 50 mM, aproximadamente 60 mM, aproximadamente 70 mM, aproximadamente 80 mM, aproximadamente 90 mM, aproximadamente 100 mM, aproximadamente 150 mM, aproximadamente 175 mM, aproximadamente 200 mM, aproximadamente 250 mM o aproximadamente 300 mM o más. En otra realización, la sal puede ser una sal caotrópica, tal como cloruro de guanidinio, perclorato de litio, acetato de litio, cloruro de magnesio o similares. La muestra también puede contener además de o en lugar de la sal caotrópica otro agente caotrópico tal como el butanol, etanol, fenol, propanol, dodecilsulfato sódico, tiourea o urea. En otra realización, la muestra puede contener una sal cosmotrópica tal como una sal de carbonato, sulfato o fosfato, por ejemplo, sulfato de amonio.

- La pluralidad de muestras puede contener dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o 10 o más subconjuntos de muestras que tienen una concentración de sal diferente. De este modo, por ejemplo, una pluralidad de muestras puede comprender 10 concentraciones de proteínas diferentes a tres concentraciones de sal diferentes para un total de 30 muestras. En una realización específica, un subconjunto de la pluralidad de muestras contiene cloruro de sodio aproximadamente 2 mM, otro conjunto de la pluralidad de muestras contiene cloruro de sodio aproximadamente 20 mM y otro conjunto de la pluralidad de muestras contiene cloruro de sodio aproximadamente 200 mM. La sal 2 mM se considera de baja fuerza iónica y la 200 mM se considera de alta fuerza iónica. La alta tonicidad hasta 300 mM inclusive de sal, aunque no es procedente para la mayoría de las formulaciones terapéuticas de proteínas, se utiliza en el contexto de preparaciones de proteínas sometidas a purificación mediante columnas de cromatografía de interacción hidrófoba (HIC, por sus siglas en inglés). Por lo tanto, la invención es útil para determinar si la proteína de alta concentración en condiciones de alta concentración de sal será adecuada para la purificación por HIC o similares.
- Se aplica luz blanca a cada muestra y se obtiene su espectro de absorbancia. La relación de intensidad de la absorbancia se calcula a partir de cada muestra de la pluralidad y se representa. En aquellas muestras en las que las nanopartículas no se agregan o en donde la agregación es baja, es decir, donde la proteína muestra repulsión o baja capacidad de agregación, la longitud de onda de máxima absorbancia y la intensidad de la absorbancia son similares a las de las nanopartículas de control no recubiertas. En aquellas muestras en las que se agregan las nanopartículas, es decir, donde la proteína muestra atracción o alta capacidad de agregación, la longitud de onda de máxima absorbancia se desplaza hacia el rojo y el perfil de absorbancia se aplana a medida que la intensidad de la absorbancia máxima disminuye en relación con las nanopartículas de control no recubiertas. Cada muestra de la pluralidad de muestras para una proteína dada puede mostrar diferentes perfiles de absorbancia (es decir, diferentes relaciones de intensidad de la absorbancia), mostrando, en algunos casos, atracción y mostrando, en otros casos, repulsión. Estas proteínas tienen un intervalo dinámico de estabilidad coloidal y pueden ser estables coloidalmente en condiciones específicas. Para algunas proteínas, la proteína puede mostrar repulsión en todos los parámetros (muestras). Dicha una proteína se considera fuerte o que tiene una estabilidad coloidal dinámica fuerte. Para otras proteínas, la proteína puede mostrar atracción en todas las condiciones de los parámetros probados. Dicha una proteína se considera coloidalmente inestable.
- Aquellas proteínas que muestran repulsión en al menos una condición probada (en al menos una muestra) pueden seleccionarse para producción y formulación a gran escala como una sustancia farmacéutica estable. Es menos probable que aquellas proteínas formen agregados durante la producción y el almacenamiento. Asimismo, aquellas condiciones en las que una proteína muestra repulsión pueden informar de las etapas de producción y los excipientes de formulación de la proteína como sustancia farmacéutica. Por ejemplo, la utilización de SINS dependiente de la concentración (CD-SINS) como se describe en el presente documento puede determinar la capacidad de fabricación de proteínas, p. ej., en las etapas aguas abajo de ultrafiltración y diafiltración. La selección de una solución de proteínas de baja viscosidad para la fabricación a gran escala puede aumentar la eficiencia y disminuir el coste del bioprocesamiento (Shire SJ, 2009, "Formulation and manufacturability of biologics." Curr Opin Biotechnol. 20(6):708-14). CD-SINS también es susceptible generalmente a una amplia gama de excipientes (tanto tradicionales como no tradicionales). CD-SINS se puede utilizar para derivar relaciones estructura-actividad entre diferentes series químicas utilizadas para formular la sustancia farmacológica proteica, y se puede utilizar para seleccionar excipientes que invierten la autoasociación (véanse el ejemplo 11 y las figuras 13 y 14).
- Los criterios generales para seleccionar moléculas y condiciones que tengan una dinámica de estabilidad coloidal aceptable se representan en la figura 3, que representa gráficamente la relación de intensidad de la absorbancia de dos proteínas, mAb1 y mAb5 en tres condiciones de fuerza iónica. Se proporcionan tres canastas: (A) seguro proceder, que incluye moléculas fuertes que se espera sean estables a altas concentraciones; (B) proceder con precaución, que incluye moléculas que muestran relaciones de intensidad de la absorbancia por encima del nivel umbral (p. ej., una $A_{\text{máxima}}/A_{450}$ de $\geq 1,7$) en algunas condiciones; y (C) potencialmente problemática, que incluye moléculas que no logran alcanzar el valor umbral de la relación de intensidad de la absorbancia en ninguna condición. Por ejemplo, mAb1 (símbolos abiertos) es fuerte en términos de estabilidad coloidal, cayendo en la canasta "seguro proceder" en condiciones de sal más bajas (NaCl 2 mM, cuadrados abiertos; NaCl 20 mM, triángulos abiertos), una categoría "proceder con precaución" en condiciones de sal más altas (NaCl 200 mM, círculos abiertos). Por el contrario, mAb5 (símbolos cerrados) es menos fuerte, cayendo en la canasta "potencialmente problemática" en condiciones de sal menores, y en la canasta "proceder con precaución" en la condición de contenido de sal más alto.
- El SINS dependiente de la concentración (CD-SINS) demuestra cómo los sistemas proteína/disolvente "evolucionan" al aumentar la concentración de proteínas. Captura un gran número de interacciones coloidales que muestran diferentes proteínas a una alta concentración de proteínas: repulsivo a ideal (neutral); atractivo a ideal; ideal a atractivo; e insensible. Captura muchas de las diferentes facetas de las interacciones coloidales, tal como la repulsión o atracción mediadas por la carga, traza la exploración electrostática y cualitativamente proporciona un intervalo dinámico bastante amplio. CD-SINS revela posibles problemas mediados por hidrófobos y marca moléculas generalmente problemáticas. El método proporciona una herramienta analítica para evaluar la capacidad de desarrollo de alta concentración de proteínas con requisitos de proteínas notablemente mínimos, y que es susceptible de automatización.

Reducción de la viscosidad de proteínas coloidales atractivas o mixtas

- Aquellas proteínas que tienen perfiles de interacción coloidal dinámica desfavorables, es decir, que tienden a autoasociarse, generalmente puede tener viscosidades altas a concentraciones más altas. Esta alta viscosidad a alta concentración puede hacer que la proteína no sea deseable para inyección parenteral. El ensayo CD-SINS descrito en el presente documento es útil para explorar excipientes reductores de la viscosidad. En un aspecto, se proporciona un método para producir una formulación de proteínas de viscosidad reducida. En una realización, un posible excipiente reductor de la viscosidad.
- 5 10 En algunas realizaciones, el excipiente reductor de la viscosidad reduce la viscosidad de la solución de proteínas en al menos un 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 100 %, 2,5 veces, 3 veces, 3,5 veces, 4 veces, 4,5 veces, 5 veces o > 5 veces con respecto a la viscosidad de la solución de proteínas sin el excipiente reductor de la viscosidad.
- 15 En algunas realizaciones, el excipiente reductor de la viscosidad es un aminoácido o una sal de un aminoácido. En algunas realizaciones, el excipiente reductor de la viscosidad es un hidrocarburo, un alcano, un alqueno y alquino, un ácido graso, una cola de ácido graso, una estructura que contiene benceno, un ácido benzoico, un hidrocarburo sustituido, un alcano sustituido, un alqueno sustituido, un alquino sustituido, un ácido graso sustituido, una cola de ácido graso sustituida, una estructura que contiene benceno sustituido, un ácido benzoico sustituido, un ácido sulfónico, un ácido aminobenzoico, un ácido benzoico alquilado, un ácido hidroxibenzoico o una sal de amonio de un ácido benzoico. En una realización, el excipiente reductor de la viscosidad es un ácido paraaminobenzoico (PABA). En una realización, el PABA se incluye en la formulación de proteínas a una concentración de 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM, 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 21 mM, 22 mM,
- 20 25 23 mM, 24 mM o 25 mM. En una realización, el excipiente reductor de la viscosidad es PABA combinado a una concentración > 12 mM o a una concentración de 20 mM en la solución de proteínas.

Definiciones

- Como se usa en el presente documento, la expresión "estabilidad coloidal", que se puede utilizar indistintamente con "propensión a autoasociarse" o "propensión a agregar", significa el efecto neto (global) de las fuerzas moleculares a través del espacio, por ejemplo, electrostáticas, de van der Waals y similares, que pueden dar como resultado una capacidad de interacción de una proteína atractiva, neutra o repulsiva.
- 30 Como se usa en el presente documento, la expresión "relación de intensidad de la absorbancia" significa la relación entre la intensidad de la absorbancia máxima de una muestra y la intensidad de la absorbancia basal. La intensidad basal puede obtenerse de la absorbancia de la muestra a una longitud de onda arbitraria suficientemente más corta o más larga que la longitud de onda de la absorbancia esperada. En algunas realizaciones, la longitud de onda de la absorbancia esperada para las nanopartículas de oro de 20 nm varía de aproximadamente 500 a 600 nm, y alcanza un máximo de aproximadamente 530 nm. Por lo tanto, la intensidad de la absorbancia basal puede ser la intensidad de la absorbancia de la muestra a una longitud de onda inferior a 500 o superior a 600. Por ejemplo, la intensidad de la absorbancia basal puede ser la intensidad de la absorbancia de la muestra a 450 nm. En este caso, la relación de intensidad de la absorbancia es la intensidad de la absorbancia a la longitud de onda de absorbancia máxima ($A_{\text{máxima}}$) de la muestra dividida por la intensidad de la absorbancia a 450 nm (A_{450} o A_{inicial}).
- 35 40 45 En otros ejemplos, la intensidad de la absorbancia basal puede ser la intensidad de la absorbancia máxima de las nanopartículas no recubiertas (nanopartículas de control). En este caso, las nanopartículas sin proteína, pero en la misma sal tamponada en la que se muestrean las nanopartículas recubiertas experimentales, se someten a análisis de absorbancia. La intensidad de absorbancia máxima de las nanopartículas de control no recubiertas (A_{control}) sirve como la intensidad de la absorbancia basal. En este caso, la relación de intensidad de la absorbancia se calcula como $A_{\text{máxima}}/A_{\text{control}}$.

La absorbancia se expresa generalmente en unidades arbitrarias, que se cancelan cuando se calcula la relación. La absorbancia se mide pasando una fuente de luz blanca a través de una muestra. La muestra absorbe luz de determinadas longitudes de onda a determinadas intensidades, de acuerdo con las propiedades ópticas de la muestra. La intensidad de la luz que pasa a través de la muestra, es decir, la "luz transmitida", se mide en múltiples longitudes de onda y se calcula la intensidad de la "luz absorbida".

El espectro de absorbancia de las nanopartículas de oro está determinado por resonancia de plasmón superficial de las partículas. El campo eléctrico de la luz entrante interactúa con los electrones libres en la superficie de las partículas de oro y da como resultado una fuerte absorción en la región visible. Esta propiedad óptica depende del tamaño, forma y estado de aglomeración de las nanopartículas. Por ejemplo, las partículas más pequeñas (20 nm de diámetro) absorben a una longitud de onda más baja (~522 nm) y con un máximo más estrecho y más intenso ($A = \sim 0,6$) que las partículas más grandes (p. ej., la partícula de 250 nm absorbe de manera más fuerte a 570-660 nm con una intensidad de aproximadamente el 40 % de la intensidad de la partícula de 20 nm). Una partícula de forma irregular muestra un máximo más amplio de menor intensidad que se desplaza al rojo en relación con una partícula esférica. Del mismo modo, las partículas aglomeradas muestran un máximo más amplio de menor intensidad que se desplaza

al rojo en relación con las partículas esféricas discretas dispersadas (figura 1).

Como se usa en el presente documento, la expresión "valor umbral" indica una relación de intensidad de la absorbancia por encima de la cual se considera que una proteína es factible que logre una alta concentración estable en solución.

5 Una muestra de proteínas que tiene una relación de absorbancia por debajo del valor umbral indica que la proteína, al menos en las condiciones experimentales de pH, fuerza iónica y densidad de proteínas, puede no ser factible que logre una alta concentración estable en solución. Esta viabilidad de una proteína para lograr una alta concentración en solución está inversamente relacionada con la "atracción" de la proteína o con la capacidad de autoasociación, y 10 está positivamente relacionada con la "repulsión" de la proteína. En algunas realizaciones, el valor umbral es de aproximadamente 1,7, 1,8, 1,9 o 2 ($A_{\text{máxima}}/A_{450}$). En algunas realizaciones, el valor umbral es de aproximadamente 0,7, 0,8, 0,9 o 1 ($A_{\text{máxima}}/A_{\text{control}}$).

Como se usa en el presente documento, la expresión "intervalo dinámico" se refiere a la capacidad de una proteína de autoasociación en una variedad de condiciones. Los ensayos de autoasociación de la técnica anterior que emplean 15 espectroscopía de autointeracción de nanopartículas (SINS) solamente miden la capacidad de las proteínas de autoasociación en un único conjunto de condiciones. Una proteína que se considere "atractiva" según ese ensayo de un solo punto puede rechazarse, mientras que una proteína que se considere "repulsiva" según ese ensayo puede conservarse como factible para la formulación y producción a alta concentración. En este caso, se obtienen una serie 20 de relaciones de intensidad de la absorbancia en diversas condiciones experimentales y se representan gráficamente, generando un perfil de "intervalo dinámico" para una proteína particular. En algunas condiciones, la proteína puede tener una relación de intensidad de la absorbancia por debajo del umbral, mientras que en otras condiciones la proteína puede tener una relación de intensidad de la absorbancia por encima del umbral. Tal proteína tendría un grado aceptable de repulsión en esas condiciones, que puede informar de la selección de procesos de fabricación de 25 proteínas y excipientes y concentraciones de formulación. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 2 (mAb2) muestra un grado aceptable de repulsión en condiciones de alta concentración/alta fuerza iónica (p. ej., NaCl 200 mM) condiciones, pero de atracción inaceptable en condiciones de baja fuerza iónica (figura 2).

Las condiciones experimentales utilizadas para determinar el intervalo dinámico de la proteína incluyen la 30 concentración de la proteína; el tamaño, el número de forma de la nanopartícula; el material del que está hecha la nanopartícula; el método de recubrimiento de las nanopartículas con proteína; la naturaleza y cantidades de los ingredientes en el tampón o disolvente; el pH; y la fuerza iónica de la solución. Por ejemplo, el pH del tampón puede afectar la carga global de la proteína dependiendo del punto isoeléctrico de la proteína (pI), y la carga, a su vez, puede afectar al coeficiente virial de segundo orden de la proteína (B_{22} negativo es atractivo y un B_{22} positivo es repulsivo). 35 La fuerza iónica (es decir, contenido de sal) se sabe generalmente que afecta a la autoatracción de proteínas, donde el aumento de la fuerza iónica protege a las proteínas contra la repulsión basada en cargas y promueve la atracción.

En algunas realizaciones, se toman puntos de datos (es decir, relaciones de intensidad de la absorbancia) a diferentes 40 concentraciones de sal o sin sal en absoluto. Por ejemplo, la sal, p. ej., cloruro de sodio, puede incluirse en cualquier concentración que varíe desde cantidades ínfimas hasta sobresaturadas. En algunas realizaciones, el cloruro de sodio se incluye en la "sal tamponada" a una concentración de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 1 M, 1 mM a 500 mM o 2 mM a 300 mM. En algunas realizaciones, los puntos de datos se toman en dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10 o más condiciones de concentración de sal diferentes. En una realización, se utilizan al menos tres condiciones de concentración de sal, por ejemplo, cloruro de sodio 2 mM, 20 mM y 200 mM. En otra realización, 45 se utilizan al menos cinco condiciones de concentración de sal. Los ejemplos no limitantes de cinco condiciones de concentración de sal pueden incluir: cloruro de sodio 1 mM, 2 mM, 20 mM, 200 nM y 300 mM, o cloruro de sodio 1 mM, 5 mM, 20 mM, 100 nM y 300 mM. El experto en la materia puede adaptar fácilmente el ensayo utilizando diferentes sales y/o condiciones de sal en función de la naturaleza del uso experimental o terapéutico de la proteína de interés.

50 Como se usa en el presente documento, la expresión "sal tamponada" indica una solución acuosa que contiene un tampón y una sal. La sal puede estar en cualquier concentración y el tampón puede tener capacidad de tamponamiento en cualquier intervalo de pH. En algunas realizaciones, la sal y el tampón pueden ser uno y los mismos, tal como carbonato de calcio. Se sabe que las sales afectan a la interacción de las proteínas y, con frecuencia, se utilizan para precipitar proteínas, para afectar el plegamiento de proteínas, para estabilizar formulaciones farmacéuticas, para proporcionar tonicidad y para regular el comportamiento de las proteínas durante la cromatografía. Las sales pueden 55 ser agentes cosmotrópicos (energía libre de enlaces de hidrógeno positiva) o caotrópicos (energía libre de enlaces de hidrógeno negativa). Los cosmotropos facilitan las interacciones agua-agua y se usan habitualmente para precipitar proteínas por adición de sal. Ejemplos de iones cosmotrópicos incluyen carbonato, sulfato, fosfato, magnesio, litio, zinc y aluminio. Los caotropos alteran los enlaces de hidrógeno y debilitan los efectos hidrófobos, promoviendo así la desnaturalización de las proteínas. Ejemplos de sales caotrópicas incluyen cloruro de guanidinio, perclorato de litio, 60 acetato de litio y cloruro de magnesio. Las sales como el cloruro de sodio están cerca de la mitad de la serie de Hofmeister, lo que significa que no son eficaces ni para disolver ni para precipitar por adición de sal. Dependiendo del objetivo del ensayo de autoasociación de proteínas, las sales de la sal tamponada pueden seleccionarse por su capacidad para disolver por adición de sal, precipitar por adición de sal o permanecer efectivamente neutras a 65 concentraciones fisiológicas.

Se incluyen "tampones" para controlar el pH, lo que a su vez afecta las propiedades de carga de las proteínas y su estructura y función posteriores. Dependiendo del objetivo del ensayo de autoasociación de proteínas, los tampones pueden seleccionarse, por ejemplo, por su capacidad para potenciar la purificación de proteínas, promover la estabilidad de las proteínas a largo plazo o permitir la comodidad del paciente durante la administración de una

5 proteína terapéutica. Los tampones útiles son bien conocidos en la técnica e incluyen MES, TRIS, PIPES, MOPS, fosfato, citrato-fosfato, citrato, acetato, carbonato-bicarbonato, histidina, imidazol y similares. En una realización particular, el tampón utilizado en el ensayo de autoasociación de proteínas es MES (ácido 2-(N-morfolina)etanosulfónico), que tiene un intervalo de tampón útil de aproximadamente pH 5,5 a 6,7. En una realización específica, el MES está incluido en la sal tamponada a aproximadamente 10 mM, pH6.

10 Se utiliza un tampón en el componente de sal tamponada del sistema y de los reactivos de ensayo. También se utiliza tampón para controlar el pH de las soluciones que contienen la proteína más allá del ensayo. Los tampones se utilizan en los medios de producción de cultivos celulares utilizados para producir la proteína. Los tampones también se utilizan en soluciones utilizadas durante la purificación de proteínas y las diversas operaciones unitarias implementadas en 15 las mismas. Los tampones se utilizan en sustancias farmacéuticas formuladas y en la formulación del medicamento final.

20 Los tampones útiles en la formulación de proteínas son bien conocidos en la técnica e incluyen histidina, succinato, citrato, acetato, fosfato y similares. El tampón puede incluirse en la sustancia farmacéutica formulada (FDS) o el medicamento (DP) a una concentración de 1 mM a 100 mM. En algunas realizaciones particulares, el tampón se incluye a aproximadamente 10 mM. En determinadas realizaciones, el tampón está presente a una concentración de 5 mM ± 0,75 mM a 15 mM ± 2,25 mM; de 6 mM ± 0,9 mM a 14 mM ± 2,1 mM; de 7 mM ± 1,05 mM a 13 mM ± 1,95 mM; de 8 mM ± 1,2 mM a 12 mM ± 1,8 mM; de 9 mM ± 1,35 mM a 11 mM ± 1,65 mM; 10 mM ± 1,5 mM; o aproximadamente 25 10 mM. En algunas realizaciones específicas, el sistema tampón de la FDS o DP comprende histidina, fosfato y/o acetato a 10 mM ± 1,5 mM.

30 En algunas realizaciones, el tampón se selecciona de un producto químico capaz de tamponar en algún lugar dentro del intervalo de pH de aproximadamente 3 a aproximadamente 9, o dentro del intervalo de pH de aproximadamente 3,7 a aproximadamente 8,0. Por ejemplo, la solución liofilizada previamente puede tener un pH de aproximadamente 3,4, aproximadamente 3,6, aproximadamente 3,8, aproximadamente 4,0, aproximadamente 4,2, aproximadamente 4,4, aproximadamente 4,6, aproximadamente 4,8, aproximadamente 5,0, aproximadamente 5,2, aproximadamente 5,4, aproximadamente 5,6, aproximadamente 5,8, aproximadamente 6,0, aproximadamente 6,2, aproximadamente 6,4, aproximadamente 6,6, aproximadamente 6,8, aproximadamente 7,0, aproximadamente 7,2, aproximadamente 7,4, aproximadamente 7,6, aproximadamente 7,8, o aproximadamente 8,0.

35 35 El tampón puede ser una combinación de tampones individuales, tal como, p. ej., la combinación de histidina y acetato (tampón his-acetato). En una realización, el tampón tiene un intervalo de tamponamiento de aproximadamente 3,5 a aproximadamente 6, o de aproximadamente 3,7 a aproximadamente 5,6, tal como el intervalo tamponado por acetato. En una realización, el tampón tiene un intervalo de tamponamiento de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 8,5, o de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 8,0, tal como el intervalo tamponado por fosfato. En una realización, el tampón tiene un intervalo de tamponamiento de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 8,0, o de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,4, tal como el intervalo tamponado por histidina.

40 Como se usa en el presente documento, el término "nanopartícula" se refiere a una partícula esférica, casi esférica o 45 esferoidal que tiene un diámetro en la escala de 10^{-9} M (0,001 micras) a 10^{-6} M (1 micra). Las nanopartículas pueden comprender cualquier material, incluyendo polímeros orgánicos, metales, materiales semiconductores, materiales magnéticos y combinaciones de materiales. Las nanopartículas metálicas son particularmente adecuadas para 50 ensayos basados en resonancia de plasmón superficial, debido a que las esferas de metal tienen electrones libres en su superficie que pueden interactuar con el campo eléctrico de la luz incidente, dando como resultado un fuerte efecto de absorbancia. Las nanopartículas de oro y las nanopartículas de plata son ejemplos de nanopartículas metálicas útiles para medir cambios en la resonancia del plasmón. El tamaño, la forma y el material de la nanopartícula afecta a la intensidad y la longitud de onda de la absorbancia máxima. Son útiles las nanopartículas de oro de 20 nm a 400 nm de diámetro. En algunas realizaciones, la nanopartícula utilizada en el ensayo de intervalo dinámico de autoasociación es una nanopartícula de oro (AuNP, por sus siglas en inglés) con un diámetro de aproximadamente 20 nm, 30 nm, 40 nm, 50 nm, 60 nm, 80 nm o 100 nm.

55 Como se usa en el presente documento, el término "luz" significa radiación electromagnética (EMR, por sus siglas en inglés). La luz puede ser de una sola longitud de onda, de una gama reducida de longitudes de onda, de una amplia gama de longitudes de onda tal como "luz blanca", de una colección de longitudes de onda. La luz puede ser en forma de rayo láser o como luz difusa. El ensayo de autoagregación es un ensayo espectrofotométrico, donde se mide el efecto que tiene la muestra sobre la luz. Por lo tanto, se aplica luz a la muestra (es decir, "luz incidente"), la muestra interactúa con la luz, tal como generando plasmones y absorbiendo longitudes de onda de luz particulares (es decir, luz absorbida), y se transmite un subconjunto de la luz a través de la muestra y a un detector (es decir, "luz transmitida"). En algunas realizaciones, la luz incidente es una luz blanca que comprende EMR que tiene longitudes de onda de 400 nm a 800 nm. En algunas realizaciones, la luz transmitida se detecta y mide en longitudes de onda que abarcan de 400 nm a 800 nm, a partir de la cual se determina la intensidad de la absorbancia.

- Como se usa en el presente documento, el término "autoasociación" se refiere a la unión no específica de una proteína específica a otra proteína de la misma especie. Por no específica, lo que se entiende es la asociación por fuerzas débiles que se consideran no biológicas. Para distinguir la interacción no específica de la específica, la asociación de dos mitades de anticuerpos idénticos para formar un anticuerpo intacto se considera una interacción específica. Por el contrario, las asociaciones de dos o más anticuerpos intactos idénticos a través de interacciones de Van der Waals o hidrófobas para formar dímeros, trímeros o multímeros de orden superior que son reversibles o irreversibles son "no específicas".
- 5 Como se usa en el presente documento, el término "estable" o "estabilidad" se refiere a la retención de un grado aceptable de estructura física (estabilidad termodinámica), estructura química (estabilidad cinética) o función biológica (estabilidad funcional) de una proteína u otra macromolécula biológica a lo largo del tiempo. La proteína puede ser estable aunque no mantenga el 100 % de su estructura física, estructura química o función biológica después del almacenamiento durante un determinado período de tiempo. En determinadas circunstancias, el mantenimiento de 10 aproximadamente el 90 %, aproximadamente el 95 %, aproximadamente el 96 %, aproximadamente el 97 %, 15 aproximadamente el 98 % o aproximadamente el 99 % de una estructura o función de la proteína después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo en particular puede considerarse como "estable".
- 20 La estabilidad se puede medir determinando el porcentaje de proteína natural que queda en una muestra. El porcentaje de proteína que conserva su forma natural se puede determinar mediante cromatografía de exclusión por tamaño, que separa los agregados de alto peso molecular de la proteína natural de menor peso molecular. Una proteína estable conservará el 90 % o más de su estructura natural con el tiempo. Una proteína estable no contiene más del 10 % del total de especies de proteínas como agregado irreversible.
- 25 Una proteína estable tiene una baja tasa de formación de agregados. Una proteína estable experimenta un aumento en la formación de especies de alto peso molecular, es decir, agregación, que es menos del 15 %, menos del 14 %, menos del 13 %, menos del 12 %, menos del 11 %, menos del 10 %, menos del 9 %, menos del 8 %, menos del 7 %, menos del 6 %, menos del 5 %, menos del 4 %, menos del 3 %, menos del 2 %, menos del 1 %, o menos del 0,5 % durante el almacenamiento a aproximadamente 5 °C a aproximadamente 25 °C durante hasta 7 meses, hasta 8 meses, 30 hasta 9 meses, hasta 10 meses, hasta 11 meses, hasta 12 meses, hasta 13 meses, hasta 14 meses, hasta 15 meses, hasta 16 meses, hasta 17 meses, hasta 18 meses, hasta 19 meses, hasta 20 meses, hasta 21 meses, hasta 22 meses, hasta 23 meses o hasta 24 meses.
- 35 Se pueden utilizar otros métodos para evaluar la estabilidad de una proteína tal como, p. ej., calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés) para determinar la estabilidad térmica, agitación controlada para determinar la estabilidad mecánica y absorbancia a aproximadamente 350 nm o a aproximadamente 405 nm para determinar la turbidez en solución. En una realización, una proteína puede considerarse estable si después de un almacenamiento de 6 meses o más de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 25 °C, el cambio en la DO405 de la formulación es de menos de aproximadamente 0,05 (p. ej., 0,04, 0,03, 0,02, 0,01 o menos) de la DO405 de la proteína en el tiempo 40 cero.
- Como se usa en el presente documento, el término "proteína" significa cualquier polímero de aminoácidos que tenga más de aproximadamente 50 aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces amida. Las proteínas contienen una o más cadenas poliméricas de aminoácidos conocidas en la técnica como "polipéptidos". Una proteína puede 45 contener uno o más polipéptidos para formar una única biomolécula funcional. Los "polipéptidos" generalmente contienen más de 50 aminoácidos, mientras que los "péptidos" generalmente contienen 50 aminoácidos o menos. Las proteínas pueden contener una o más modificaciones covalentes y no covalentes. Pueden estar presentes puentes disulfuro (es decir, entre restos de cisteína para formar cistina) en algunas proteínas. Estos enlaces covalentes pueden estar dentro de una sola cadena polipeptídica o entre dos cadenas polipeptídicas individuales. Por ejemplo, los puentes disulfuro son esenciales para una estructura y función apropiadas de insulina, inmunoglobulinas, protamina y similares. 50 Para una revisión reciente de la formación de enlaces disulfuro, véase Oka y Bulleid, "Forming disulfides in the endoplasmic reticulum," 1833(11) Biochim Biophys Acta 2425-9 (2013).
- Además de la formación de enlaces disulfuro, las proteínas pueden estar sometidas a otras modificaciones postraduccionales. Esas modificaciones incluyen lipidación (p. ej., miristoilación, palmitoilación, farnesoilación, geranilgeraniación y formación de anclajes de glicosilfosfatidilinositol (GPI)), alquilación (p. ej., metilación), acilación, amidación, glucosilación (p. ej., adición de grupos glucosilo en arginina, asparagina, cisteína, hidroxilisina, serina, treonina, tirosina y/o triptófano) y fosforilación (es decir, la adición de un grupo fosfato a serina, treonina, tirosina y/o histidina). Para una revisión reciente sobre la modificación postraduccional de las proteínas producidas en eucariotas, véanse Mowen y David, "Unconventional post-translational modifications in immunological signaling," 15(6) Nat Immunol 512-20 (2014); y Blixt y Westerlind, "Arraying the post-translational glycoproteome (PTG)," 18 Curr Opin Chem Biol. 62-9 (2014).
- 60 Los ejemplos de proteínas incluyen proteínas terapéuticas, proteínas recombinantes usadas en investigación o tratamiento, proteínas de retención y otras proteínas de fusión receptor-Fc, proteínas químéricas, anticuerpos, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanos, anticuerpos biespecíficos, fragmentos de anticuerpo, nanocuerpos,

quimeras de anticuerpos recombinantes, citocinas, quimiocinas, hormonas peptídicas y similares. Las proteínas pueden producirse usando sistemas de producción basados en células recombinantes, tales como el sistema de baculovirus de insectos, sistemas de levadura (p. ej., *Pichia* sp.), sistemas de mamíferos (p. ej., células CHO y derivados de CHO como células CHO-K1). Para una revisión reciente que analiza las proteínas terapéuticas y su producción, véase Ghaderi *et al.*, "Production platforms for biotherapeutic glycoproteins. Occurrence, impact, and challenges of non-human sialylation", 28 Biotechnol Genet Eng Rev. 147-75 (2012).

Como se usa en el presente documento, la expresión "proteína de unión a antígeno" indica cualquier proteína que se une a otra entidad molecular. La entidad molecular puede ser un péptido, polipéptido, proteína, epítopo, hanteno, antígeno o molécula biológica. Por ejemplo, una proteína de unión a antígeno incluye una molécula receptora que se une a un ligando, donde el ligando es el antígeno. Las proteínas de unión a antígeno incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos (p. ej., Fab), anticuerpos monocatenarios, moléculas scFv, proteínas recombinantes que comprenden receptores y partes de receptores, moléculas ligando, proteínas recombinantes que comprenden ligandos o partes de ligandos, moléculas recombinantes que comprenden múltiples receptores o fragmentos de receptores (p. ej., proteínas de fusión receptor-Fc) y similares.

"Anticuerpo" o "molécula de inmunoglobulina" es un subconjunto o subtipo de una proteína de unión a antígeno. La proteína de inmunoglobulina canónica (p. ej., IgG) comprende cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas mediante enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente 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 el presente documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco conservadas (FR, por sus siglas en inglés). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (las CDR de cadena pesada pueden abreviarse como HCDR1, HCDR2 y HCDR3; las CDR de cadena ligera pueden abreviarse como LCDR1, LCDR2 y LCDR3). Como se usa en el presente documento, "anticuerpo monoclonal" simplemente significa un anticuerpo de entidad molecular única, generalmente producido por clones de una célula precursora que produce un solo anticuerpo. Los anticuerpos monoclonales se distinguen de los anticuerpos policlonales por el hecho de que los anticuerpos policlonales representan una colección de anticuerpos producidos por diferentes células. Un anticuerpo monoclonal puede tener afinidad monovalente, lo que significa que ambas mitades del anticuerpo son idénticas y se unen al mismo epítopo, o afinidad bivalente, como en un "anticuerpo biespecífico", lo que significa que una mitad del anticuerpo se une a un epítopo diferente que la otra mitad del anticuerpo.

"Anticuerpo biespecífico" incluye cualquier anticuerpo que puede unirse selectivamente a dos o más epítopenos. Los anticuerpos biespecíficos comprenden en general dos cadenas pesadas diferentes, uniéndose de manera específica cada cadena pesada a un epítopo diferente, ya sea en dos moléculas diferentes (p. ej., antígenos) o en la misma molécula (p. ej., en el mismo antígeno). Si un anticuerpo biespecífico puede unirse selectivamente a dos epítopenos diferentes (un primer epítopo y un segundo epítopo), la afinidad de la primera cadena pesada por el primer epítopo en general será al menos de uno a dos o tres o cuatro órdenes de magnitud inferior a la afinidad de la primera cadena pesada por el segundo epítopo, y viceversa. Los epítopenos reconocidos por el anticuerpo biespecífico pueden estar en la misma diana o en una diferente (p. ej., en la misma proteína o en una diferente). Los anticuerpos biespecíficos pueden prepararse, por ejemplo, combinando cadenas pesadas que reconocen diferentes epítopenos del mismo antígeno. Por ejemplo, las secuencias de ácido nucleico que codifican secuencias variables de la cadena pesada que reconocen diferentes epítopenos del mismo antígeno pueden fusionarse con secuencias de ácido nucleico que codifican diferentes regiones constantes de la cadena pesada, y dichas secuencias pueden expresarse en una célula que expresa una cadena ligera de inmunoglobulina. Un anticuerpo biespecífico típico tiene dos cadenas pesadas teniendo cada una tres CDR de cadena pesada, seguidas de (extremo N a extremo C) un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, y una cadena ligera de inmunoglobulina que no confiere especificidad de unión a antígeno, pero que puede asociarse con cada cadena pesada, o que puede asociarse con cada cadena pesada y que puede unirse a uno o más de los epítopenos unidos por las regiones de unión a antígeno de la cadena pesada, o que puede asociarse con cada cadena pesada y posibilitar la unión de una o las dos cadenas pesadas a uno o dos epítopenos.

La expresión "cadena pesada", o "cadena pesada de inmunoglobulina" incluye una secuencia de la región constante de cadena pesada de inmunoglobulina de cualquier organismo y, salvo que se especifique de otro modo incluye un dominio variable de cadena pesada. Los dominios variables de cadena pesada incluyen tres CDR de cadena pesada y cuatro regiones FR, a menos que se indique lo contrario. Los fragmentos de cadenas pesadas incluyen CDR, CDR y FR, y combinaciones de las mismas. Una cadena pesada típica tiene, siguiendo el dominio variable (desde el extremo N al extremo C), un dominio CH1, una bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. Un fragmento funcional de una cadena pesada incluye un fragmento que es capaz de reconocer específicamente un antígeno (p. ej., reconocer el antígeno con una KD en el intervalo micromolar, nanomolar, o picomolar), que es capaz de expresarse y secretarse a partir de una célula, y que comprende al menos una CDR.

- La expresión "cadena ligera" incluye una secuencia de la región constante de cadena ligera de inmunoglobulina de cualquier organismo y, salvo que se especifique de otro modo, incluye las cadenas ligeras kappa y lambda humanas. Los dominios variables de la cadena ligera (VL) normalmente incluyen tres CDR de la cadena ligera y cuatro regiones marco (FR), a menos que se indique lo contrario. Generalmente, una cadena ligera de longitud completa incluye, 5 desde el extremo amino al extremo carboxilo, un dominio VL que incluye FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4, y un dominio constante de la cadena ligera. Las cadenas ligeras que se pueden usar con esta invención incluyen aquellas, p. ej., que no se unen selectivamente al primer o segundo antígeno unidos selectivamente por la proteína de unión a antígeno. Las cadenas ligeras adecuadas incluyen las que pueden identificarse explorando las cadenas ligeras empleadas más habitualmente en las bibliotecas de anticuerpos existentes (colecciones líquidas o *in silico*), donde las 10 cadenas ligeras no interfieren sustancialmente con la afinidad y/o selectividad de los dominios de unión a antígeno de las proteínas de unión a antígeno. Las cadenas ligeras adecuadas incluyen aquellas que pueden unirse a uno o ambos epítopos que se unen por las regiones de unión a antígeno de la proteína de unión a antígeno.
- La expresión "dominio variable" incluye una secuencia de aminoácidos de una cadena ligera o cadena pesada 15 (modificada según se deseé) de inmunoglobulina que comprende las siguientes regiones de aminoácidos, en secuencia, del extremo N al extremo C (salvo que se indique de otro modo): FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Un "dominio variable" incluye una secuencia de aminoácidos que puede plegarse en un dominio canónico (VH o VL) que tiene una estructura doble de lámina beta en donde las láminas beta están conectadas por un enlace disulfuro entre un resto de una primera lámina beta y una segunda lámina beta.
- 20 La expresión "región determinante de complementariedad", o el término "CDR", incluye una secuencia de aminoácidos codificada por una secuencia del ácido nucleico de los genes de la inmunoglobulina de un organismo que normalmente (es decir, en un animal de tipo silvestre) aparecen entre dos regiones marco en una región variable de una cadena ligera o una cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina (p. ej., un anticuerpo o un receptor de linfocitos T).
- 25 Una CDR puede estar codificada por, por ejemplo, una secuencia de la línea germinal o una secuencia reordenada o no reordenada, y, por ejemplo, por un linfocito B o un linfocito T no tratado o maduro. En algunas circunstancias (p. ej., para una CDR3), las CDR pueden estar codificadas por dos o más secuencias (p. ej., secuencias de la línea germinal) que no son contiguas (p. ej., en una secuencia del ácido nucleico no reordenada) pero son contiguas en una secuencia del ácido nucleico de un linfocito B, p. ej., como resultado de cortar y empalmar o de conectar las secuencias 30 (p. ej., recombinación V-D-J para formar una CDR3 de cadena pesada).
- Las proteínas que contienen Fc incluyen anticuerpos, anticuerpos biespecíficos, inmuñoadhesinas, "proteínas de fusión receptor-Fc" y otras proteínas de unión que comprenden al menos una porción funcional de una región CH2 y CH3 de inmunoglobulina. Una "porción funcional" se refiere a una región CH2 y CH3 que puede unirse a un receptor Fc (p. ej., un FcyR; o un FcRn, es decir, un receptor Fc neonatal) y/o que puede participar en la activación del complemento. Si la región CH2 y CH3 contiene eliminaciones, sustituciones y/o inserciones u otras modificaciones que lo hacen incapaz de unirse a ningún receptor Fc y también incapaz de activar el complemento, las regiones CH2 y CH3 no son funcionales.
- 40 Las proteínas que contienen Fc pueden comprender modificaciones en los dominios de inmunoglobulina, incluyendo donde las modificaciones afectan a una o más funciones efectoras de la proteína de unión (p. ej., modificaciones que afectan a la unión de FcyR, la unión a FcRn y, por tanto, la semivida, y/o actividad CDC). Dichas modificaciones incluyen, pero sin limitación, las siguientes modificaciones y combinaciones de las mismas, con referencia a la numeración EU de una región constante de inmunoglobulina: 238, 239, 248, 249, 250, 252, 254, 255, 256, 258, 265, 45 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 297, 298, 301, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 340, 342, 344, 356, 358, 359, 360, 361, 362, 373, 375, 376, 378, 380, 382, 383, 384, 386, 388, 389, 398, 414, 416, 419, 428, 430, 433, 434, 435, 437, 438, y 439.
- 50 Por ejemplo, y no a modo de limitación, la proteína de unión es una proteína que contiene Fc y muestra semivida en suero potenciada (en comparación con la misma proteína que contiene Fc sin la una o más modificaciones indicadas) y tiene una modificación en la posición 250 (p. ej., E o Q); 250 y 428 (p. ej., L o F); 252 (p. ej., L/Y/F/W o T), 254 (p. ej., S o T) y 256 (p. ej., S/R/Q/E/D o T); o una modificación en 428 y/o 433 (p. ej., L/R/S/I/P/Q o K) y/o 434 (p. ej., H/F o Y); o una modificación en 250 y/o 428; o una modificación en 307 o 308 (p. ej., 308F, V308F) y 434. En otro ejemplo, la modificación puede comprender una modificación en 428L (p. ej., M428L) y 434S (p. ej., N434S); una modificación en 428L, 2591 (p. ej., V259I) y 308F (p. ej., V308F); una modificación en 433K (p. ej., H433K) y una modificación en 434 (p. ej., 434Y); una modificación en 252, 254, y 256 (p. ej., 252Y, 254T y 256E); una modificación en 250Q y 428L (p. ej., T250Q y M428L); y una modificación en 307 y/o 308 (p. ej., 308F o 308P).
- 60 Algunas proteínas recombinantes que contienen Fc contienen receptores o fragmentos de receptores, ligandos o fragmentos de ligandos que tienen compañeros de unión afines en sistemas biológicos. Las "proteínas de fusión receptor-Fc" se refieren a moléculas recombinantes que contienen un receptor soluble fusionado a un dominio Fc de inmunoglobulina. Algunas proteínas de fusión receptor-Fc pueden contener dominios de unión a ligandos de múltiples receptores diferentes. Esas proteínas de fusión receptor-Fc se conocen como "atrapadores" o "moléculas atrapadoras". Rilonacept y afibbercept son ejemplos de atrapadores comercializados que antagonizan la IL1R (véase la patente de EE.UU. n.º 7.927.583) y el VEGF (véase la patente de EE.UU. n.º 7.087.411), respectivamente. Otras proteínas recombinantes que contienen Fc incluyen aquellas proteínas recombinantes que contienen un péptido

fusionado a un dominio Fc, por ejemplo, la tecnología MIMETIBODYTM de Centocor. Las proteínas recombinantes que contienen Fc se describen en C. Huang, "Receptor-Fc fusion therapeutics, traps, and MIMETIBODY technology," 20(6) Curr. Opin. Biotechnol. 692-9 (2009).

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "tonificante" o "agente tonificante" es una sustancia o combinación de sustancias que proporciona tonicidad u osmolalidad a una formulación o solución. La formulación puede requerir una osmolaridad fisiológica, que es aproximadamente 0,29 osmoles de soluto por kilogramo de disolvente (290 mOsm). Una formulación que tiene una osmolalidad fisiológica generalmente se denomina fisiológicamente isotónica. Una formulación puede tener una osmolalidad inferior a 290 mOsm (fisiológicamente hipotónica) o superior a 290 mOsm (fisiológicamente hipertónica). Se añade un tonificante a una formulación para ajustar la formulación a la tonicidad apropiada. El término "tonicidad" puede usarse indistintamente con osmolalidad u osmolaridad.

10 Los tonificantes incluyen sales, que se añaden para ajustar la fuerza iónica o la conductancia, y tonificantes no salinos. Las sales habitualmente utilizadas incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio y cloruro de calcio. Los tonificantes no salinos incluyen azúcares, alcoholes de azúcar, monosacáridos y disacáridos, ejemplos de los cuales incluyen sorbitol, manitol, sacarosa, trehalosa, glicerol, maltosa y lactosa.

15 Como se usa en el presente documento, el término "tensioactivo" indica un aditivo o excipiente que reduce la tensión superficial interfacial. Algunos tensioactivos tienen una porción lipófila y una porción hidrófila. Se cree que los tensioactivos proporcionan estabilidad adicional al reducir la interacción hidrófoba proteína-proteína y al dar como resultado especies de alto peso molecular (es decir, agregados). Se pueden incluir uno o más tensioactivos en soluciones que contienen proteínas, incluidos FDS, DP, soluciones de procesamiento y fabricación de proteínas y soluciones de ensayo de autoasociación de proteínas. Los tensioactivos pueden ser iónicos o no iónicos. Los tensioactivos no iónicos incluyen, p. ej., polímero de etileno de alquilo, poliglucósidos de alquilo (p. ej., glucósido de octilo y maltósido de decilo), alcoholes grasos tales como alcohol cetílico y alcohol oleílico, cocamida MEA, cocamida DEA y cocamida TEA. Los tensioactivos no iónicos específicos incluyen, p. ej., ésteres de polioxietilensorbitán (también conocidos como polisorbatos) tal como polisorbato 20, polisorbato 28, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 81 y polisorbato 85; poloxámeros tales como poloxámero 188, poloxámero 407; polietilen polipropilenglicol; o polietilenglicol (PEG). El polisorbato 20 también se conoce como TWEEN 20, 20 monolaurato de sorbitán y monolaurato de polioxietilensorbitán. El polisorbato 80 también se conoce como TWEEN 80, monooleato de sorbitán y monooleato de polioxietilensorbitán.

20 La cantidad de tensioactivo contenida en una solución que contiene proteínas puede variar dependiendo de las propiedades específicas y los propósitos deseados de la solución. En determinadas realizaciones, la solución puede 25 contener aproximadamente 0,001 % (p/v) a aproximadamente 0,5 % (p/v) de tensioactivo (p. ej., polisorbato 20 o polisorbato 80). Por ejemplo, la solución puede contener aproximadamente un 0,001 %; aproximadamente un 0,0015 %; aproximadamente un 0,002 %; aproximadamente un 0,0025 %; aproximadamente un 0,003 %; 30 aproximadamente un 0,0035 %; aproximadamente un 0,004 %; aproximadamente un 0,0045 %; aproximadamente un 0,005 %; aproximadamente un 0,0055 %; aproximadamente un 0,006 %; aproximadamente un 0,0065 %; 35 aproximadamente un 0,007 %; aproximadamente un 0,0075 %; aproximadamente un 0,008 %; aproximadamente un 0,0085 %; aproximadamente un 0,009 %; aproximadamente un 0,0095 %; aproximadamente un 0,01 %; 40 aproximadamente un 0,015 %; aproximadamente un 0,016 %; aproximadamente un 0,017 %; aproximadamente un 0,018 %; aproximadamente un 0,019 %; aproximadamente un 0,02 %; aproximadamente un 0,021 %; 45 aproximadamente un 0,022 %; aproximadamente un 0,023 %; aproximadamente un 0,024 %; aproximadamente un 0,025 %; aproximadamente un 0,026 %; aproximadamente un 0,027 %; aproximadamente un 0,028 %; 50 aproximadamente un 0,029 %; aproximadamente un 0,03 %; aproximadamente un 0,031 %; aproximadamente un 0,032 %; aproximadamente un 0,033 %; aproximadamente un 0,034 %; aproximadamente un 0,035 %; 55 aproximadamente un 0,036 %; aproximadamente un 0,037 %; aproximadamente un 0,038 %; aproximadamente un 0,039 %; aproximadamente un 0,04 %; aproximadamente un 0,041 %; aproximadamente un 0,042 %; 60 aproximadamente un 0,043 %; aproximadamente un 0,044 %; aproximadamente un 0,045 %; aproximadamente un 0,046 %; aproximadamente un 0,047 %; aproximadamente un 0,048 %; aproximadamente un 0,049 %; 65 aproximadamente un 0,05 %; aproximadamente un 0,051 %; aproximadamente un 0,052 %; aproximadamente un 0,053 %; aproximadamente un 0,054 %; aproximadamente un 0,055 %; aproximadamente un 0,056 %; 70 aproximadamente un 0,057 %; aproximadamente un 0,058 %; aproximadamente un 0,059 %; aproximadamente un 0,06 %; aproximadamente un 0,061 %; aproximadamente un 0,062 %; aproximadamente un 0,063 %; 75 aproximadamente un 0,064 %; aproximadamente un 0,065 %; aproximadamente un 0,066 %; aproximadamente un 0,067 %; 80 aproximadamente un 0,068 %; aproximadamente un 0,069 %; aproximadamente un 0,07 %; 85 aproximadamente un 0,071 %; aproximadamente un 0,072 %; aproximadamente un 0,073 %; aproximadamente un 0,074 %; 90 aproximadamente un 0,075 %; aproximadamente un 0,076 %; aproximadamente un 0,077 %; 95 aproximadamente un 0,078 %; aproximadamente un 0,079 %; aproximadamente un 0,08 %; aproximadamente un 0,081 %; 100 aproximadamente un 0,082 %; aproximadamente un 0,083 %; aproximadamente un 0,084 %; 105 aproximadamente un 0,085 %; aproximadamente un 0,086 %; aproximadamente un 0,087 %; aproximadamente un 0,088 %; 110 aproximadamente un 0,089 %; aproximadamente un 0,09 %; aproximadamente un 0,091 %; 115 aproximadamente un 0,092 %; aproximadamente un 0,093 %; aproximadamente un 0,094 %; aproximadamente un 0,095 %; 120 aproximadamente un 0,096 %; aproximadamente un 0,097 %; aproximadamente un 0,098 %; 125 aproximadamente un 0,099 %; aproximadamente un 0,10 %; aproximadamente un 0,15 %; 130 aproximadamente un

0,20 %; aproximadamente un 0,25 %; aproximadamente un 0,30 %; aproximadamente un 0,35 %; aproximadamente un 0,40 %; aproximadamente un 0,45 %; o aproximadamente un 0,50 % de tensioactivo (p. ej., polisorbato 20 o polisorbato 80).

- 5 Como se usa en el presente documento, el término "estabilizante" indica una molécula o compuesto, o una combinación de entidades químicas (es decir, más de una entidad química) que sirve para estabilizar la conformación natural de la proteína. Los estabilizantes estabilizan las proteínas en solución mediante uno o más de los siguientes mecanismos: (1) aumento de la tensión superficial del agua, (2) exclusión proteína-excipiente que forma una capa de agua alrededor de la proteína, (3) interacción de enlace peptídico negativo y (4) interacción repulsiva con la superficie 10 de la proteína. Independientemente del mecanismo específico, los estabilizantes se excluyen preferentemente de la superficie de la proteína, enriqueciendo así el agua en la superficie de la proteína. Además, la interacción desfavorable proteína-excipiente hace que el despliegamiento de la proteína sea termodinámicamente desfavorable, ya que el área 15 de la superficie de la proteína aumenta durante la desnaturización. Los estabilizantes incluyen, p. ej., polioles, azúcares, aminoácidos, sales de precipitación, o cualquier combinación de los mismos. Ejemplos de estabilizantes útiles incluyen polietilenglicol, sorbitol, glicerol, manitol, trehalosa, sacarosa, arginina, alanina, prolina, glicina, cloruro de sodio o cualquier combinación de los mismos. La sacarosa y la trehalosa son los azúcares utilizados más frecuentemente.

También se divultan los siguientes elementos:

- 20 Elemento 1. Un método para determinar la capacidad de una proteína para autoasociarse, comprendiendo el método:
- 25 a. combinar una proteína, una nanopartícula y una sal tamponada para formar una muestra;
- 30 b. excitar la muestra con luz;
- 35 c. medir la luz transmitida a través de la muestra;
- 40 d. calcular la relación de intensidad de la absorbancia de la muestra,
- 45 en donde la proteína es estable a alta concentración cuando la relación de intensidad de la absorbancia excede un valor umbral.
- 50 Elemento 2. El método del elemento 1, en donde la proteína es una proteína de unión a antígeno.
- Elemento 3. El método del elemento 2, en donde la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o una proteína de fusión receptor-Fc.
- Elemento 4. El método del elemento 3, en donde la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal humano.
- Elemento 5. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, en donde la proteína está en la muestra a una concentración de aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 512 µg/ml.
- Elemento 6. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, en donde la nanopartícula es una nanopartícula de oro.
- Elemento 7. El método del elemento 6, en donde la nanopartícula de oro tiene un diámetro de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 100 nm.
- Elemento 8. El método del elemento 7, en donde el diámetro de la nanopartícula de oro es de aproximadamente 20 nm.
- Elemento 9. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, en donde la muestra comprende de aproximadamente 5×10^{11} a aproximadamente 8×10^{11} nanopartículas por ml.
- Elemento 10. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, en donde la muestra comprende aproximadamente $6-6,5 \times 10^{11}$ nanopartículas por ml.
- Elemento 11. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, en donde la sal está presente en la muestra a una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 250 mM.
- Elemento 12. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, en donde la sal es cloruro de sodio.

- Elemento 13. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, en donde la concentración de la sal es de aproximadamente 2 mM, aproximadamente 20 mM o aproximadamente 200 mM.
- 5 Elemento 14. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, en donde la luz transmitida se mide a múltiples longitudes de onda que varían de aproximadamente 450 nm a aproximadamente 750 nm.
- Elemento 15. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, en donde la relación de intensidad de la absorbancia es la relación de la absorbancia máxima respecto a la absorbancia inicial.
- 10 Elemento 16. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, en donde el valor umbral de la relación de intensidad de la absorbancia es de aproximadamente 1,7.
- Elemento 17. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, que comprende, además, la repetición de las etapas (a) - (d) usando una concentración diferente de proteína en la muestra.
- 15 15 Elemento 18. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, que comprende, además, la repetición de las etapas (a) - (d) usando una concentración diferente de sal en la muestra.
- Elemento 19. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, que comprende, además, la repetición de las etapas (a) - (d) usando un pH diferente de la muestra.
- 20 Elemento 20. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, que comprende, además: e. combinar la proteína altamente soluble a una alta concentración con un excipiente para formar una sustancia farmacéutica formulada.
- 25 Elemento 21. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, en donde la concentración de la proteína es de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml.
- Elemento 22. El método de acuerdo con cualquiera de los elementos 20 o 21, en donde el excipiente se selecciona del grupo que consiste en un tonificante, un tampón, un tensioactivo, un estabilizante y una combinación de los mismos.
- 30 Elemento 23. El método del elemento 22, en donde el tonificante es una sal.
- Elemento 24. El método de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores, en donde la sal es NaCl.
- Elemento 25. Una composición que comprende un fármaco bioterapéutico obtenible mediante el método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores.
- 40 Elemento 26. La composición de acuerdo con el elemento 25, en donde no más de aproximadamente un 10 % de la especie de fármaco bioterapéutico total está presente como agregado irreversible a la concentración del fármaco bioterapéutico.
- 45 Elemento 27. La composición de acuerdo con cualquiera de los elementos 25-26, en donde la composición es tal que el valor umbral se encuentra en un intervalo de, por ejemplo, aproximadamente 1,5 a aproximadamente 2,0 ($A_{máxima}/A_{450}$).
- 50 Elemento 28. La composición de acuerdo con cualquiera de los elementos 25-27, en donde el valor umbral se encuentra en un intervalo de aproximadamente 0,7 a aproximadamente 1,0 ($A_{máxima}/A_{control}$).
- Elemento 29. La composición de acuerdo con cualquiera de los elementos 25-28, en donde la concentración del fármaco biofarmacéutico se encuentra en un intervalo de, por ejemplo, aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml o de aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml.
- 55 Elemento 30. Una composición obtenible de acuerdo con cualquiera de los elementos 25-29 para su uso en medicina.
- 60 Elemento 31. Un método de acuerdo con cualquiera de los elementos 1-24 para preparar una composición que comprende un fármaco biofarmacéutico, en donde la composición tiene una viscosidad de aproximadamente 10-10.000 mPa·s, aproximadamente 20-9000 mPa·s, aproximadamente 30-8000 mPa·s, aproximadamente 40-7000 mPa·s, aproximadamente 50-6000 mPa·s, aproximadamente 70-5000 mPa·s, aproximadamente 90-4000 mPa·s, aproximadamente 100-3000 mPa·s o aproximadamente 10 mPa·s, o aproximadamente 20 mPa·s, o aproximadamente 30 mPa·s, o aproximadamente 40 mPa·s, o aproximadamente 50 mPa·s o, como alternativa, de aproximadamente 1 mPa·s a aproximadamente 20 mPa·s, aproximadamente 2 mPa·s, aproximadamente 3 mPa·s, aproximadamente 4 mPa·s, aproximadamente 5 mPa·s, aproximadamente 6 mPa·s, aproximadamente 7

mPa•s, aproximadamente 10 mPa•s, 13 mPa•s, 15 mPa•s o aproximadamente 20 mPa•s.

5 Elemento 32. El método de acuerdo con el elemento 31, en donde el fármaco biofarmacéutico es una o más proteínas o uno o más anticuerpos o cualquier mezcla de los mismos.

Elemento 33. El método de acuerdo con cualquiera de los elementos 31-32, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal, o un anticuerpo policlonal o una combinación de los mismos.

10 Elemento 34. Una mezcla bioanalítica que comprende:

- 10 a. al menos dos nanopartículas;
- b. una proteína en al menos dos fases; y
- c. una sal o un tampón.

15 Elemento 35. La mezcla bioanalítica del elemento 34, en donde la primera de las al menos dos fases de la proteína es una fase soluble.

20 Elemento 36. La mezcla bioanalítica del elemento 34 o 35, en donde la segunda de las al menos dos fases de la proteína es una fase adherente, en donde la proteína se adhiere a la superficie de cada una de las al menos dos nanopartículas.

25 Elemento 37. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 36, en donde la tercera de las al menos dos fases de la proteína es una fase agregada, en donde la proteína se autoasocia para formar un agregado.

30 Elemento 38. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 37, en donde una o más de la proteína agregada también se adhiere a la superficie de una nanopartícula.

35 Elemento 39. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 38, en donde cada una de las al menos dos nanopartículas comprende oro.

Elemento 40. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 39, en donde 35 cada una de las al menos dos nanopartículas comprende un diámetro de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 100 nm.

40 Elemento 41. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 40, en donde el diámetro es de aproximadamente 20 nm.

Elemento 42. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 41, en donde 45 cada una de las al menos dos nanopartículas está saturada con la proteína.

Elemento 43. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 42, en donde las nanopartículas están presentes a una densidad de aproximadamente 6×10^{11} a aproximadamente 7×10^{11} nanopartículas por mililitro de mezcla.

50 Elemento 44. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 43, en donde la proteína está presente a una concentración de aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 512 µg/ml.

Elemento 45. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 44, en donde 55 la proteína es una proteína de unión a antígeno.

Elemento 46. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 45, en donde la proteína de unión a antígeno se selecciona del grupo que consiste en anticuerpo, fragmento de anticuerpo, aptámero y proteína de fusión receptor-Fc.

Elemento 47. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 46, en donde 60 la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo.

Elemento 48. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 47, en donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano.

65 Elemento 49. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 48, en donde la sal está presente a una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 300 mM.

Elemento 50. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 49, en donde la sal está presente a una concentración de aproximadamente 2 mM, aproximadamente 20 mM o aproximadamente 200 mM.

- 5 Elemento 51. La mezcla bioanalítica de acuerdo con uno cualquiera de los elementos anteriores 34 a 50, en donde la sal comprende NaCl.

Ejemplos

- 10 Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente los métodos de la presente invención. Estos ejemplos son ilustrativos únicamente y no pretenden limitar el alcance de la invención de ninguna manera.

Ejemplo 1: Materiales

- 15 Los anticuerpos monoclonales (mAb, por sus siglas en inglés) se produjeron mediante células EESYR® y se purificaron mediante cromatografía con proteína A y una etapa de pulido de intercambio aniónico o cromatografía de interacción hidrófoba. Los componentes del tampón se obtuvieron de Sigma-Aldrich, VWR o JT-Baker y eran el grado más alto disponible. Las columnas Illustra NAP (n.º de cat. 17-0853-02) y una columna Superdex de 200 pg XK26/100 (n.º de cat. 90-1002-73) se adquirieron de GE Healthcare Life Sciences. Las unidades de filtro centrífugo Amicon (n.º de cat. UFC905024) se adquirieron de EMD Millipore. Los casetes de diáisisis Slide-A-LyzerTM G2 (n.º de catálogo 87732) se adquirieron de ThermoFisher Scientific. Las nanopartículas de oro de 20 nm (n.º de cat. HD.GC20) se adquirieron de BBI solutions. Se utilizaron microplacas de 96 pocillos NuncTM MicrowellTM de Thermo ScientificTM (n.º de cat. 12-565-66) como el recipiente de reacción para adquirir los espectros de absorbancia.
- 20

- 25 **Ejemplo 2: Dispersión de luz estática de alta concentración (HC-SLS).**

Los anticuerpos monoclonales concentrados (100 g/l) (mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5 y mAb6) se purificaron cada uno en un Akta avant (GE Healthcare Life Sciences) a través de una columna Superdex XK26/100 de 200 pg en MES 10 mM, pH 6,0, cloruro de sodio 50 mM. La fracción de monómero mAb se recogió y se concentró usando una bomba Easy-Load MAsterFlex L/S (Cole Parmer) en tandem con una membrana VivaFlow 200 con 30.000 MWCO HY. Se dividieron 150 ml de cada anticuerpo concentrado en 3 fracciones y se cargaron en un casete de diáisisis de MWCO 10.000 y se intercambiaron por 2 l de MES 10 mM pH 6,0, cloruro de sodio 250 mM; MES 10 mM pH 6,0, cloruro de sodio 50 mM; y MES 10 mM pH 6,0, soluciones de cloruro de sodio 10 mM. Las soluciones se concentraron, utilizando una unidad de filtro centrífugo con 50.000 MWCO, hasta un volumen final de aproximadamente 15 ml en sus tampones correspondientes. Las concentraciones se midieron usando un SoloVPE (C Technologies, Inc.). El anticuerpo no se pudo concentrar más allá de los 60 g/l nominalmente en MES 10 mM pH 6,0, cloruro de sodio 10 mM. Las otras dos concentraciones de sal (cloruro de sodio 250 mM y 50 mM) se ajustaron a 80 g/l nominalmente. Se tomó una alícuota de las tres condiciones y se diluyeron a 10 g/l. Una muestra de 80 g/l, 10 g/l y tampón se fijaron a un dispositivo CG-MALS (Wyatt Technology) y se midió la señal de dispersión de la luz en función de la concentración de mAb.

- 40 **Ejemplo 3: Espectroscopía de autointeracción de nanopartículas (SINS) convencional.**

Una subalícuota de cada anticuerpo (mAb1, mAb2, mAb3, mAb4, mAb5 y mAb6) en una condición de sal diferente a un tubo falcon de 15 ml separado. Se añadieron a la solución, 5 ml de densidad óptica uno (1 DO) de una solución de nanopartículas de oro de 20 nm de modo que la concentración de proteínas final resultante fuera de 50 µg/ml. Los espectros de absorbancia y la $\lambda_{\text{máx}}$ se registraron en un SPECTRAmax 340PC (Molecular Devices) después de esperar 30 minutos.

50 Espectroscopía de autointeracción de nanopartículas dependiente de la concentración (CD-SINS). Se prepararon soluciones tampón 100 mM al pH apropiado. Las columnas Illustra NAP se acondicionaron con 2,4 ml de la solución tampón 100 mM (p. ej. MES o fosfato de sodio dependiendo del pH objetivo). Las soluciones madre de mAb concentradas (50-75 g/l) se intercambiaron con tampón usando la columna de desalación acondicionada. La concentración resultante se midió usando un SoloVPE. Cada anticuerpo se diluyó posteriormente a 5,12 mg/ml en tampón 100 mM. A continuación, se añadió el mAb a la columna 1 de la placa de micropocillos y se diluyó en serie en tampón 100 mM hasta 0,04 mg/ml. Se añadieron 80 µl de nanopartículas de oro a las columnas 2, 3 y 4 de la placa de 96 micropocillos. Se añadieron 40 µl del mAb diluido en serie a cada columna, usando una pipeta multicanal, que contenía las nanopartículas de oro manteniendo la dilución en serie a partir de 1,280 ml de columna de sal de cloruro de sodio 357 mM, 71 mM y 14 mM, posteriormente se añadió la solución madre, usando una pipeta multicanal, a las columnas 2, 3 y 4 respectivamente. Se dejó que la solución resultante se equilibrara durante 30 minutos antes de que se registraran los espectros de absorbancia en un SPECTRAmax 340PC. La intensidad máxima de absorbancia se normalizó con respecto a la absorbancia a 450 nm. Esta relación se representa gráficamente en función de la concentración final del anticuerpo.

Ejemplo 4: Estabilidad coloidal dinámica de la albúmina de suero humana (HSA)

- 65 Se combinaron nanopartículas de oro de 20 nm a aproximadamente $6,3 \times 10^{11}$ partículas por mililitro con diversas

concentraciones de albúmina de suero humano (HAS) en tampón MES 10 mM a NaCl 2 mM, NaCl 20 mM, o NaCl 200 mM, pH 6. Las muestras individuales que contenían 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml y 400 µg/ml se sometieron a espectroscopía de absorbancia. Se representaron gráficamente esos espectrogramas (la figura 4, representa los espectros para las muestras de NaCl 200 mM) y se calculó la relación de intensidad de la absorbancia a la absorbancia máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) y la absorbancia inicial a 450 nm se calculó para cada concentración de proteína y se representó gráficamente (figura 5).

HSA muestra una relación de intensidad de la absorbancia superior a 1,7 ($A_{\text{máxima}}/A_{450}$) para todas las fuerzas iónicas y a las concentraciones de proteína más altas, indicando un perfil de interacción coloidal dinámica favorable. Los experimentos de dispersión de luz estática muestran viriales positivos (A_2) en total concordancia con el perfil CD-SINS (tabla 2).

Tabla 2

NaCl mM	SLS (A_2)
2	1,17E-4
20	9,68E-5
120	7,85E-5

15 Ejemplo 5: Anticuerpo monoclonal n.º 1 (mAb1)

Se combinaron nanopartículas de oro de 20 nm a aproximadamente $6,3 \times 10^{11}$ partículas por mililitro con diversas concentraciones de mAb 1 humano en tampón MES 10 mM a NaCl 2 mM, NaCl 20 mM, o NaCl 200 mM, pH 6. Las muestras individuales que contenían 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml y 400 µg/ml se sometieron a espectroscopía de absorbancia. Se representaron gráficamente esos espectrogramas y se calculó la relación de intensidad de la absorbancia a la absorbancia máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) y la absorbancia inicial a 450 nm para cada concentración de proteína y se representó gráficamente (figura 6).

El mAb1 muestra una relación de intensidad de la absorbancia superior a 1,7 ($A_{\text{máxima}}/A_{450}$) para todas las fuerzas iónicas y a las concentraciones de proteína más altas, indicando un perfil de interacción coloidal dinámica favorable. Los experimentos de dispersión de luz estática de alta concentración muestran viriales positivos (A_2) en total concordancia con el perfil CD-SINS (tabla 3, figura 7).

Tabla 3

NaCl mM	SLS (A_2)
2	1,72E-4
20	6,70E-5
200	1,34E-5

30 Ejemplo 6: Anticuerpo monoclonal n.º 6 (mAb6)

Se combinaron nanopartículas de oro de 20 nm a aproximadamente $6,3 \times 10^{11}$ partículas por mililitro con diversas concentraciones de mAb6 humano en tampón MES 10 mM a NaCl 2 mM, NaCl 20 mM, o NaCl 200 mM, pH 6. Las muestras individuales que contenían 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml y 400 µg/ml se sometieron a espectroscopía de absorbancia. Se representaron gráficamente esos espectrogramas y se calculó la relación de intensidad de la absorbancia a la absorbancia máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) y la absorbancia inicial a 450 nm para cada concentración de proteína y se representó gráficamente (figura 8).

40 El mAb6 muestra una relación de intensidad de la absorbancia superior a 1,7 ($A_{\text{máxima}}/A_{450}$) a las fuerzas iónicas más bajas y a las concentraciones de proteína más altas, indicando un perfil de interacción coloidal dinámica favorable en esas condiciones. El mAb6 muestra un aumento de interacciones atractivas al aumentar las fuerzas iónicas. Los experimentos de dispersión de luz estática de alta concentración muestran viriales variables (A_2) en total concordancia con el perfil CD-SINS (figura 9).

45 Ejemplo 7: Anticuerpo monoclonal n.º 2 (mAb2)

Se combinaron nanopartículas de oro de 20 nm a aproximadamente $6,3 \times 10^{11}$ partículas por mililitro con diversas concentraciones de mAb2 humano en tampón MES 10 mM a NaCl 2 mM, NaCl 20 mM, o NaCl 200 mM, pH 6. Las muestras individuales que contenían 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml y 400 µg/ml se sometieron a espectroscopía de absorbancia. Se representaron gráficamente esos espectrogramas y se calculó la relación de intensidad de la absorbancia a la absorbancia máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) y la absorbancia inicial a 450 nm para cada concentración de proteína y se representó gráficamente (figura 2).

55 El mAb2 muestra cambios profundos en las interacciones proteicas netas en condiciones variables. A baja fuerza iónica, mAb2 muestra un aumento en las interacciones atractivas. La molécula se vuelve repulsiva en general a medida que aumenta la fuerza iónica. A NaCl 200 mM, el anticuerpo tiene una estabilidad coloidal favorable. Los experimentos

de dispersión de luz estática de alta concentración muestran viriales variables (A_2) en total concordancia con las longitudes de onda de SINS convencional de máxima absorbancia (tabla 1).

Ejemplo 8: Anticuerpo monoclonal n.º 3 (mAb3)

Se combinaron nanopartículas de oro de 20 nm a aproximadamente $6,3 \times 10^{11}$ partículas por mililitro con diversas concentraciones de mAb3 humano en tampón MES 10 mM a NaCl 2 mM, NaCl 20 mM, o NaCl 200 mM, pH 6. Las muestras individuales que contenían 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml y 400 µg/ml se sometieron a espectroscopía de absorbancia. Se representaron gráficamente esos espectrogramas y se calculó la relación de intensidad de la absorbancia a la absorbancia máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) y la absorbancia inicial a 450 nm para cada concentración de proteína y se representó gráficamente (figura 10).

El mAb3 es un ejemplo de una proteína coloidalmente inestable que presagia una formulación y fabricación a alta concentración problemáticas. En todas las fuerzas iónicas y concentraciones de proteínas, mAb3 muestra interacciones atractivas. Los experimentos de dispersión de luz estática de alta concentración muestran viriales negativos (A_2) en total concordancia con las longitudes de onda de SINS convencional de máxima absorbancia (tabla 1).

Ejemplo 9: Anticuerpo monoclonal n.º 4 (mAb4)

Se combinaron nanopartículas de oro de 20 nm a aproximadamente $6,3 \times 10^{11}$ partículas por mililitro con diversas concentraciones de mAb4 humano en tampón MES 10 mM a NaCl 2 mM, NaCl 20 mM, o NaCl 200 mM, pH 6. Las muestras individuales que contenían 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml y 400 µg/ml se sometieron a espectroscopía de absorbancia. Se representaron gráficamente esos espectrogramas y se calculó la relación de intensidad de la absorbancia a la absorbancia máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) y la absorbancia inicial a 450 nm para cada concentración de proteína y se representó gráficamente (figura 11).

El mAb4 es un ejemplo de una proteína coloidalmente estable a fuerzas iónicas más bajas, pero que muestra menos solubilidad a mayor concentración de proteína en baja fuerza iónica. Los experimentos de dispersión de luz estática, que representan viriales mixtos (negativo a menor fuerza iónica, positivo a alta fuerza iónica), muestran discrepancias con los datos generados por CD-SINS, que muestra un perfil repulsivo para mAb4 (tabla 1).

Ejemplo 10: Anticuerpo monoclonal n.º 5 (mAb5)

Se combinaron nanopartículas de oro de 20 nm a aproximadamente $6,3 \times 10^{11}$ partículas por mililitro con diversas concentraciones de mAb5 humano en tampón MES 10 mM a NaCl 2 mM, NaCl 20 mM, o NaCl 200 mM, pH 6. Las muestras individuales que contenían 3,125 µg/ml, 6,25 µg/ml, 12,5 µg/ml, 25 µg/ml, 50 µg/ml, 100 µg/ml, 200 µg/ml y 400 µg/ml se sometieron a espectroscopía de absorbancia. Se representaron gráficamente esos espectrogramas y se calculó la relación de intensidad de la absorbancia a la absorbancia máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) y la absorbancia inicial a 450 nm para cada concentración de proteína y se representó gráficamente (figura 12).

El mAb5 es un ejemplo de una proteína coloidalmente mixta que es atractiva en fuerza iónica baja y muestra una mejora en el comportamiento a alta concentración de proteína al aumentar la fuerza iónica. Los experimentos de dispersión de luz estática, que representan solo viriales negativos, muestran discrepancias con los datos generados por CD-SINS, que muestra un perfil mixto para mAb4 (tabla 1).

Ejemplo 11: Exploración y selección de excipientes

Se usó un anticuerpo formulado de alta viscosidad que tenía un perfil de interacción coloidal dinámica desfavorable en algunas condiciones de formulación (mAb7) para explorar excipientes adicionales para determinar su capacidad para mejorar el perfil CG-SINS del anticuerpo. El perfil CG-SINS del anticuerpo monoclonal 7 (mAb7) formulado en varias soluciones que contenían diferentes tampones y fuerzas iónicas (figura 13), y excipientes de azúcares y/o aminoácidos (figura 14) permanecieron por debajo del valor umbral de absorbancia_{máx}/absorbancia₀ favorable para la dispensación a alta concentración (p. ej., por debajo de 1,7). La viscosidad de mAb7 formulado a aproximadamente 100 mg/ml se observó a ~ 100 mPa.s (100 cP).

El ensayo CD-SINS se utilizó para explorar el efecto estabilizante coloidal de varios compuestos de benzoato sustituidos en mAb7. Los ácidos benzoicos sustituidos incluyen ácido m-hidroxibenzoico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido m-metilbenzoico, ácido p-metilbenzoico, ácido metilbenzoico, ácido p-etilbenzoico, ácido m-aminobenzoico, ácido p-aminobenzoico, un ácido sulfónico y un benzoato de amonio. La Figura 15 representa el gráfico de dispersión de la relación de absorbancia CD-SINS de mAb7 formulado con cada uno de los ácidos benzoicos sustituidos. Cuando se combinó el ácido p-aminobenzoico (PABA, círculos abiertos en la fig. 15) con el mAb7 formulado, el mAb7 mostró una estabilidad coloidal favorable como se demuestra por las relaciones de absorbancia por encima del valor umbral favorable para la dispersión a alta concentración, es decir, > 1,6 o 1,7 como se representa en la figura 15.

Se combinó PABA de una manera dependiente de la dosis con mAb7 y se sometió a análisis CD-SINS. La inclusión

de PABA > 12 mM (p. ej., PABA 18 mM, 24 mM, 30 mM y 36 mM PABA) con mAb7 produjo un perfil de interacción coloidal favorable (es decir, repulsivo) (figura 16). El efecto de PABA sobre el perfil de interacción coloidal de mAb7 pareció saturarse a aproximadamente PABA 20 mM.

- 5 Se combinó PABA 20 mM con 5 g/l, 10 g/l, 30 g/l, 50 g/l, 70 g/l y 80 g/l de mAb7 y se sometió a análisis viscosimétrico utilizando el método de cono y placa utilizando un reómetro torsional (Pathak *et al.*, Biophys. J. 104(4): 913-923, 19 de febrero de 2013). Los resultados se representan en la figura 17. La extrapolación de esos resultados a 100 g/l de mAb7 utilizando el algoritmo de Krieger-Dougherty (véase, p. ej., Lukham y Ukeje, J. Colloid Interface Sci., 220(2): 347-356, 15 de diciembre de 1999) mostró una reducción de aproximadamente tres veces en la viscosidad de cizalla constante en aquellas formulaciones de mAb7 que contenían PABA 20 mM.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Un método para determinar la capacidad de una proteína para autoasociarse, comprendiendo el método:
 - 5 a. combinar una proteína, una nanopartícula de oro y una sal tamponada para formar una muestra, en donde la sal tamponada es un tampón y una sal o una sal que también es un tampón;
 - b. excitar la muestra con luz;
 - c. medir la luz transmitida a través de la muestra a múltiples longitudes de onda que varían desde aproximadamente 450 nm hasta aproximadamente 750 nm;
 - 10 d. calcular la relación de intensidad de la absorbancia de la muestra, en donde la relación de intensidad de la absorbancia es la intensidad de la absorbancia a la longitud de onda de absorbancia máxima ($A_{máxima}$) de la muestra dividida por la intensidad de la absorbancia a 450 nm (A_{450} o $A_{inicial}$), en donde la proteína es estable a alta concentración cuando la relación de intensidad de la absorbancia es superior a 1,7, y
- 15 en donde el método comprende, además, la repetición de las etapas (a) - (d) al menos una vez más usando una fuerza iónica diferente.
2. El método de la reivindicación 1, en donde:
 - 20 (i) la proteína es una proteína de fusión receptor-Fc o una proteína de unión a antígeno, preferentemente en donde la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo o una proteína de fusión receptor-Fc, más preferentemente en donde la proteína de unión a antígeno es un anticuerpo monoclonal humano;
 - (ii) la proteína está a una concentración baja cuando está presente en la muestra a una concentración de aproximadamente 2 µg/ml a aproximadamente 512 µg/ml;
 - 25 (iii) la nanopartícula de oro tiene un diámetro de aproximadamente 20 nm a aproximadamente 100 nm, más preferentemente en donde el diámetro de la nanopartícula de oro es de aproximadamente 20 nm; o
 - (iv) la muestra comprende aproximadamente 5×10^{11} a aproximadamente 8×10^{11} nanopartículas por ml, preferentemente en donde la muestra comprende aproximadamente $6-6.5 \times 10^{11}$ nanopartículas por ml;
 - 30 (v) la sal de la sal tamponada está presente en la muestra a una concentración de aproximadamente 2 mM a aproximadamente 250 mM, preferentemente en donde la sal es cloruro de sodio, más preferentemente en donde la concentración de sal es de aproximadamente 2 mM, aproximadamente 20 mM o aproximadamente 200 mM.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, que comprende, además:
 - 35 (i) repetir las etapas (a) - (d) usando una concentración de proteína en la muestra diferente;
 - (ii) repetir las etapas (a) - (d) usando una concentración de sal en la muestra diferente; y/o
 - (iii) repetir las etapas (a) - (d) usando un pH de la muestra diferente.
4. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que comprende, además:
 - 40 e. combinar la proteína a una concentración alta con un excipiente para formar una sustancia farmacéutica formulada.
5. El método de la reivindicación 4, en donde la proteína está a una concentración alta cuando está a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml.
- 45 6. El método de la reivindicación 5, en donde el excipiente se selecciona del grupo que consiste en un tonificante, un tampón, un tensioactivo, un estabilizante y una combinación de los mismos, preferentemente en donde el tonificante es una sal, más preferentemente en donde la sal es NaCl.
7. El método de la reivindicación 1, en donde la proteína es una proteína de fusión receptor-Fc.
- 50 8. El método de la reivindicación 7, en donde la proteína de fusión receptor-Fc es afibercept.
9. Un método para preparar una formulación farmacéutica de baja viscosidad que contiene una proteína, comprendiendo el método:
 - 55 a. determinar la capacidad de la proteína para autoasociarse de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8;
 - b. combinar un excipiente reductor de la viscosidad con la proteína;
 - c. determinar la capacidad de la proteína para autoasociarse de acuerdo con el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8 en presencia del excipiente reductor de la viscosidad; y
 - 60 d. formular la proteína con el excipiente reductor de la viscosidad a un nivel que reduce la viscosidad de la solución de proteína en al menos un 50 % que sin el excipiente reductor de la viscosidad.
- 65 10. El método de la reivindicación 9, en donde el excipiente reductor de la viscosidad es ácido paraaminobenzoico (PABA).

11. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la proteína es estable de tal manera que retiene un 90 % o más de su estructura natural a una concentración alta cuando la relación de intensidad de la absorbancia excede 1,7.
- 5 12. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la proteína está presente en la muestra a una concentración superior a una concentración mínima necesaria para cubrir completamente las nanopartículas de oro.
- 10 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la proteína está a una concentración alta cuando está presente en la muestra a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml.

FIGURA 1

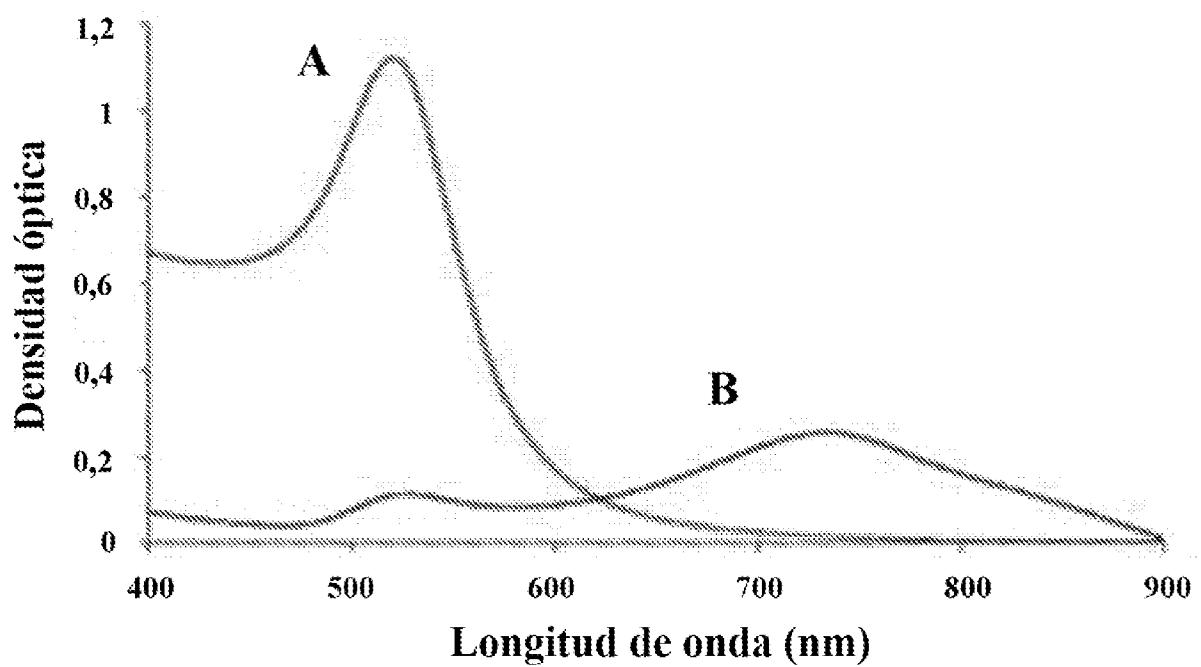


FIGURA 2

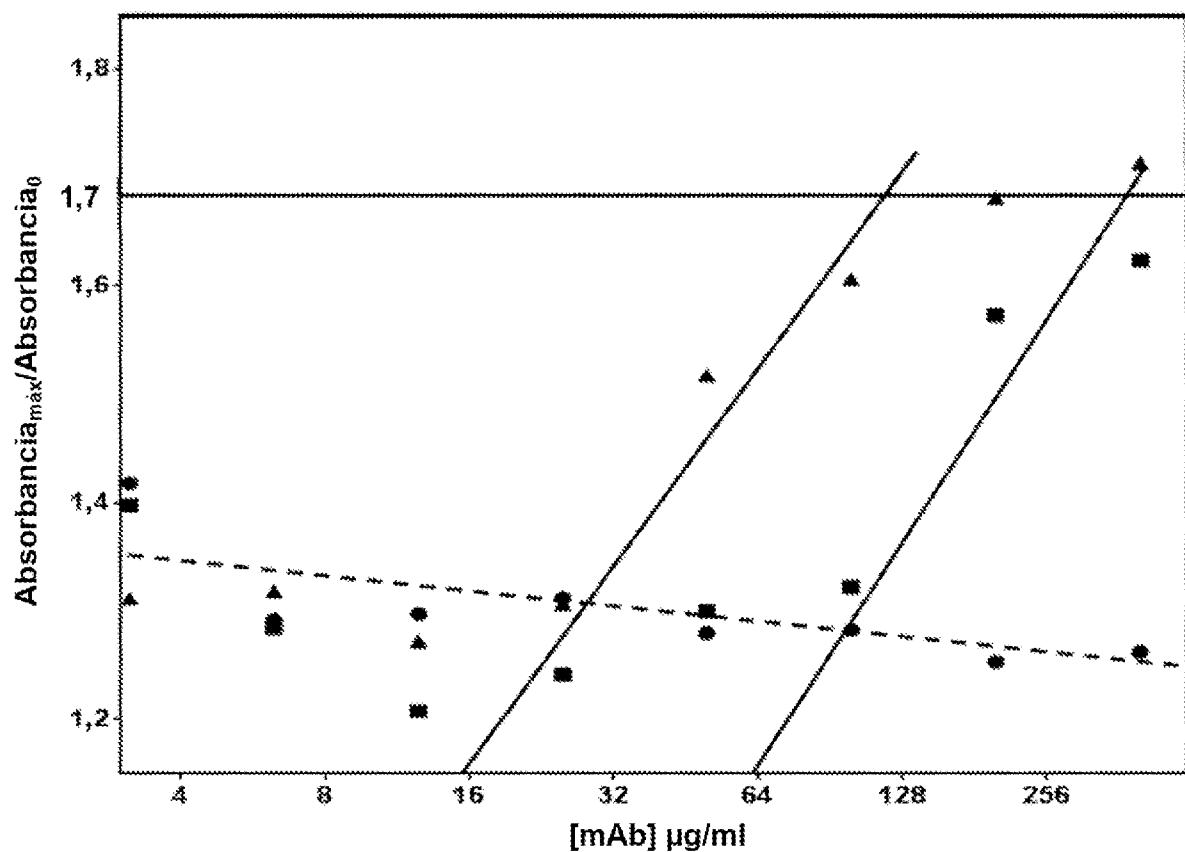


FIGURA 3

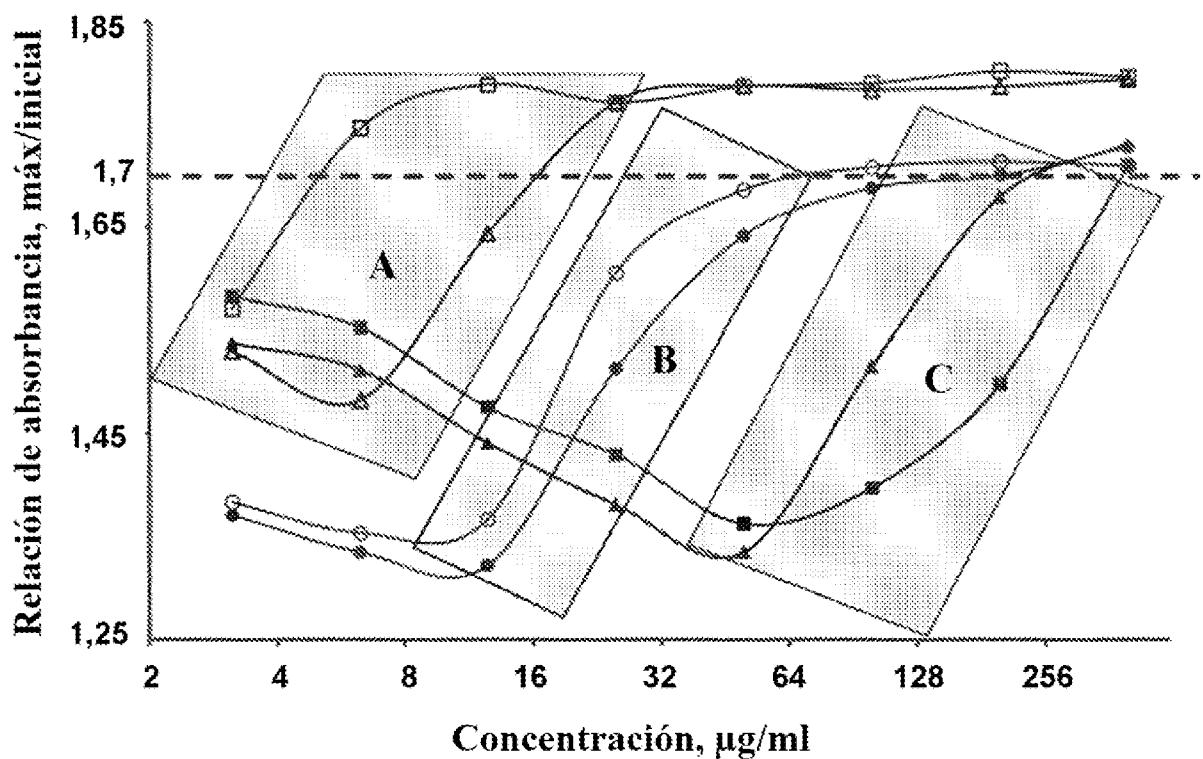


FIGURA 4

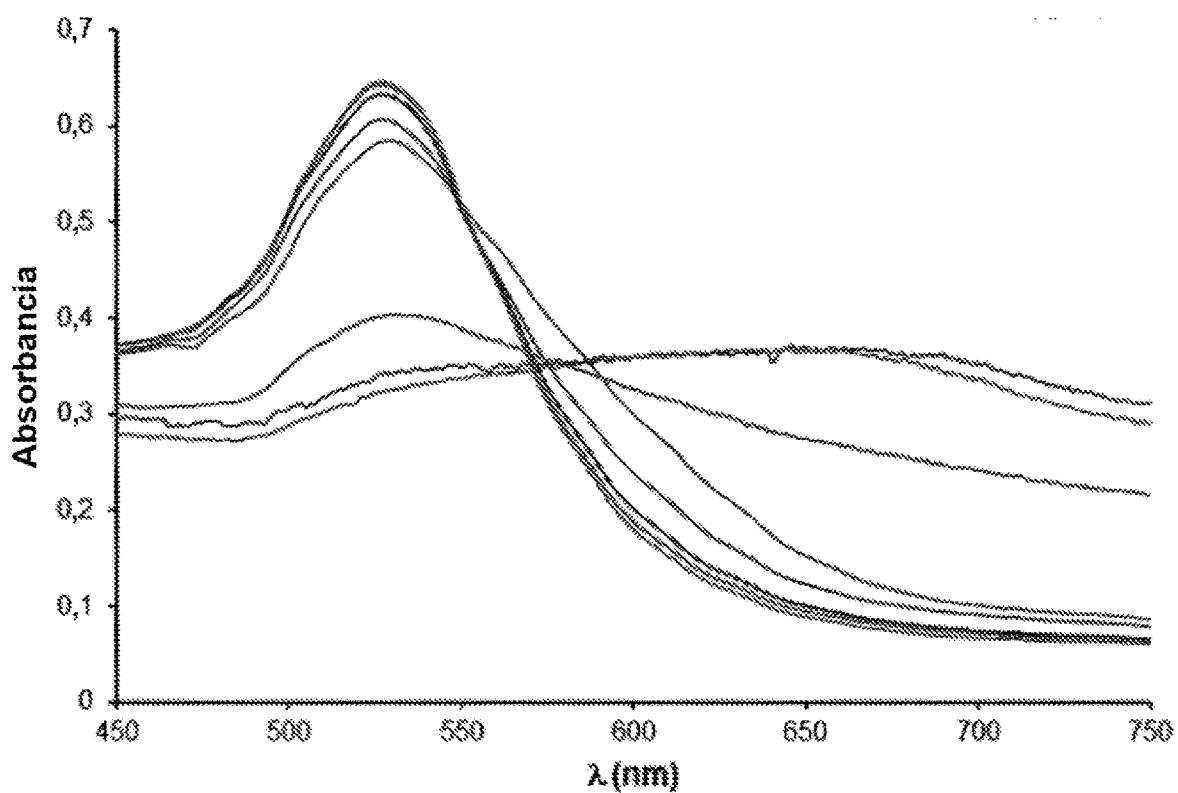


FIGURA 5

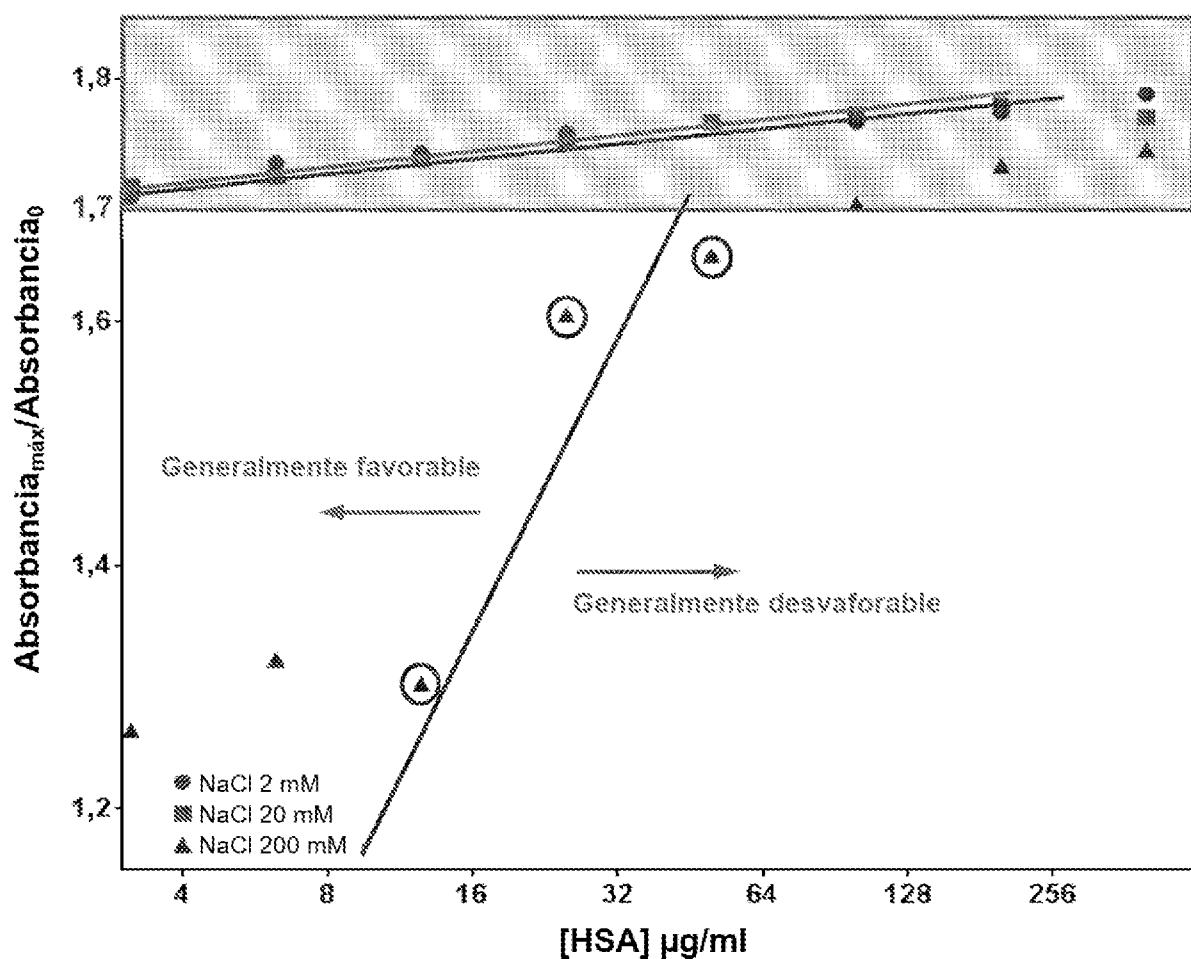


FIGURA 6

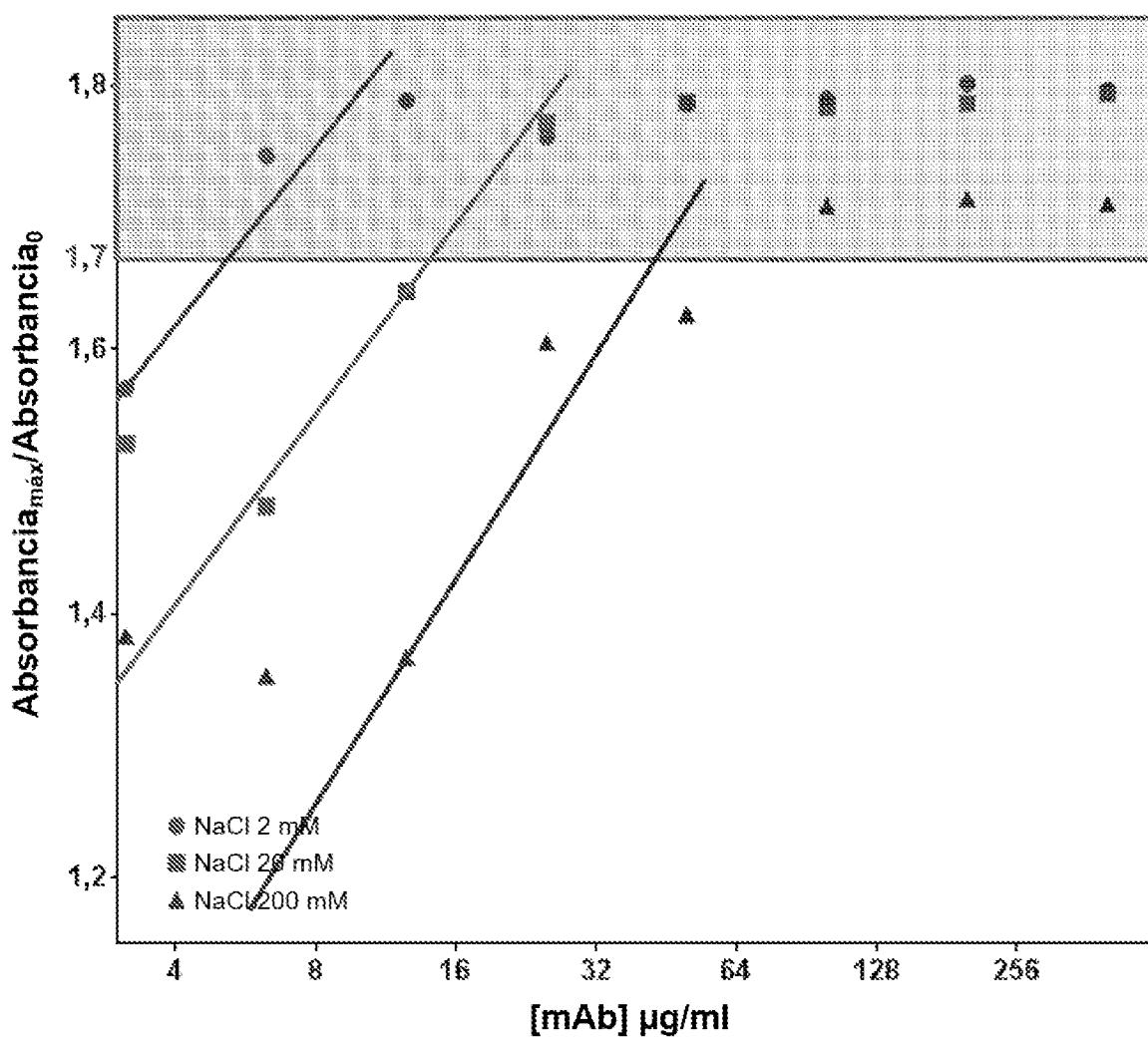


FIGURA 7

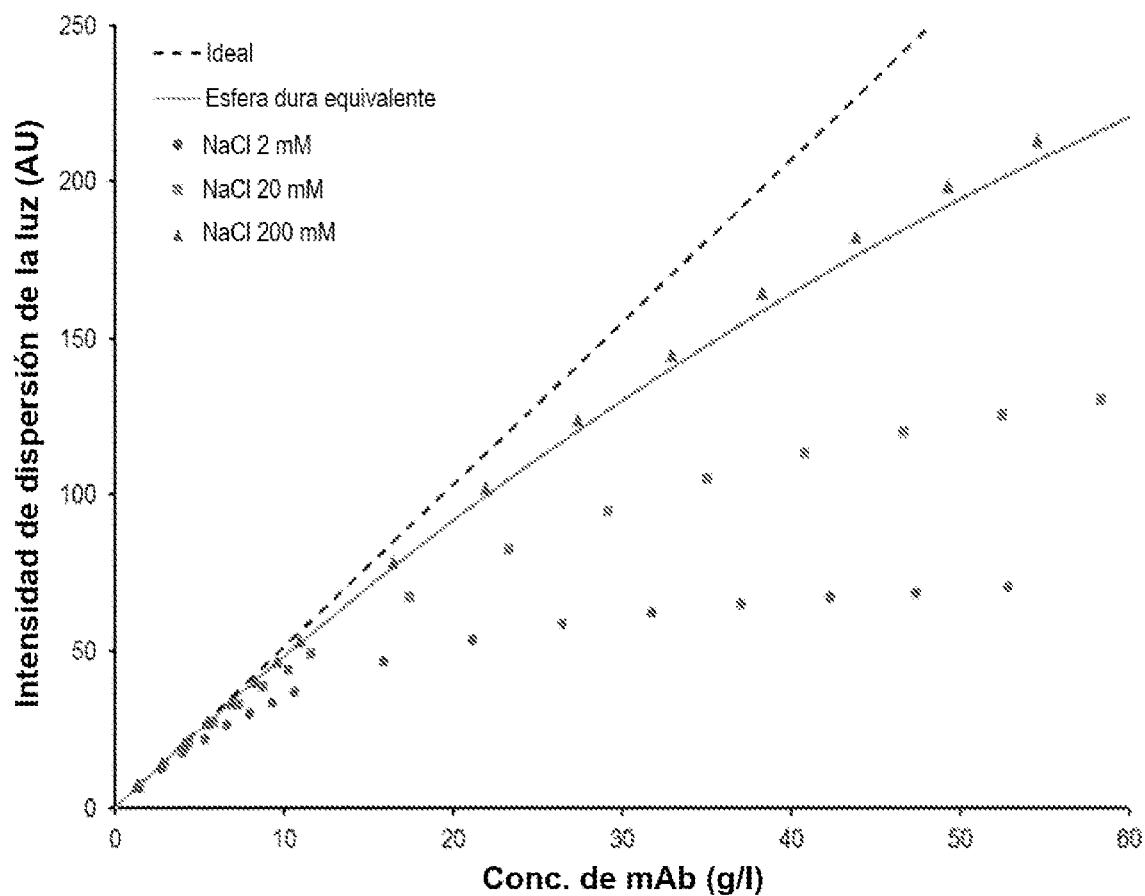


FIGURA 8

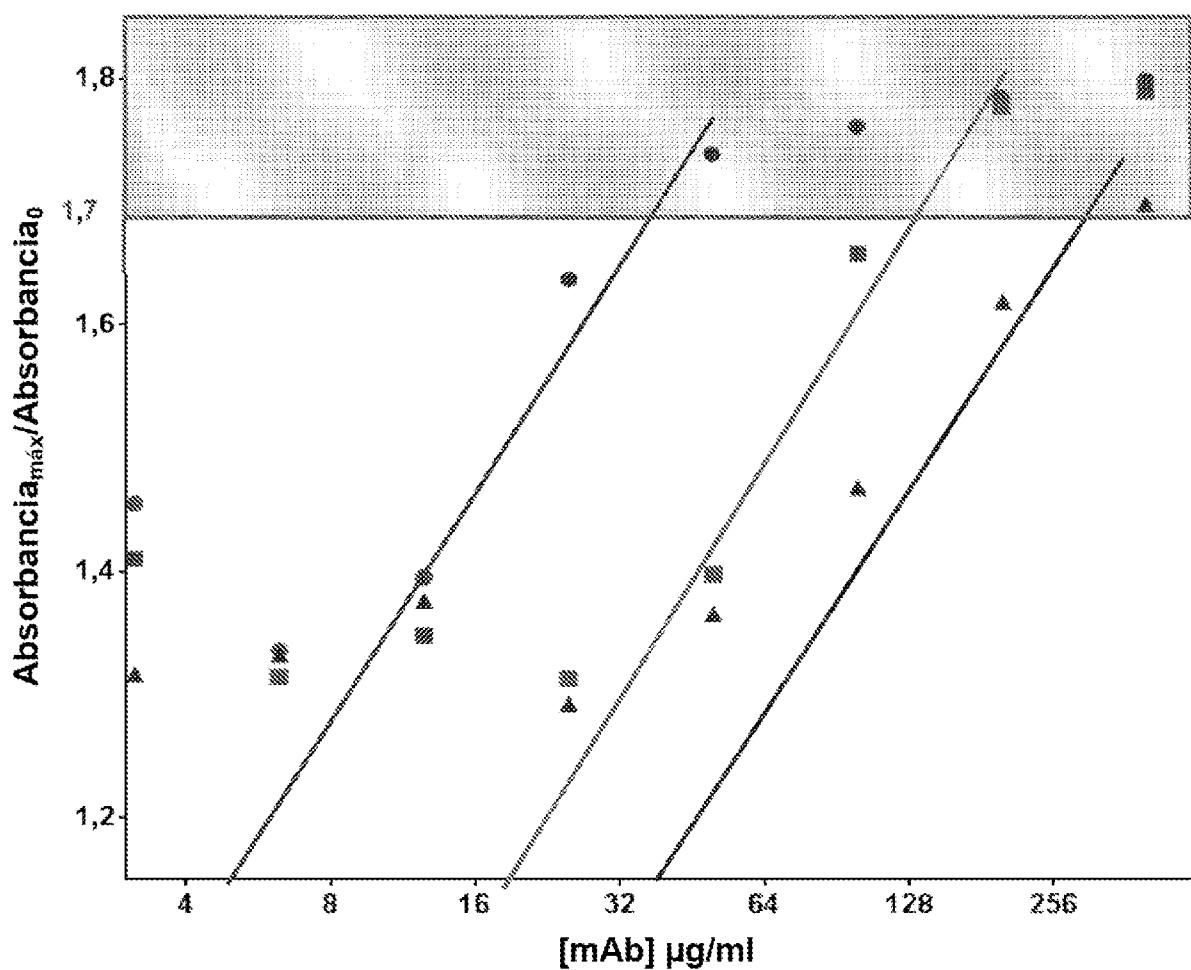


FIGURA 9

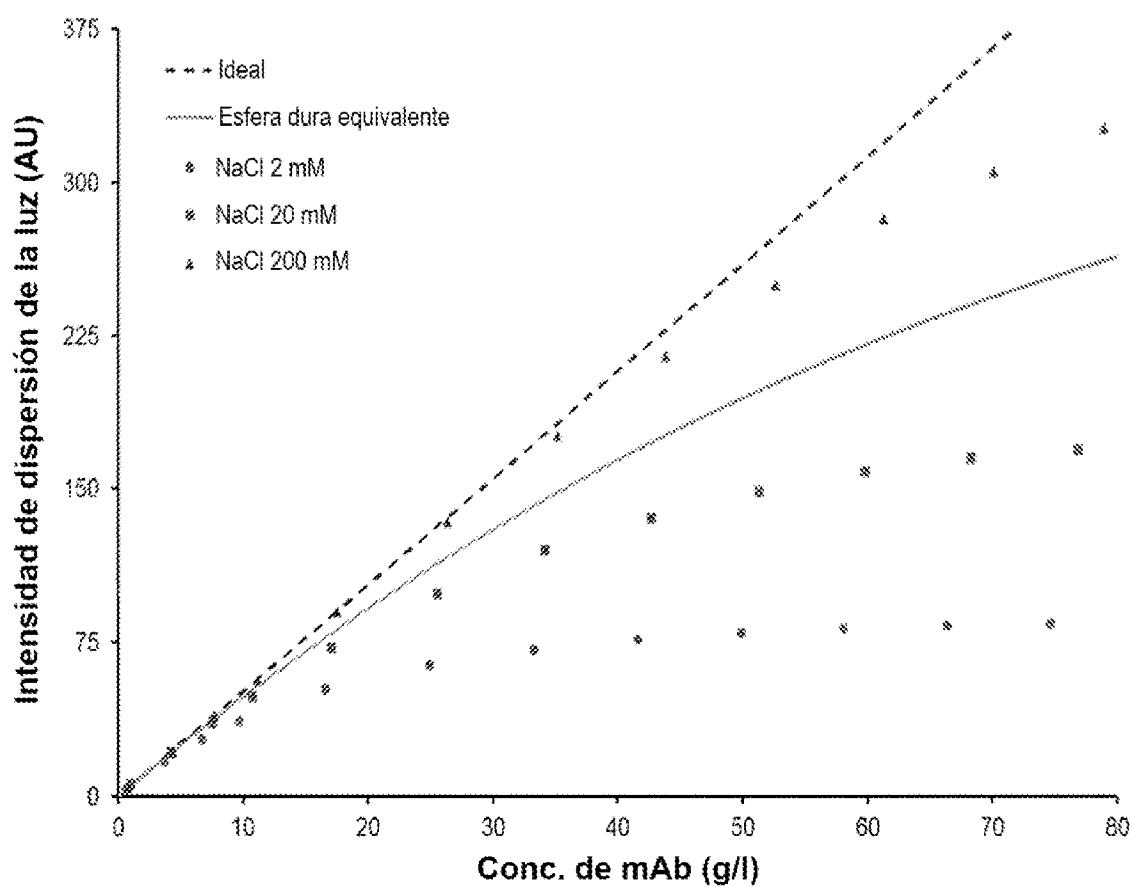


FIGURA 10

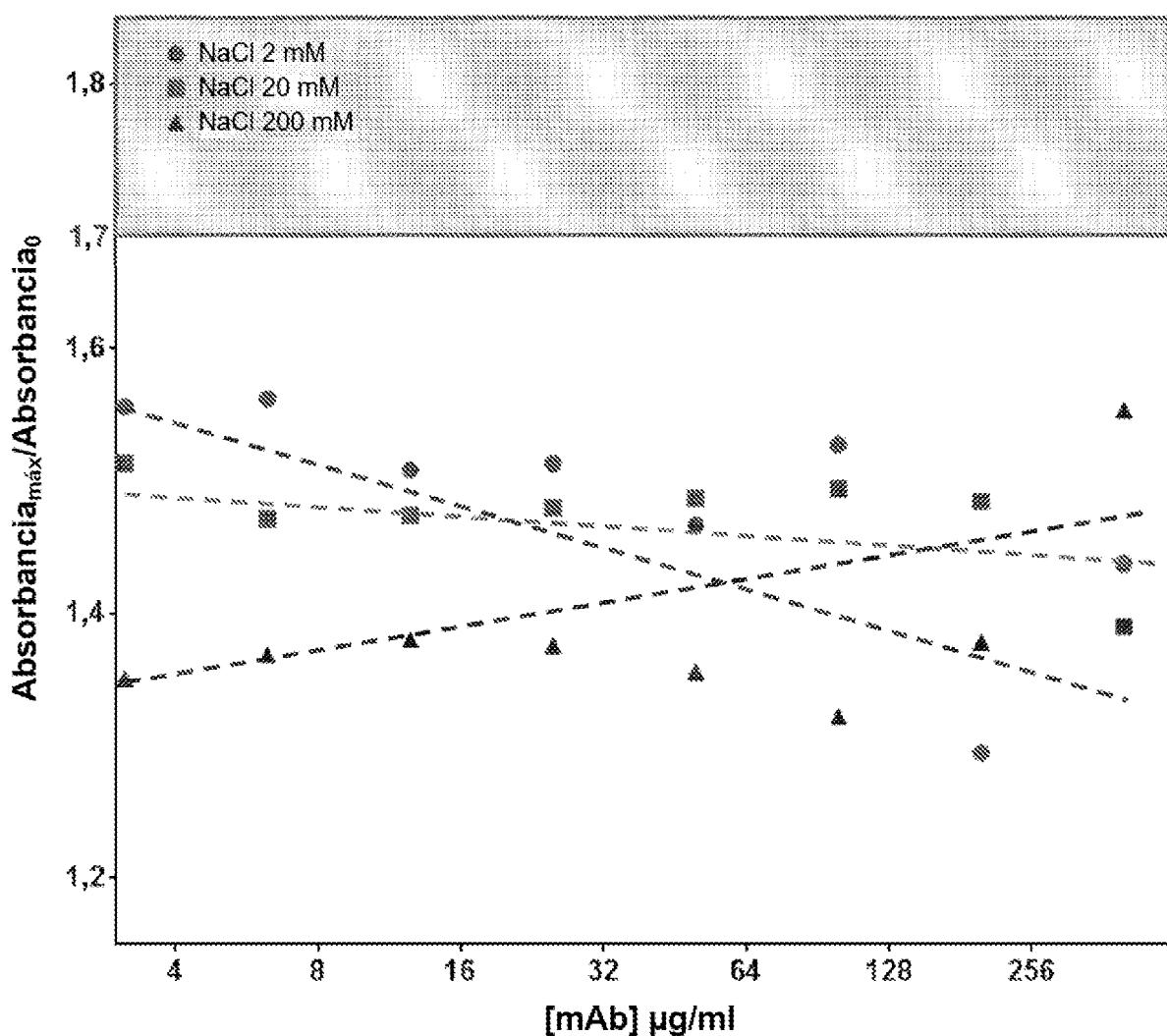


FIGURA 11

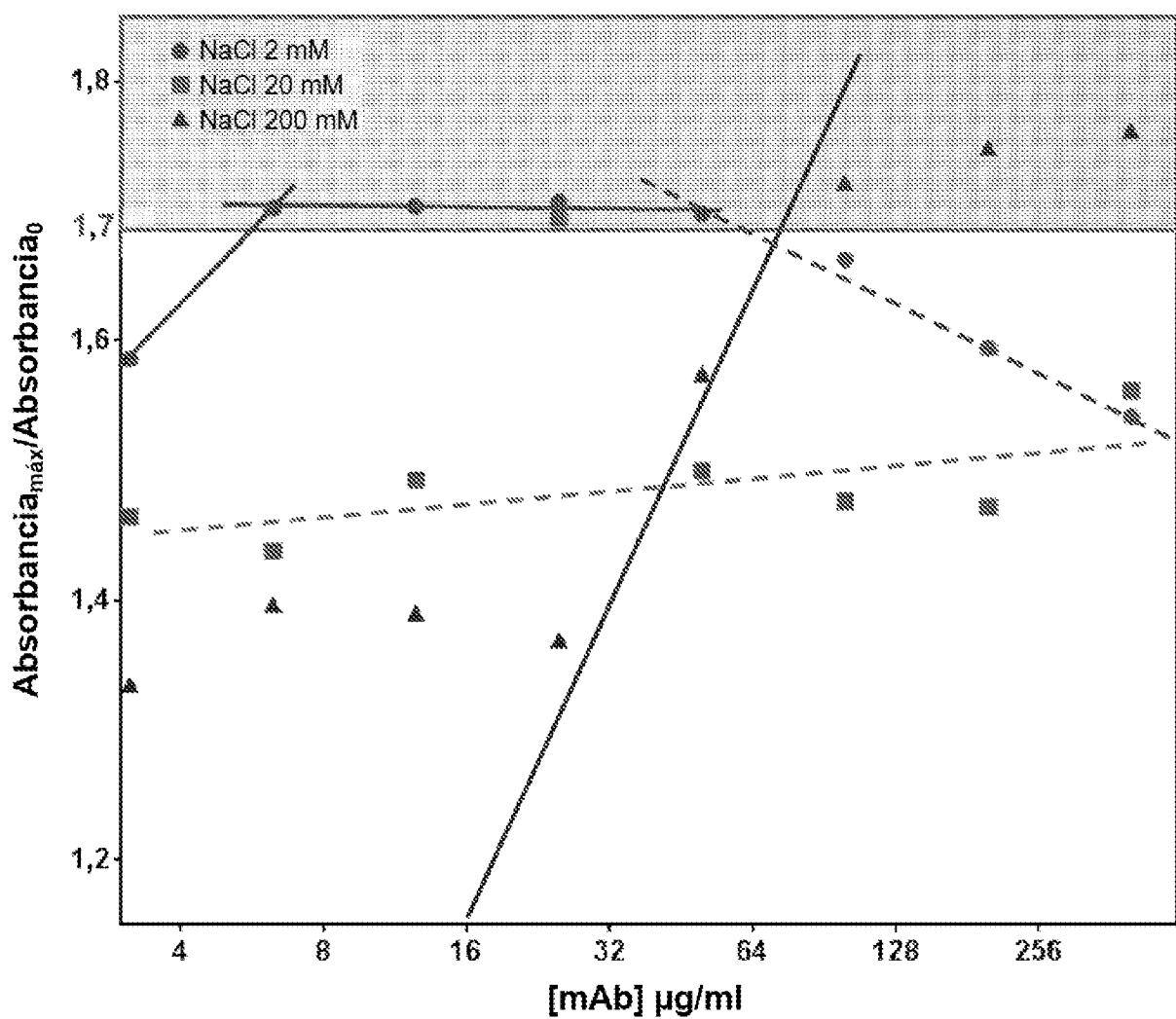


FIGURA 12

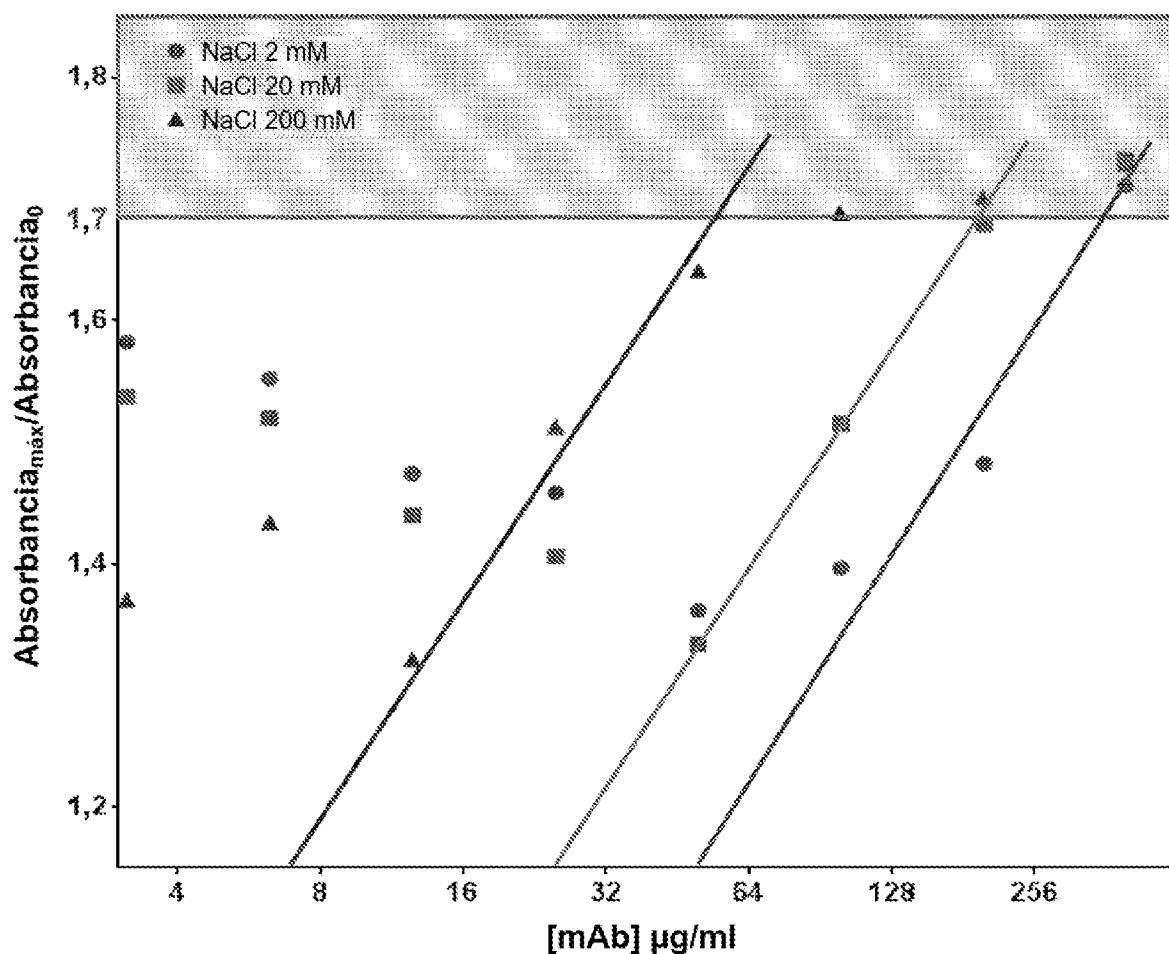


FIGURA 13

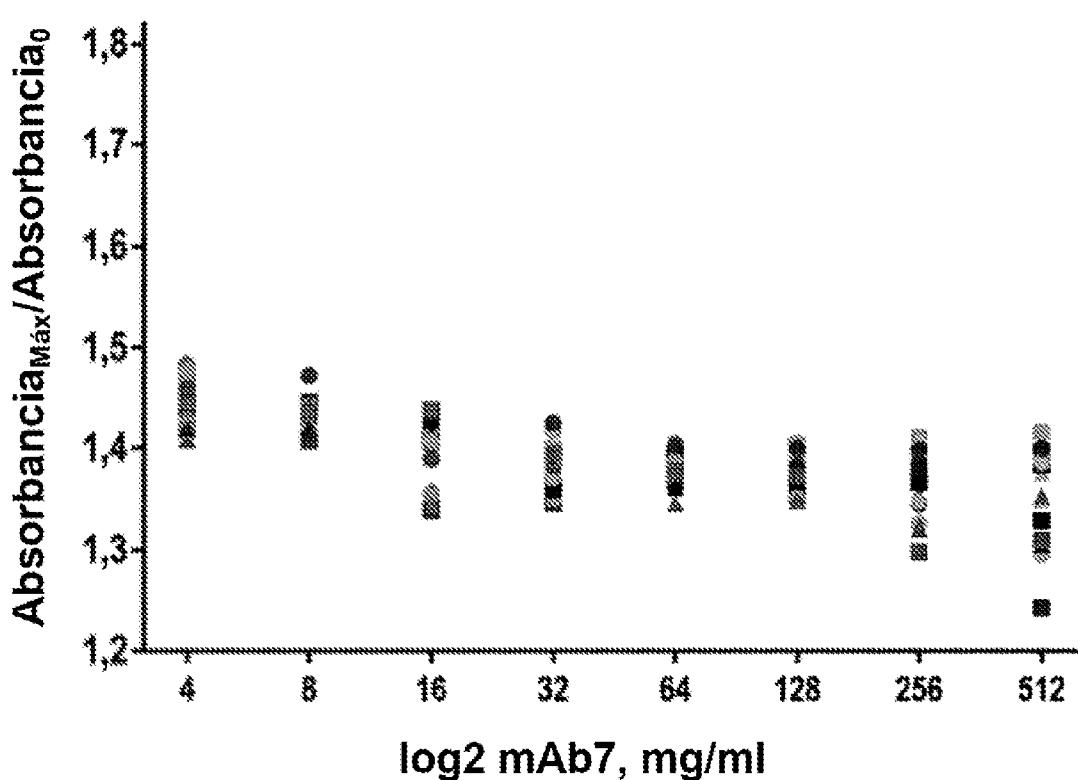


FIGURA 14

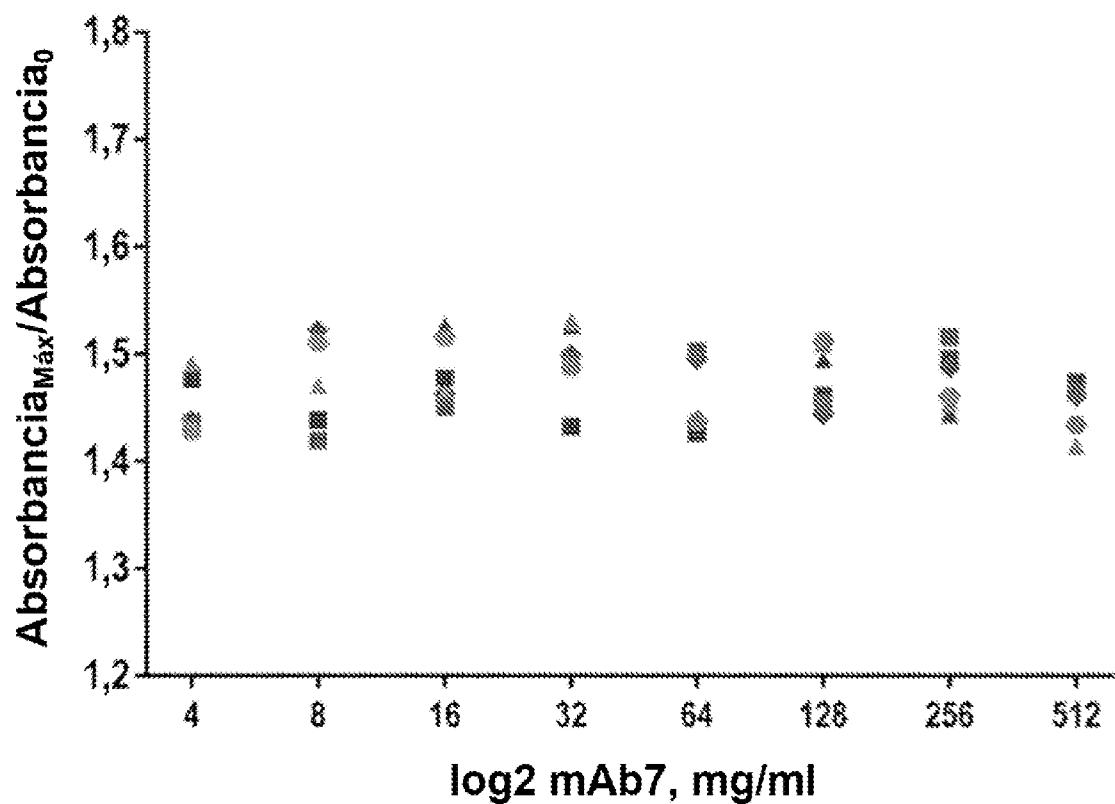


FIGURA 15

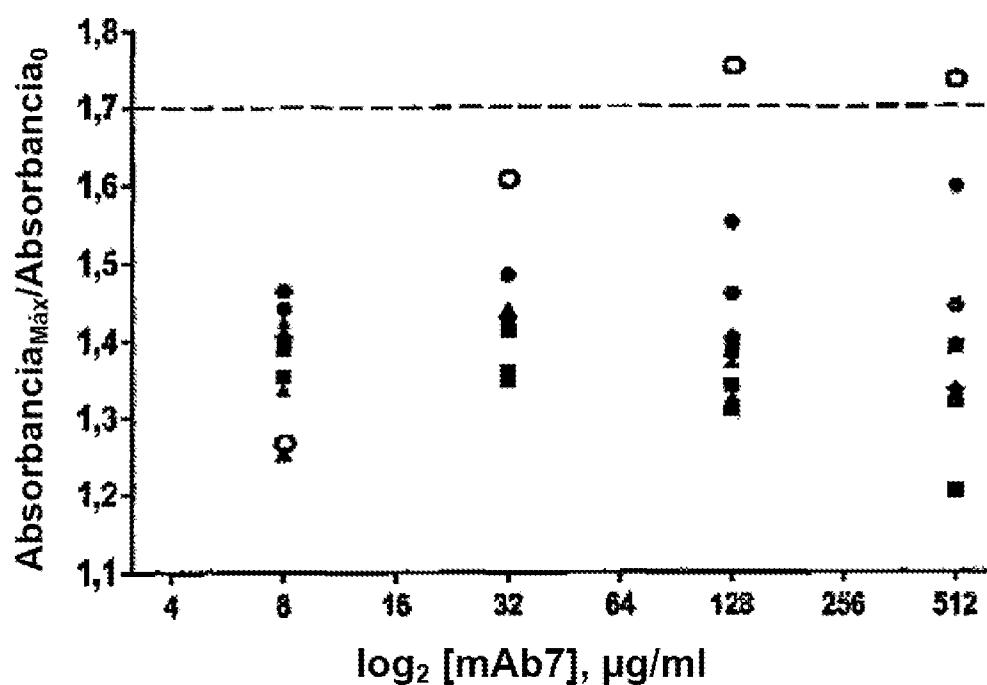


FIGURA 16

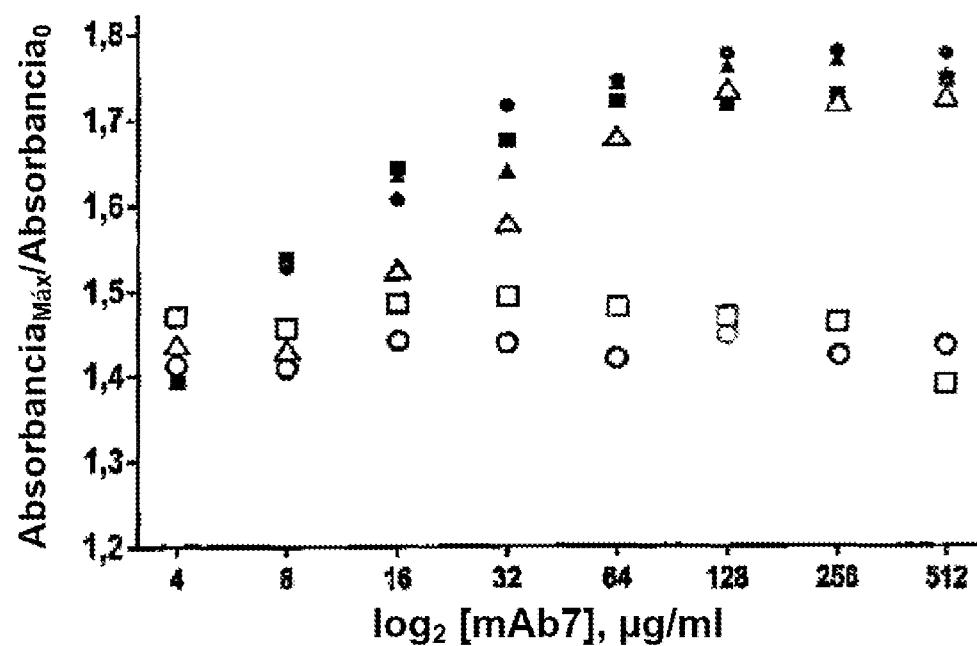


FIGURA 17

