

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 880 802**

51 Int. Cl.:

A61K 9/107 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 31/7024 (2006.01)

A61K 31/7028 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.06.2011** **E 19167191 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **12.05.2021** **EP 3586826**

54 Título: **Composiciones y procedimientos para estabilizar formulaciones que contienen proteínas**

30 Prioridad:

24.06.2010 US 35810510 P

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

25.11.2021

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

ESUE, OSIGWE y
SHARMA, VIKAS K.

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 880 802 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

Composiciones y procedimientos para estabilizar formulaciones que contienen proteínas

5 **Campo de la invención**

La presente invención como se reivindica, se refiere al uso de determinadas composiciones de alquilglucósidos para la prevención de la agregación y oxidación de conjugados anticuerpo-toxina en formulaciones terapéuticamente útiles de los mismos.

10 **Antecedentes de la invención**

Cuando se necesita que un estabilizante para una formulación de proteínas proteja a una proteína de su desnaturalización tras la agitación energética, agitación, cizallamiento y congelación/descongelación, o en estado inactivo en la interfase, a menudo se usa un detergente no iónico (es decir, un tensioactivo) (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 5.183.746). Esto se ejemplifica por el uso de polisorbatos en muchos productos que contienen proteínas. Por ejemplo, se usan los polisorbatos 20 y 80 (Tween® 20 y Tween® 80) en la formulación de productos bioterápicos tanto para prevenir la adsorción superficial como como estabilizantes frente a la agregación de proteínas (Kerwin, J. Pharm. Sci. 97(8):2924-2936 (2008)). Los polisorbatos son tensioactivos anfipáticos, no iónicos, compuestos por ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietilenado (POE), siendo el monolaurato de sorbitán polioxietilenado para el polisorbato 20 y el monooleato de sorbitán polioxietilenado para el polisorbato 80.

Desafortunadamente, sin embargo, los polisorbatos pueden experimentar degradación por medio de oxidación o bien hidrólisis. Cuando una molécula de polisorbato se degrada, genera diversos subproductos de degradación, incluyendo, por ejemplo, ácidos grasos, sorbitán POE, PEG, ésteres de PEG y ácidos de alquilo. Algunos de estos subproductos de degradación de polisorbato, incluyendo los ácidos grasos libres, pueden provocar una turbidez incrementada y agregación de proteínas en las formulaciones que contienen proteínas. Por lo tanto, aunque los polisorbatos se usan comúnmente como estabilizantes de proteínas, los ácidos grasos y otros subproductos de degradación liberados de la degradación de polisorbato con el tiempo pueden afectar de forma adversa al efecto protector que los polisorbatos presentan en las formulaciones que contienen proteínas.

Las proteínas experimentan grados de degradación variables durante la purificación y el almacenamiento, en las que la oxidación (incluyendo la oxidación inducida por luz) es una de las principales vías de degradación que tiene un efecto destructivo sobre la estabilidad y potencia de la proteína. Las reacciones oxidativas provocan la destrucción de los residuos de aminoácido, la hidrólisis de los enlaces peptídicos y de ahí la inestabilidad de las proteínas debida a la alteración de la estructura terciaria de la proteína y la agregación de proteínas (Davies, J. Biol. Chem. 262: 9895-901 (1987)). La oxidación de los fármacos de proteínas se ha revisado por Nguyen (capítulo 4 en Formulation and Delivery of Protein and Peptides (1994)), Hovorka, (J. Pharm Sci. 90:25369 (2001)) y Li (Biotech Bioengineering 48:490-500 (1995)). La técnica anterior más cercana, el documento WO 2007/149096, divulga una composición de alquilglucósidos con un valor de CMC < 1 mM.

Dado lo anterior, es evidente que existe la necesidad de identificar composiciones útiles para potenciar la estabilidad y prevenir la agregación y/u oxidación de una formulación de conjugado anticuerpo-toxina.

45 **Sumario de la invención**

La presente invención se basa en el hallazgo novedoso de que determinadas composiciones de alquilglucósidos son útiles para estabilizar y/o reducir la agregación o inmunogenicidad de conjugados anticuerpo-toxina en formulaciones terapéuticamente útiles. Además, la presente invención se basa además en el hallazgo novedoso de que determinadas composiciones de alquilglucósidos son útiles para prevenir la oxidación de residuos de aminoácido, en particular, residuos de triptófano, en conjugados anticuerpo-toxina en formulaciones terapéuticamente útiles. Más específicamente, un aspecto de la presente invención se dirige a procedimientos de uso de alquilglucósidos que tienen un valor de concentración micelar crítica (CMC) de al menos 1,0 mM como agentes estabilizantes, o reductores de la agregación, de proteínas. En la presente invención, se usa la composición de alquilglucósidos en la formulación que contiene anticuerpos u otras proteínas a una concentración que está por debajo de su valor de CMC respectivo.

En consecuencia, en un aspecto, la presente invención se refiere a una composición de materia que comprende un conjugado anticuerpo-toxina y un alquilglucósido que tiene un valor de CMC de aproximadamente 1,0 mM o mayor en agua a 25 °C. La composición de materia es un conjugado anticuerpo-toxina que opcionalmente puede ser un anticuerpo monoclonal. Aún en otros modos de realización, el alquilglucósido se selecciona del grupo que consiste en n-hexil-β-D-glucopiranosido, n-heptil-β-D-glucopiranosido, n-octil-β-D-glucopiranosido, n-nonil-β-D-glucopiranosido, n-decil-β-D-glucopiranosido, 3-ciclohexil-1-propil-β-D-glucósido, 3-ciclohexil-1-butil-β-D-glucósido, n-hexil-β-D-maltopiranosido, n-octil-β-D-maltopiranosido, n-nonil-β-D-maltopiranosido, n-decil-β-D-maltopiranosido, ciclohexil-metil-β-D-maltósido, 2-ciclohexil-etil-β-D-maltósido, 3-ciclohexil-propil-β-D-maltósido,

4-ciclohexil-butil- β -D-maltósido y 5-ciclohexil-pentil- β -D-maltósido. Aún en otros modos de realización, la composición de materia comprende una cantidad que inhibe la agregación inducida por agitación o una cantidad que previene la oxidación del alquilglucósido. Aún en otro modo de realización, el alquilglucósido está presente en la composición de materia a una concentración que es menor que el valor de CMC del alquilglucósido en agua a 25 °C. La composición de materia puede ser acuosa, puede ser estable a una temperatura de aproximadamente 2-8 °C durante al menos un año y/o puede ser estable a una temperatura de aproximadamente 30 °C durante al menos un mes. Opcionalmente, la composición de materia no está liofilizada y no se somete a liofilización previa o puede ser una formulación liofilizada reconstituida.

En otro aspecto, la presente invención se dirige a un artículo de fabricación que comprende un recipiente que contiene la composición de materia descrita anteriormente.

Aún otro aspecto de la presente invención se dirige a preparar una formulación farmacéutica que comprende preparar la composición de materia descrita anteriormente y evaluar la estabilidad física, la estabilidad química o la actividad biológica del conjugado anticuerpo-toxina en la composición de materia.

Aún otro aspecto de la presente invención se dirige a un procedimiento de inhibición de la agregación inducida por agitación de un conjugado anticuerpo-toxina presente en una primera solución acuosa, en el que el procedimiento comprende la etapa de añadir a la primera solución acuosa una cantidad que inhibe la agregación inducida por agitación de un alquilglucósido que tiene un valor de CMC de aproximadamente 1,0 mM o mayor en agua a 25 °C, proporcionando de este modo una segunda solución acuosa.

Aún otro aspecto de la presente invención se dirige a un procedimiento de prevención de la oxidación de un conjugado anticuerpo-toxina presente en una primera solución acuosa, en el que el procedimiento comprende la etapa de añadir a la primera solución acuosa una cantidad que inhibe la oxidación de un alquilglucósido que tiene un valor de CMC de aproximadamente 1,0 mM o mayor en agua a 25 °C, proporcionando de este modo una segunda solución acuosa.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra el efecto de determinados tensioactivos sobre la agregación inducida por agitación de un anticuerpo monoclonal anti-MUC16 en solución acuosa.

La figura 2 muestra el efecto de determinados tensioactivos sobre la agregación inducida por agitación de un anticuerpo monoclonal anti-MUC16 en solución acuosa.

La figura 3 muestra el efecto de determinados tensioactivos sobre la agregación inducida por agitación de un anticuerpo monoclonal anti-MUC16 en solución acuosa.

La figura 4 muestra el efecto de n-octil- β -D-glucopiranosido sobre la turbidez de soluciones acuosas que comprenden un anticuerpo monoclonal anti-MUC16.

La figura 5 muestra el efecto de n-octil- β -D-glucopiranosido sobre el mantenimiento del % de monómeros de un anticuerpo monoclonal anti-MUC16 en solución acuosa.

La figura 6 muestra el efecto de n-octil- β -D-glucopiranosido o polisorbato 20 sobre la turbidez de soluciones acuosas que comprenden un anticuerpo monoclonal anti-MUC16.

La figura 7 muestra el efecto de n-octil- β -D-glucopiranosido o polisorbato 20 sobre la turbidez de soluciones acuosas que comprenden un anticuerpo monoclonal anti-IgE.

La figura 8 muestra el efecto de n-octil- β -D-glucopiranosido o polisorbato 20 sobre la turbidez de soluciones acuosas que comprenden un anticuerpo monoclonal anti-CD11a.

La figura 9 muestra el efecto de n-octil- β -D-glucopiranosido o polisorbato 20 sobre la turbidez de soluciones acuosas que comprenden un anticuerpo monoclonal anti-CD22.

La figura 10 muestra el efecto de n-octil- β -D-glucopiranosido o polisorbato 20 sobre el mantenimiento del % de monómeros de un anticuerpo monoclonal anti-MUC16 en solución acuosa.

La figura 11 muestra el efecto de n-octil- β -D-glucopiranosido o polisorbato 20 sobre el mantenimiento del % de monómeros de un anticuerpo monoclonal anti-IgE en solución acuosa.

La figura 12 muestra el efecto de n-octil- β -D-glucopiranosido o polisorbato 20 sobre el mantenimiento del % de monómeros de un anticuerpo monoclonal anti-CD11a en solución acuosa.

La figura 13 muestra el efecto de n-octil- β -D-glucopiranosido o polisorbato 20 sobre el mantenimiento del % de monómeros de un anticuerpo monoclonal anti-CD22 en solución acuosa.

5 La figura 14 muestra la cantidad de peróxido de hidrógeno generado por diversos alquilglucósidos o polisorbato 20 en solución con el tiempo.

La figura 15 muestra el efecto de diversos alquilglucósidos o polisorbato 20 sobre la prevención de la oxidación de un anticuerpo anti-CD11a en solución acuosa.

10 La figura 16 muestra el efecto de diversos alquilglucósidos o polisorbato 20 sobre la prevención de la oxidación de un anticuerpo anti-CD22 en solución acuosa.

Descripción detallada del modo de realización preferente

15 La presente invención se puede entender más fácilmente por referencia a la siguiente descripción detallada de modos de realización específicos y los ejemplos incluidos en la misma.

20 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece la presente invención. Aunque se puede usar cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o pruebas de la invención, ahora se describen los procedimientos y materiales preferentes.

25 En el presente documento, los intervalos o cantidades numéricas precedidas por el término "aproximadamente" incluyen expresamente el intervalo exacto o la cantidad numérica exacta.

30 La agregación de conjugados anticuerpo-toxina es provocada principalmente por interacciones hidrófobas que finalmente dan lugar a la desnaturalización. Cuando la región hidrófoba de una proteína parcial o completamente desplegada se expone al agua, esto crea una situación termodinámicamente desfavorable debido al hecho de que el interior hidrófobo normalmente oculto se expone ahora a un entorno acuoso hidrófilo. En consecuencia, la disminución de la entropía de las moléculas de agua que conforman la estructura alrededor de la región hidrófoba obliga a la proteína desnaturalizada a agregarse, principalmente a través de las regiones hidrófobas expuestas. Por tanto, la solubilidad del conjugado anticuerpo-toxina también se puede ver comprometida. En algunos casos, se puede producir la autoasociación de subunidades de proteínas, naturales o bien mal plegadas, bajo determinadas condiciones y esto puede dar lugar a precipitación y pérdida de actividad.

35 Los factores que afectan la agregación de conjugados anticuerpo-toxina en solución en general incluyen la concentración de proteína, pH, temperatura, otros excipientes y tensión mecánica. Algunos factores (por ejemplo, la temperatura) se pueden controlar más fácilmente durante la purificación, formulación, fabricación, almacenamiento y uso que otros (por ejemplo, tensión mecánica). Los estudios de formulación dictarán la(s) elección/elecciones apropiada(s) de pH y excipientes que no inducirán la agregación y/o, de hecho, que ayudarán a la prevención de la agregación. La concentración de conjugados anticuerpo-toxina se dicta por la dosis terapéutica requerida y, dependiendo de cuál sea esta concentración, determinará si existe la posibilidad de obtener estados asociados más altos (dímeros, tetrámeros, etc.), que, a continuación, pueden dar lugar a la agregación en solución. Se deben realizar estudios cuidadosos durante el desarrollo de la formulación para determinar qué factores influyen en la agregación de conjugados anticuerpo-toxina y, a continuación, cómo se pueden eliminar o controlar estos factores.

40 El deseo de identificar preparaciones en solución estables de un conjugado anticuerpo-toxina para su uso en la administración parenteral u otra puede dar lugar al desarrollo de una metodología de prueba para evaluar el efecto de diversos aditivos sobre la estabilidad física. En base a los factores conocidos que influyen en la agregación de proteínas y los requisitos de dichas aplicaciones, se puede evaluar la estabilidad física usando procedimientos mecánicos que implican la agitación o giro de soluciones de proteínas. La metodología para las pruebas de tensión física para identificar la capacidad de diversos aditivos de prevenir la agregación puede implicar la exposición a la agitación enérgica o remoción en el plano horizontal o giro x cm desde el eje de una rueda que gira a n rev/min en el plano vertical. La turbidez resultante de la agregación se determina normalmente como una función del tiempo por inspección visual o por análisis de dispersión de la luz. De forma alternativa, las reducciones en el contenido de conjugado anticuerpo-toxina soluble debido a la precipitación se pueden cuantificar por un ensayo de HPLC como una función del tiempo.

45 La presente invención se basa en el hallazgo novedoso de que determinadas composiciones de alquilglucósidos son útiles para estabilizar o reducir la agregación e inmunogenicidad de conjugados anticuerpo-toxina en formulaciones terapéuticamente útiles. Además, la presente invención se basa además en el hallazgo novedoso de que determinadas composiciones de alquilglucósidos son útiles para prevenir o reducir la oxidación de conjugados anticuerpo-toxina en formulaciones terapéuticamente útiles.

Los "tensioactivos" son agentes activos en superficie que pueden ejercer su efecto en las superficies de sólido-sólido, sólido-líquido, líquido-líquido y líquido-aire debido a su composición química, que contiene tanto grupos hidrófilos como hidrófobos. Estos materiales reducen la concentración de proteínas en soluciones diluidas en las interfases aire-agua y/o agua-sólido donde los conjugados anticuerpo-toxina se pueden adsorber y agregar potencialmente. Los tensioactivos se pueden unir a las interfases hidrófobas en las formulaciones de proteínas. Las proteínas en la superficie del agua se agregarán, en particular cuando se agiten, debido a la desplegada y posterior agregación de la monocapa de proteínas.

Los "tensioactivos" pueden desnaturalizar los conjugados anticuerpo-toxina, pero también los pueden estabilizar frente a la desnaturalización en superficie. En general, los tensioactivos iónicos pueden desnaturalizar proteínas. Sin embargo, los tensioactivos no iónicos normalmente no desnaturalizan proteínas incluso a concentraciones relativamente altas (1 % p/v). La mayoría de los tensioactivos no iónicos parenteralmente aceptables proceden de los grupos polisorbato o bien poliéter. El polisorbato 20 y 80 son estabilizantes tensioactivos contemporáneos en formulaciones de proteínas comercializadas. Sin embargo, otros tensioactivos usados en formulaciones de proteína incluyen Pluronic F-68 y miembros de la clase "Brij". Ninguno de estos son alquilglucósidos de la presente invención.

Los acontecimientos físicos pueden dar como resultado la exposición a acontecimientos químicos. La inestabilidad química de las proteínas puede implicar la escisión o formación de enlaces covalentes con la estructura primaria de la proteína. Se ha informado de varias reacciones de oxidación en las proteínas. En el medio alcalino o neutro, los residuos de los aminoácidos cisteína, histidina, metionina, triptófano y tirosina son especialmente propensos a la oxidación. En condiciones ácidas, sin embargo, la metionina es sensible. A menudo, las reacciones de oxidación provocan una gran pérdida de actividad biológica e incluso inmunogenicidad. Es bien conocido en la técnica que la oxidación de residuos de aminoácido en proteínas, especialmente residuos de triptófano, se puede inducir por la exposición a la luz.

Los peróxidos son contaminantes conocidos de los tensioactivos no iónicos. Los peróxidos en los polisorbatos pueden dar como resultado la degradación oxidativa de las proteínas. Los formuladores tienden a examinar las fuentes de polisorbatos y otros aditivos poliméricos en las formulaciones de proteínas para determinar la contaminación por peróxidos y establecer especificaciones sobre peróxidos para usar el aditivo. De forma alternativa, se usa la incorporación de un antioxidante para ayudar a superar la posibilidad de que los tensioactivos no iónicos sirvan como catalizadores oxidativos para las proteínas sensibles al oxígeno.

Los "tensioactivos" son moléculas con regiones polares y no polares bien definidas que les permiten agregarse en solución para formar micelas. Dependiendo de la naturaleza del área polar, los tensioactivos pueden ser no iónicos, aniónicos, catiónicos y de iones dipolares. Los tensioactivos no iónicos pueden estar basados en glúcidos. Los tensioactivos basados en glúcidos pueden ser alquilglucósidos.

Como se usa en el presente documento, "alquilglucósido" se refiere a cualquier glúcido unido por un enlace a cualquier alquilo hidrófobo, como se conoce en la técnica. El enlace entre la cadena de alquilo hidrófobo y el sacárido hidrófilo puede incluir, entre otras posibilidades, una unión o enlace glucosídico, éster, tioglucosídico, tioéster, éter, amida o ureido, ejemplos de los cuales se describen en el presente documento. Los términos alquilglucósido y alquilsacárido se pueden usar de manera intercambiable en el presente documento.

La estructura general de los alquilglucósidos de la presente invención es $R_1-O-(CH_2)_x-R$, donde R puede ser, por ejemplo, CH_3 , ciclohexilo (C_6H_{11}) u otra cadena de alquilo, incluyendo los isómeros de los mismos, y R_1 es un glúcido, típicamente glucosa o maltosa. Los alquilglucósidos ejemplares incluyen aquellos en los que R_1 es glucosa, R es CH_3 y x es 5 (n-hexil- β -D-glucopiranosido), x es 6 (n-heptil- β -D-glucopiranosido), x es 7 (n-octil- β -D-glucopiranosido), x es 8 (n-nonil- β -D-glucopiranosido), x es 9 (n-decil- β -D-glucopiranosido) y x es 11 (n-dodecil- β -D-glucopiranosido). A veces, los glucopiranosidos se llaman glucósidos.

Los alquilglucósidos ejemplares incluyen adicionalmente aquellos en los que R_1 es maltosa, R es CH_3 y x es 5 (n-hexil- β -D-maltopiranosido), x es 7 (n-octil- β -D-maltopiranosido), x es 8 (n-nonil- β -D-maltopiranosido), x es 9 (n-decil- β -D-maltopiranosido), x es 10 (n-undecil- β -D-maltopiranosido), x es 11 (n-dodecil- β -D-maltopiranosido), x es 12 (n-tridecil- β -D-maltopiranosido), x es 13 (n-tetradecil- β -D-maltopiranosido) y x es 15 (n-hexadecil- β -D-maltopiranosido). A veces, los maltopiranosidos se llaman maltósidos.

Los alquilglucósidos ejemplares incluyen además aquellos en los que R_1 es glucosa, x es 3 y R es ciclohexilo (3-ciclohexil-1-propil- β -D-glucósido); y en los que R_1 es maltosa, x es 4 y R es ciclohexilo (4-ciclohexil-1-butil- β -D-maltósido).

En un aspecto específico de la presente invención, los alquilglucósidos empleados en la presente invención son aquellos que presentan un valor de concentración micelar crítica (CMC) de aproximadamente 1,0 mM o mayor en agua a entre 20 y 25 °C, preferentemente a 25 °C. Los alquilglucósidos ejemplares que tienen dichos valores de CMC se muestran en la tabla I a continuación, en la que otros son bien conocidos en la técnica.

Tabla I

<u>Alquilglucósido</u>	<u>Valor de CMC (mM)</u>	<u>Valor de CMC (p/v)</u>
n-hexil- β -D-glucopiranosido	250 mM	6,6 % p/v
n-heptil- β -D-glucopiranosido	70 mM	1,9 % p/v
n-octil- β -D-glucopiranosido	18 mM	0,53 % p/v
n-nonil- β -D-glucopiranosido	6,5 mM	0,2 % p/v
n-decil- β -D-glucopiranosido	2,2 mM	0,07 % p/v
3-ciclohexil-1-propil- β -D-glucósido	28 mM	0,86 % p/v
3-ciclohexil-1-butil- β -D-glucósido	1,8 mM	0,058 % p/v
n-hexil- β -D-maltopiranosido	210 mM	8,9 % p/v
n-octil- β -D-maltopiranosido	19,5 mM	0,89 % p/v
n-nonil- β -D-maltopiranosido	6 mM	0,28 % p/v
n-decil- β -D-maltopiranosido	1,8 mM	0,087 % p/v
ciclohexil-metil- β -D-maltósido	340 mM	15 % p/v
2-ciclohexil-etil- β -D-maltósido	120 mM	5,4 % p/v
3-ciclohexil-propil- β -D-maltósido	34,5 mM	1,6 % p/v
4-ciclohexil-butil- β -D-maltósido	7,6 mM	0,37 % p/v
5-ciclohexil-pentil- β -D-maltósido	2,4 mM	0,12 % p/v
n-dodecil- β -D-maltopiranosido	0,17 mM	0,0087 p/v
n-dodecil- β -D-glucopiranosido	0,19 mM	0,0066 p/v

Se puede emplear un alquilglucósido particular individualmente como un agente estabilizante (o reductor de la agregación u oxidación) de conjugados anticuerpo-toxina o se puede emplear en combinación con otros alquilglucósidos. Los alquilglucósidos encuentran uso como agentes estabilizantes (o antiagregación o antioxidación) de conjugados anticuerpo-toxina en un amplio intervalo de concentraciones en solución acuosa. En modos de realización particulares de la presente invención, el alquilglucósido (si se emplea como un agente único) o alquilglucósidos (si se emplean en combinación) están presentes en la formulación acuosa que contiene conjugados anticuerpo-toxina a una concentración de aproximadamente 0,001 mM a aproximadamente 500 mM, más preferentemente de aproximadamente 0,005 mM a aproximadamente 400 mM, más preferentemente de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 300 mM, más preferentemente de aproximadamente 0,02 mM a aproximadamente 250 mM, más preferentemente de aproximadamente 0,03 mM a aproximadamente 200 mM, más preferentemente de aproximadamente 0,05 mM a aproximadamente 100 mM, más preferentemente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 100 mM, más preferentemente de aproximadamente 0,1 mM a aproximadamente 50 mM.

En la presente invención se puede emplear un alquilglucósido particular como un agente estabilizante (o reductor de la agregación u oxidación) de conjugados anticuerpo-toxina a una concentración que es menor que su valor de CMC respectivo.

Con respecto a lo anterior, se entiende en la técnica que la síntesis química de compuestos tales como los alquilglucósidos descritos en el presente documento da como resultado una mezcla de compuestos un tanto heterogénea, en lugar de una preparación completamente homogénea. Como tal, cuando se describe en el presente documento que se emplea un alquilglucósido particular, se ha de entender que esa definición se refiere a los componentes mayoritarios de la mezcla heterogénea que resultan de la síntesis química del mismo.

En el presente documento, el conjugado anticuerpo-toxina reivindicado se dirige contra un "antígeno" de interés. Preferentemente, el antígeno es una proteína biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero que padece una enfermedad o trastorno puede dar como resultado un beneficio terapéutico en ese mamífero. Sin embargo, también se contemplan anticuerpos dirigidos contra antígenos no proteicos (tales como antígenos glucolipídicos asociados a tumor; véase la patente de EE. UU. n.º 5.091.178). Si el antígeno es una proteína, puede ser una molécula transmembranaria (por ejemplo, un receptor) o ligando, tal como un factor de crecimiento. Los antígenos ejemplares incluyen las proteínas analizadas anteriormente. Las dianas moleculares preferentes para anticuerpos englobadas por la presente invención incluyen polipéptidos CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; miembros de la familia de receptores HER, tales como el receptor de EGF (HER1), el receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Mac1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina α v/ β 3 que incluye las subunidades α o bien β de la misma (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento, tales como VEGF; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); receptor *mpl*; CTLA-4; polipéptido C, etc. Se pueden usar antígenos solubles o fragmentos de los mismos, opcionalmente conjugados con otras moléculas, como inmunógenos para generar anticuerpos. Para moléculas transmembranarias, tales como receptores, se pueden usar fragmentos de estos (por ejemplo, el dominio extracelular de un receptor) como inmunógeno. De forma

alternativa, se pueden usar células que expresan la molécula transmembranaria como inmunógeno. Se pueden derivar dichas células de una fuente natural (por ejemplo, líneas celulares de cáncer) o pueden ser células que se han transformado por técnicas recombinantes para expresar la molécula transmembranaria.

Los ejemplos de anticuerpos que se van a purificar en el presente documento incluyen, pero no se limitan a: anticuerpos anti-HER2 incluyendo trastuzumab (HERCEPTIN®) (Carter *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285-4289 (1992), patente de EE. UU. n.º 5.725.856) y pertuzumab (OMNITARG™) (documento WO01/00245); anticuerpos anti-CD20 (véase a continuación); anticuerpos anti-IL-8 (St John *et al.*, *Chest*, 103:932 (1993), y publicación internacional n.º WO 95/23865); anticuerpos anti-VEGF o frente al receptor de VEGF incluyendo anticuerpos anti-VEGF humanizados o madurados por afinidad tales como el anticuerpo anti-VEGF humanizado huA4.6.1 bevacizumab (AVASTIN®) y ranibizumab (LUCENTIS®) (Kim *et al.*, *Growth Factors*, 7:53-64 (1992), publicación internacional n.º WO 96/30046 y el documento WO 98/45331, publicado el 15 de octubre de 1998); anticuerpos anti-PSCA (documento WO01/40309); anticuerpos anti-CD11a incluyendo efalizumab (RAPTIVA®) (patente de EE. UU. n.º 6.037.454, patente de EE. UU. n.º 5.622.700, documento WO 98/23761, Stoppa *et al.*, *Transplant Intl.* 4:3-7 (1991), y Hourmant *et al.*, *Transplantation* 58:377-380 (1994)); anticuerpos que se unen a IgE incluyendo omalizumab (XOLAIR®) (Presta *et al.*, *J. Immunol.* 151:2623-2632 (1993), y la publicación internacional n.º WO 95/19181; patente de EE. UU. n.º 5.714.338, concedida el 3 de febrero de 1998 o patente de EE. UU. n.º 5.091.313, concedida el 25 de febrero de 1992, documento WO 93/04173 publicado el 4 de marzo de 1993, o solicitud internacional n.º PCT/US98/13410 presentada el 30 de junio de 1998, patente de EE. UU. n.º 5.714.338); anticuerpos anti-CD18 (patente de EE. UU. n.º 5.622.700, concedida el 22 de abril de 1997, o como en el documento WO 97/26912, publicado el 31 de julio de 1997); anticuerpos contra el receptor Apo-2 (documento WO 98/51793 publicado el 19 de noviembre de 1998); anticuerpos contra el factor tisular (TF) (patente europea n.º 0 420 937 B1 concedida el 9 de noviembre de 1994); anticuerpos anti-integrinas $\alpha_4\text{-}\alpha_7$ (documento WO 98/06248 publicado el 19 de febrero de 1998); anticuerpos anti-EGFR (por ejemplo, anticuerpo 225 quimerizado o humanizado, cetuximab, ERBUTIX® como en el documento WO 96/40210 publicado el 19 de diciembre de 1996); anticuerpos anti-CD3 tales como OKT3 (patente de EE. UU. n.º 4.515.893 concedida el 7 de mayo de 1985); anticuerpos anti-CD25 o anti-Tac tales como CHI-621 (SIMULECT®) y ZENAPAX® (véase la patente de EE. UU. n.º 5.693.762 concedida el 2 de diciembre de 1997); anticuerpos anti-CD4 tales como el anticuerpo cM-7412 (Choy *et al.*, *Arthritis Rheum* 39(1):52-56 (1996)); anticuerpos anti-CD52 tales como CAMPATH-1H (ILEX/Berlex) (Riechmann *et al.*, *Nature* 332:323-337 (1988)); anticuerpos anti-receptor de Fc tales como el anticuerpo M22 dirigido contra Fc γ RI como en Graziano *et al.*, *J. Immunol.* 155(10):4996-5002 (1995)); anticuerpos anti-antígeno carcinoembrionario (CEA) tales como hMN-14 (Sharkey *et al.*, *Cancer Res.* 55(23Suppl): 5935s-5945s (1995)); anticuerpos dirigidos contra células epiteliales de mama incluyendo huBrE-3, hu-Mc 3 y CHL6 (Ceriani *et al.*, *Cancer Res.* 55(23): 5852s-5856s (1995); y Richman *et al.*, *Cancer Res.* 55(23 Suppl): 5916s-5920s (1995)); anticuerpos que se unen a células de carcinoma de colon, tal como C242 (Litton *et al.*, *Eur J. Immunol.* 26(1): 1-9 (1996)); anticuerpos anti-CD38, por ejemplo, AT 13/5 (Ellis *et al.*, *J. Immunol.* 155(2):925-937 (1995)); anticuerpos anti-CD33 tales como Hu M195 (Jurcic *et al.*, *Cancer Res* 55(23 Suppl):5908s-5910s (1995)) y CMA-676 o CDP771; anticuerpos anti-EpCAM tales como 17-1A (PANOREX®); anticuerpos anti-GpIIb/IIIa tales como abciximab o fab c7E3 (REOPRO®); anticuerpos anti-RSV tales como MEDI-493 (SYNAGIS®); anticuerpos anti-CMV tales como PROTOVIR®; anticuerpos anti-HIV tales como PRO542; anticuerpos anti-hepatitis tales como el anticuerpo anti-Hep B OSTAVIR®; anticuerpo anti-CA125 incluyendo anti-MUC16 (documento WO2007/001851; Yin, BWT y Lloyd, KO, *J. Biol. Chem.* 276:27371-27375 (2001)) y OvaRex; anticuerpo anti-epítipo GD3 idiótipo BEC2; anticuerpo anti- $\alpha\text{v}\beta 3$ (por ejemplo, VITAXIN®; Medimmune); anticuerpo anti-carcinoma de células renales humanas tales como ch-G250; ING-1; anticuerpo anti-17-1A humano (3622W94); anticuerpo anti-tumor colorrectal humano (A33); anticuerpo anti-melanoma humano R24 dirigido contra el gangliósido GD3; anticuerpos anti-carcinoma de células escamosas humano (SF-25); anticuerpo anti-antígenos leucocitarios humanos (HLA) tales como Smart ID10 y el anticuerpo anti-HLA DR Oncolym (Lym-1); anticuerpo anti-CD37 tal como TRU 016 (Trubion); anticuerpo anti-IL-21 (Zymogenetics/Novo Nordisk); anticuerpo anti-linfocitos B (Impheron); Mab dirigido a linfocitos B (Immunogen/Aventis); 1D09C3 (Morphosys/GPC); LymphoRad 131 (HGS); anticuerpo anti-Lym-1 tal como Lym-1Y-90 (USC) o anti-Lym-1 Oncolym (USC/Peregrine); LIF 226 (Enhanced Lifesci.); anticuerpo anti-BAFF (por ejemplo, documento WO 03/33658); anticuerpo anti-receptor de BAFF (véase, por ejemplo, documento WO 02/24909); anticuerpo anti-BR3; anticuerpo anti-Blys tal como belimumab; LYMPHOSTAT-B™; ISF 154 (UCSD/Roche/Tragen); gomilixima (Idex 152; Biogen Idec); anticuerpo anti-receptor de IL-6 tal como atlizumab (ACTEMRA™; Chugai/Roche); anticuerpo anti-IL-15 tal como HuMax-IL-15 (Genmab/Amgen); anticuerpo anti-receptor de quimiocinas, tal como un anticuerpo anti-CCR2 (por ejemplo, MLN1202; Millienneum); anticuerpo anti-complemento, tal como anticuerpo anti-C5 (por ejemplo, eculizumab, 5G1.1; Alexion); formulación oral de inmunoglobulina humana (por ejemplo, IgPO; Protein Therapeutics); anticuerpo anti-IL-12 tal como ABT-874 (CAT/Abbott); Teneliximab (BMS-224818; BMS); anticuerpos anti-CD40, incluyendo S2C6 y variantes humanizadas del mismo (documento WO00/75348) y TNX 100 (Chiron/Tanox); anticuerpo anti-TNF- α incluyendo cA2 o infliximab (REMICADE®), CDP571, MAK-195, adalimumab (HUMIRA™), fragmento de anticuerpo anti-TNF- α pegilado tal como CDP-870 (Celltech), D2E7 (Knoll), anticuerpo policlonal anti-TNF- α (por ejemplo, PassTNF; Verigen); anticuerpos anti-CD22 tales como LL2 o epratuzumab (LYMPHOCIDE®; Immunomedics), incluyendo epratuzumab Y-90 y epratuzumab I-131, anticuerpo anti-CD22 de Abiogen (Abiogen, Italia), CMC 544 (Wyeth/Celltech), combotox (UT Southwestern), BL22 (NIH) y LymScan Tc99 (Immunomedics).

Los ejemplos de anticuerpos anti-CD20 incluyen: "C2B8", que ahora se llama "rituximab" ("RITUXAN®") (patente

de EE. UU. n.º 5.736.137); el anticuerpo murino 2B8 marcado con itrio-[90] designado "Y2B8" o "Ibritumomab Tiuxetan" (ZEVALIN®) disponible comercialmente de IDEC Pharmaceuticals, Inc. (patente de EE. UU. n.º 5.736.137; 2B8 depositado con ATCC con el n.º de acceso HB11388 el 22 de junio de 1993); IgG2a murina "B1", también llamada "Tositumomab", opcionalmente marcada con ¹³¹I para generar el anticuerpo "131I-B1" o "yodo I131 tositumomab" (BEXXAR™) disponible comercialmente de Corixa (véase también la patente de EE. UU. n.º 5.595.721); anticuerpo monoclonal murino "1F5" (Press *et al.*, *Blood* 69(2):584-591 (1987)) y variantes del mismo, incluyendo 1F5 "parcheado de forma estructural" o humanizado (documento WO 2003/002607, Leung, S; depósito en ATCC HB-96450); anticuerpo 2H7 murino y 2H7 quimérico (patente de EE. UU. n.º 5.677.180); 2H7 humanizado (documento WO 2004/056312, Lowman *et al.*); 2F2 (HuMax-CD20), un anticuerpo completamente humano de alta afinidad dirigido a la molécula de CD20 en la membrana celular de los linfocitos B (Genmab, Dinamarca; véase, por ejemplo, Glennie y van de Winkel, *Drug Discovery Today* 8:503-510 (2003) y Cragg *et al.*, *Blood* 101:1045-1052 (2003); los documentos WO 2004/035607; US2004/0167319); los anticuerpos monoclonales humanos expuestos en los documentos WO 2004/035607 y US2004/0167319 (Teeling *et al.*); los anticuerpos que tienen cadenas de glúcidos unidas a N-glucósido complejas unidas a la región Fc descrita en el documento US 2004/0093621 (Shitara *et al.*); anticuerpos monoclonales y fragmentos de unión a antígeno que se unen a CD20 (documento WO 2005/000901, Tedder *et al.*), tal como HB20-3, HB20-4, HB20-25 y MB20-11; moléculas de unión a CD20, tal como la serie de anticuerpos AME, por ejemplo, los anticuerpos AME33 como se establece en los documentos WO 2004/103404 y US2005/0025764 (Watkins *et al.*, Eli Lilly/Applied Molecular Evolution, AME); moléculas de unión a CD20, tales como las descritas en el documento US 2005/0025764 (Watkins *et al.*); anticuerpo anti-A20 o variantes del mismo, tal como el anticuerpo anti-A20 quimérico o humanizado (cA20, hA20, respectivamente) o IMMU-106 (documento US 2003/0219433, Immunomedics); anticuerpos de unión a CD20, incluyendo Leu-16, 1H4 o 2B8 deficitarios en epítomos, conjugados opcionalmente con IL-2, como en los documentos US 2005/0069545A1 y WO 2005/16969 (Carr *et al.*); anticuerpo biespecífico que se une a CD22 y CD20, por ejemplo, hLL2xhA20 (documento WO2005/14618, Chang *et al.*); anticuerpos monoclonales L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 o NU-B2 disponibles del International Leukocyte Typing Workshop (Valentine *et al.*, en: *Leukocyte Typing* III (McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press (1987)); 1H4 (Haisma *et al.*, *Blood* 92:184 (1998)); conjugado anti-CD20 auristatina E (Seattle Genetics); anti-CD20-IL2 (EMD/Biovation/City of Hope); tratamiento con MAb anti-CD20 (EpiCyte); anticuerpo anti-CD20 TRU015 (Trubion).

El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, incluye anticuerpos monoclonales (incluyendo los anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos, diacuerpos y moléculas monocatenarias, así como fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, Fab, F(ab')₂ y Fv). El término "inmunoglobulina" (Ig) se usa de manera intercambiable con "anticuerpo" en el presente documento.

La unidad de anticuerpo tetracatenaria básica es una glucoproteína heterotetrámera compuesta por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas. Un anticuerpo IgM consiste en 5 de las unidades heterotetrámeras básicas junto con un polipéptido adicional llamado cadena J, y contiene 10 sitios de unión a antígeno, mientras que los anticuerpos IgA comprenden de 2 a 5 de las unidades tetracatenarias básicas que se pueden polimerizar para formar ensamblajes polivalentes en combinación con la cadena J. En el caso de las IgG, la unidad tetracatenaria es, en general, de aproximadamente 150.000 dalton. Cada cadena L se une a una cadena H por un enlace disulfuro covalente, mientras que las dos cadenas H se unen entre sí por uno o más enlaces disulfuro dependiendo del isotipo de la cadena H. Cada cadena H y L también tiene puentes disulfuro intracatenarios regularmente espaciados. Cada cadena H tiene, en el extremo N, un dominio variable (V_H) seguido de tres dominios constantes (C_H) para cada una de las cadenas α y γ, y cuatro dominios C_H para los isotipos μ y ε. Cada cadena L tiene, en el extremo N, un dominio variable (V_L) seguido de un dominio constante en su otro extremo. El V_L se alinea con el V_H y el C_L se alinea con el primer dominio constante de la cadena pesada (C_H1). Se cree que residuos aminoacídicos particulares forman una interfase entre los dominios variables de la cadena ligera y de la cadena pesada. El emparejamiento de un V_H y un V_L conjuntamente forma un sitio de unión a antígeno individual. Para la estructura y propiedades de las diferentes clases de anticuerpos, véase, por ejemplo, *Basic and Clinical Immunology*, 8.ª edición, Daniel P. Sties, Abba I. Terr y Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, página 71 y capítulo 6.

La cadena L de cualquier especie de vertebrado se puede asignar a uno de dos tipos claramente diferenciados, llamados kappa y lambda, en base a las secuencias de aminoácidos de sus dominios constantes. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas (CH), las inmunoglobulinas se pueden asignar a diferentes clases o isotipos. Existen cinco clases de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM, que tienen cadenas pesadas designadas α, δ, ε, γ y μ, respectivamente. Las clases γ y α se dividen además en subclases basadas en diferencias relativamente menores en la secuencia y función de CH, por ejemplo, los seres humanos expresan las siguientes subclases: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 y IgA2.

El término "variable" se refiere al hecho de que determinados segmentos de los dominios variables difieren ampliamente en su secuencia de un anticuerpo a otro. El dominio V media en la unión a antígeno y define la especificidad de un anticuerpo particular por su antígeno particular. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente en toda la extensión de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en tramos relativamente invariables llamados regiones estructurales (FR) de aproximadamente 15-30 residuos de aminoácido

separados por regiones más cortas de variabilidad extrema llamadas "regiones hipervariables" o, a veces, "regiones determinantes de la complementariedad" (CDR) que tienen cada una aproximadamente 9-12 residuos de aminoácido de longitud. Los dominios variables de las cadenas pesada y ligera naturales comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina β , conectadas mediante tres regiones hipervariables que forman bucles que conectan y, en algunos casos forman parte de, la estructura de lámina β . Las regiones hipervariables en cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad mediante las FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión a antígeno de los anticuerpos (véase Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5.^a ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Los dominios constantes no están implicados directamente en la unión de un anticuerpo a un antígeno, pero presentan diversas funciones efectoras, tales como la participación de la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable" (también conocida como "regiones determinantes de la complementariedad" o CDR) cuando se usa en el presente documento se refiere a los residuos de aminoácido de un anticuerpo que están (normalmente tres o cuatro regiones cortas de variabilidad de secuencia extrema) dentro del dominio de la región V de una inmunoglobulina que forman el sitio de unión a antígeno y son los principales determinantes de la especificidad por el antígeno. Existen al menos dos procedimientos para identificar los residuos de CDR: (1) un enfoque basado en la variabilidad de secuencia de especies cruzadas (es decir, Kabat *et al.*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institute of Health, Bethesda, M S 1991); y (2) un enfoque basado en estudios cristalográficos de complejos antígeno-anticuerpo (Chothia, C. *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (1987)). Sin embargo, en el grado en que dos técnicas de identificación de residuos definan regiones de superposición, pero no regiones idénticas, se pueden combinar para definir una CDR híbrida.

El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprende la población son idénticos excepto por posibles mutaciones y/o modificaciones postraduccionales naturales (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos (policlonales) convencionales que incluyen típicamente diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un determinante único en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en tanto que se sintetizan mediante el cultivo de hibridomas, no estando contaminados por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo como que se obtiene de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se ha de interpretar como que requiere la producción del anticuerpo por cualquier procedimiento particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se van a usar de acuerdo con la presente invención se pueden preparar por el procedimiento de hibridoma descrito inicialmente por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), o se pueden preparar por procedimientos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente de EE. UU. n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de colecciones de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" (inmunoglobulinas) en los que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente de EE. UU. n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, cercopitécidos, simios superiores, etc.) y secuencias de la región constante humana.

Un anticuerpo "intacto" es uno que comprende un sitio de unión a antígeno, así como un CL y al menos los dominios de la cadena pesada C_{H1}, C_{H2} y C_{H3}. Los dominios constantes pueden ser dominios constantes de secuencia natural (por ejemplo, dominios constantes de secuencia natural humana) o una variante de secuencia de aminoácidos de los mismos. Preferentemente, el anticuerpo intacto tiene una o más funciones efectoras.

Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo intacto, preferentemente la región de unión a antígeno y/o la región variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales (véase la patente de EE. UU. n.º 5.641.870, ejemplo 2; Zapata *et al.*, *Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995]); moléculas de anticuerpo monocatenario; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo.

La digestión con papaína de los anticuerpos produjo dos fragmentos de unión a antígeno idénticos, llamados fragmentos "Fab", y un fragmento "Fc" residual, una designación que refleja la capacidad de cristalizar fácilmente. El fragmento Fab consiste en toda una cadena L junto con el dominio de la región variable de la cadena H (V_H) y

el primer dominio constante de una cadena pesada (C_H1). Cada fragmento Fab es monovalente con respecto a la unión a antígeno, es decir, tiene un único sitio de unión a antígeno. El tratamiento con pepsina de un anticuerpo produce un único fragmento $F(ab')_2$ grande que corresponde aproximadamente a dos fragmentos Fab unidos por puente disulfuro que tiene diferente actividad de unión a antígeno y que todavía se puede reticular con el antígeno.

Los fragmentos Fab' difieren de los fragmentos Fab en que tienen unos pocos residuos adicionales en el extremo carboxílico del dominio C_H1 , incluyendo una o más cisteínas de la región bisagra de anticuerpo. Fab'-SH es la designación en el presente documento para un Fab' en el que el/los residuo(s) de cisteína de los dominios constantes portan un grupo tiol libre. Los fragmentos de anticuerpo $F(ab')_2$ se produjeron originalmente como pares de fragmentos Fab' que tienen cisteínas bisagra entre ellos. También son conocidos otros acoplamiento químicos de fragmentos de anticuerpo.

El fragmento Fc comprende las partes carboxiterminales de ambas cadenas H mantenidas unidas por puentes disulfuro. Las funciones efectoras de los anticuerpos se determinan por secuencias en la región Fc, la región que también reconocen los receptores Fc (FcR) encontrados en determinados tipos de células.

"Fv" es el fragmento de anticuerpo mínimo que contiene un sitio de reconocimiento de y unión a antígeno completo. Este fragmento consiste en un dímero de un dominio de la región variable de una cadena pesada y una ligera en estrecha asociación no covalente. Del plegamiento de estos dos dominios emanan seis bucles hipervariables (3 bucles de cada uno de la cadena H y L) que contribuyen a los residuos de aminoácido para la unión a antígeno y confieren al anticuerpo especificidad de unión a antígeno. Sin embargo, incluso un único dominio variable (o la mitad de un Fv que comprende solo tres CDR específicas para un antígeno) tiene la capacidad de reconocer y unirse al antígeno, aunque a una afinidad menor que todo el sitio de unión.

"Fv monocatenario", también abreviado como "sFv" o "scFv" son fragmentos de anticuerpo que comprenden los dominios de anticuerpo V_H y V_L conectados en una cadena polipeptídica única. Preferentemente, el polipéptido sFv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios V_H y V_L que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión a antígeno. Para una revisión de los sFv, véase Pluckthun en *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg y Moore eds., Springer-Verlag, Nueva York, pp. 269-315 (1994).

El término "diacuerpos" se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños preparados construyendo fragmentos sFv (véase el párrafo anterior) con conectores cortos (de aproximadamente 5-10 residuos) entre los dominios V_H y V_L de modo que se logra el emparejamiento intercatenario pero no intracatenario de los dominios V, dando como resultado, de este modo, un fragmento bivalente, es decir, un fragmento que tiene dos sitios de unión a antígeno. Los diacuerpos biespecíficos son heterodímeros de dos fragmentos sFv "entrecruzados" en los que los dominios V_H y V_L de los dos anticuerpos están presentes en diferentes cadenas polipeptídicas. Los diacuerpos se describen con más detalle, por ejemplo, en los documentos EP 404.097 y WO 93/11161; Hollinger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993).

Un anticuerpo que "se une específicamente a" o es "específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido particular es uno que se une a ese polipéptido particular o epítipo en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a ningún otro polipéptido o epítipo polipeptídico.

El término "fase sólida" describe una matriz no acuosa a la que se puede adherir el anticuerpo de la presente invención. Los ejemplos de fases sólidas englobadas en el presente documento incluyen las formadas parcial o totalmente de vidrio (por ejemplo, vidrio de poro controlado), polisacáridos (por ejemplo, agarosa), poliácridamidas, poliestireno, poli(alcohol vinílico) y siliconas. En determinados modos de realización, dependiendo del contexto, la fase sólida puede comprender el pocillo de una placa de ensayo; en otros es una columna de purificación (por ejemplo, una columna de cromatografía de afinidad). Este término también incluye una fase sólida discontinua de partículas discretas, tales como las descritas en la patente de EE. UU. n.º 4.275.149.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de anticuerpos de unión a antígeno) de secuencias en su mayoría humanas, que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable (también CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante), tal como ratón, rata o conejo, que tenga la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región estructural (FR) de Fv de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los "anticuerpos humanizados", como se usan en el presente documento, también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar adicionalmente el comportamiento del anticuerpo. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, típicamente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véanse Jones *et al.*, *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann *et al.*, *Nature*, 332:323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992).

Un "anticuerpo dependiente de la especie", por ejemplo, un anticuerpo de mamífero anti-IgE humana, es un anticuerpo que tiene una afinidad de unión más fuerte por un antígeno de una primera especie de mamífero que la que tiene por un homólogo de ese antígeno de una segunda especie de mamífero. Normalmente, el anticuerpo dependiente de la especie se "une específicamente" a un antígeno humano (es decir, tiene un valor de afinidad de unión (Kd) de no más de aproximadamente 1×10^{-7} M, de forma alternativa no más de aproximadamente 1×10^{-8} M, de forma alternativa no más de aproximadamente 1×10^{-9} M) pero tiene una afinidad de unión por un homólogo del antígeno de una segunda especie de mamífero no humano que es al menos aproximadamente 50 veces, al menos aproximadamente 500 veces o al menos aproximadamente 1000 veces más débil que su afinidad de unión por el antígeno no humano. El anticuerpo dependiente de la especie puede ser cualquiera de los diversos tipos de anticuerpos como se define anteriormente, pero preferentemente es un anticuerpo humanizado o humano.

Las "funciones efectoras" del anticuerpo se refieren a las actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una región Fc de secuencia natural o una región Fc de variante de secuencia de aminoácidos) de un anticuerpo, y varían con el isotipo de anticuerpo. Los ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluyen: unión a C1q y citotoxicidad dependiente del complemento; unión al receptor de Fc; citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; regulación por disminución de receptores de superficie celular (por ejemplo, receptores de linfocitos B) y activación de linfocitos B.

"Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos" o ADCC se refiere a una forma de citotoxicidad en la que la Ig secretada unida a receptores de Fc (FcR) presentes en determinadas células citotóxicas (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) permite que estas células efectoras citotóxicas se unan específicamente a una célula diana portadora de antígeno y posteriormente destruyan la célula diana con citotoxinas. Los anticuerpos "equipan" a las células citotóxicas y se requieren para destruir la célula diana por este mecanismo. Las células primarias para mediar en la ADCC, los linfocitos NK, expresan solo FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. La expresión de Fc en células hematopoyéticas se resume en la tabla 3 en la página 464 de Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991). Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés se puede realizar un ensayo de ADCC *in vitro*, tal como el descrito en las patentes de EE. UU. n.º 5.500.362 o 5.821.337. Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). De forma alternativa, o adicionalmente, la actividad de ADCC de la molécula de interés se puede evaluar *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal tal como el divulgado en Clynes *et al.*, *PNAS USA* 95:652-656 (1998).

"Receptor de Fc" o "FcR" describe un receptor que se une a la región Fc de un anticuerpo. El FcR preferente es un FcR humano de secuencia natural. Además, un FcR preferente es uno que se une a un anticuerpo IgG (un receptor gamma) e incluye receptores de las subclases FcγRI, FcγRII y FcγRIII, incluyendo variantes alélicas y formas empalmadas de forma alternativa de estos receptores, los receptores FcγRIII incluyen FcγRIIA (un "receptor de activación") y FcγRIIB (un "receptor de inhibición"), que tienen secuencias de aminoácidos similares que difieren principalmente en los dominios citoplásmicos de los mismos. El receptor de activación FcγRIIA contiene un motivo de activación del inmunorreceptor basado en tirosina (ITAM) en su dominio citoplásmico. El receptor de inhibición FcγRIIB contiene un motivo de inhibición del inmunorreceptor basado en tirosina (ITIM) en su dominio citoplásmico (véase M. Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997). Los FcR se revisan en Ravetch y Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991); Capel *et al.*, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994); y de Haas *et al.*, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995). Otros FcR, incluyendo los que se van a identificar en el futuro, se engloban por el término "FcR" en el presente documento. El término también incluye el receptor neonatal, FcRn, que es responsable de la transferencia de IgG maternas al feto. Guyer *et al.*, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) y Kim *et al.*, *J. Immunol.* 24: 249 (1994).

Las "células efectoras humanas" son leucocitos que expresan uno o más FcR y realizan funciones efectoras. Preferentemente, las células expresan al menos FcγRIII y realizan la función efectora de ADCC. Los ejemplos de leucocitos humanos que median en la ADCC incluyen leucocitos monomorfonucleares en la sangre periférica (PBMC), linfocitos citolíticos naturales (NK), monocitos, linfocitos T citotóxicos y neutrófilos; siendo preferentes los PBMC y las células MNK. Las células efectoras se pueden aislar de una fuente natural, por ejemplo, sangre.

"Citotoxicidad dependiente del complemento" o "CDC" se refiere a la lisis de una célula diana en presencia del complemento. La activación de la vía clásica del complemento se inicia por la unión del primer componente del sistema del complemento (C1q) a anticuerpos (de la subclase apropiada) que están unidos a su antígeno afín. Para evaluar la activación del complemento, se puede realizar un ensayo de CDC, por ejemplo, como se describe en Gazzano-Santoro *et al.*, *J. Immunol. Methods* 202: 163 (1996).

El término "formulación farmacéutica" se refiere a una preparación que está en una forma tal que permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean inaceptablemente tóxicos para un sujeto al que se administraría la formulación.

Un anticuerpo posee "actividad biológica" en una formulación farmacéutica si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado está dentro de aproximadamente un 10 % (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica presentada en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica, como se determina por la

capacidad del anticuerpo *in vitro* o *in vivo* de unirse al antígeno y dar como resultado una respuesta biológica mensurable.

Una formulación "estable" es una en la que el conjugado anticuerpo-toxina en la misma retiene esencialmente su estabilidad física y/o química tras el almacenamiento. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un período de tiempo seleccionado. Preferentemente, la formulación es estable a temperatura ambiente (~30 °C) o a 40 °C durante al menos 1 mes y/o estable a aproximadamente 2-8 °C durante al menos 1 año y preferentemente durante al menos 2 años. Por ejemplo, el grado de agregación durante el almacenamiento se puede usar como un indicador de la estabilidad de las proteínas. Por tanto, una formulación "estable" puede ser una en la que menos de aproximadamente un 10 % y preferentemente menos de aproximadamente un 5 % del conjugado anticuerpo-toxina está presente como un agregado en la formulación. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas están disponibles en la técnica y se revisan, por ejemplo, en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993).

El término "solución acuosa" se refiere a una solución en la que el agua es el medio de disolución o disolvente. Cuando una sustancia se disuelve en un líquido, la mezcla se denomina solución. La sustancia disuelta es el soluto y el líquido responsable de la disolución (en este caso, agua) es el disolvente.

El término "agente estabilizante" o "estabilizante", como se usa en el presente documento, es un producto químico o compuesto que se añade a una solución o mezcla o suspensión o composición o composición terapéutica para mantenerla en un estado estable o invariable; o es uno que se usa porque produce una reacción que implica cambios en los átomos o moléculas que dan lugar a un estado más estable o invariable.

El término "agregado" o "agregación", como se usa en el presente documento, significa agruparse o reunirse en una masa o un todo, por ejemplo, como en la agregación de péptidos, polipéptidos, anticuerpos o variantes de los mismos. Los agregados se pueden autoagregar o agregar debido a otros factores, por ejemplo, agentes de agregación, agentes de precipitación, agitación u otros medios y procedimientos, con lo que se provoca que los péptidos, polipéptidos, anticuerpos o variantes de los mismos se agrupen.

La agregación inducida por agitación es la formación de agregados en una solución que contiene conjugados anticuerpo-toxina inducida por agitación, donde la agitación es la puesta en movimiento por agitación enérgica o remoción.

Un anticuerpo que es "susceptible de agregación" es uno que se ha observado que se agrega a otra(s) molécula(s) de anticuerpo, especialmente tras la agitación.

Al "inhibir" la agregación inducida por agitación se pretende prevenir, reducir o disminuir la cantidad de agregación inducida por agitación, medida comparando la cantidad de agregado presente en una solución que contiene proteínas que comprende al menos un inhibidor de la agregación inducida por agitación con la cantidad de agregado presente en una solución que contiene conjugados anticuerpo-toxina que no comprende al menos un inhibidor de la agregación inducida por agitación.

Una cantidad "que inhibe la agregación inducida por agitación" de un alquilglucósido es la cantidad de ese alquilglucósido que inhibe de forma detectable la agregación inducida por agitación de una proteína en comparación con una proteína tratada idénticamente en ausencia del alquilglucósido.

Al "inhibir" o "prevenir" la oxidación se pretende reducir o disminuir la cantidad de oxidación, medida comparando la cantidad de oxidación presente en una solución que contiene proteínas que comprende al menos un inhibidor de la oxidación con la cantidad de oxidación presente en una solución que contiene conjugados anticuerpo-toxina que no comprende al menos un inhibidor de la oxidación.

Una cantidad "que previene la oxidación" de un alquilglucósido es la cantidad de ese alquilglucósido que inhibe o reduce de forma detectable la oxidación de un conjugado anticuerpo-toxina en comparación con una proteína tratada idénticamente en ausencia del alquilglucósido.

Los procedimientos que pueden encontrar uso en la presente invención para medir la agregación inducida por agitación y/o la oxidación de conjugados anticuerpo-toxina incluyen electroforesis en gel, isoelectroenfoque, electroforesis capilar, cromatografía, tal como cromatografía de exclusión por tamaño, cromatografía de intercambio iónico y cromatografía de líquidos de alto rendimiento en fase inversa, cartografía de péptidos, cartografía de oligosacáridos, espectrometría de masas, espectroscopia de absorbancia, espectroscopia de fluorescencia, espectroscopia por dicroísmo circular, calorimetría de valoración isotérmica, calorimetría diferencial de barrido, ultracentrifugación analítica, dispersión dinámica de la luz, proteólisis y reticulación, medición de la turbidez, ensayos de retardo de filtrado, ensayos inmunológicos, ensayos de unión con tinte fluorescente, ensayos de tinción de proteínas, microscopia y detección de agregados por medio de ELISA u otro ensayo de unión.

La "concentración micelar crítica" (CMC) es la concentración umbral en la que un tensioactivo se agrega en solución para formar grupos llamados micelas. Como se usa en el presente documento, los valores de CMC para cualquier tensioactivo particular se miden a 20-25 °C en agua, preferentemente a 25 °C en agua, y se pueden expresar en unidades de mM o p/v. Debido a que la formación de micelas a partir de monómeros constituyentes implica un equilibrio, se ha establecido la existencia de un estrecho intervalo de concentraciones para micelas, por debajo del cual la solución contiene cantidades insignificantes de micelas y por encima del cual prácticamente todo el tensioactivo adicional se encuentra en forma de micelas adicionales. Se ha preparado una recopilación de las CMC para cientos de compuestos en solución acuosa por Mukerjee, P. y Mysels, K.J. (1971) Critical Micelle Concentrations of Aqueous Surfactant Systems, NSRDS-NBS 36. Superintendent of Documents, U.S. Government Printing Office, Washington, DC. Véase también http://www.anatrace.com/docs/detergent_data.pdf.

Una técnica común usada para determinar la CMC es la medición directa de la tensión superficial de equilibrio como una función de la concentración de tensioactivo usando un tensiómetro de superficie. Otros procedimientos incluyen medir la intensidad de la luz dispersada, la solubilización de tintes fluorescentes, etc., como una función de la concentración de tensioactivo. Estas y otras de dichas técnicas son bien conocidas en la técnica y se emplean de forma rutinaria.

"Aislado", cuando se usa para describir los diversos conjugados anticuerpo-toxina divulgados en el presente documento, significa un conjugado anticuerpo-toxina que se ha identificado, separado y/o recuperado de un componente de su entorno de producción.

Los componentes contaminantes de su entorno de producción, tales como los que resultan de las células transfectadas recombinantes, son materiales que típicamente interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos para el polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteínicos o no proteínicos. En modos de realización preferentes, el polipéptido se purificará (1) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de la secuencia de aminoácidos N terminal o interna por el uso de un secuenciador de vaso giratorio, o (2) hasta homogeneidad por SDS-PAGE en condiciones no reductoras o reductoras usando tinción con azul de Coomassie o, preferentemente, plata. Habitualmente, sin embargo, un conjugado anticuerpo-toxina aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" que codifica los polipéptidos y anticuerpos en el presente documento es una molécula de ácido nucleico que se identifica y se separa de al menos una molécula de ácido nucleico contaminante con la que se asocia habitualmente en el entorno en el que se produjo. Preferentemente, el ácido nucleico aislado está libre de asociación con todos los componentes asociados con el entorno de producción. Las moléculas de ácido nucleico aislado que codifican los conjugados anticuerpo-toxina en el presente documento están en una forma distinta de la forma o ambiente en el que se encuentran en la naturaleza. Por lo tanto, las moléculas de ácido nucleico aislado se distinguen del ácido nucleico que codifica los conjugados anticuerpo-toxina en el presente documento en que existen de forma natural en las células.

El término "secuencias de control" se refiere a las secuencias de ADN necesarias para la expresión de una secuencia codificante enlazada de forma funcional en un organismo huésped particular. Las secuencias de control que son adecuadas para los procariotas, por ejemplo, incluyen un promotor, opcionalmente una secuencia de operador y un sitio de unión a ribosoma. Es conocido que las células eucariotas utilizan promotores, señales de poliadenilación y potenciadores.

El ácido nucleico está "enlazado de forma funcional" cuando se dispone en una relación funcional con otra secuencia de ácido nucleico. Por ejemplo, el ADN para una presecuencia o líder secretor está enlazado de forma funcional al ADN para un polipéptido si se expresa como una preproteína que participa en la secreción del polipéptido; un promotor o potenciador está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si afecta a la transcripción de la secuencia; o un sitio de unión a ribosoma está enlazado de forma funcional a una secuencia codificante si se sitúa para que facilite la traducción. En general, "enlazado de forma funcional" significa que las secuencias de ADN que están enlazadas son contiguas y, en el caso de una secuencia líder secretora, son contiguas y están en fase de lectura. Sin embargo, los potenciadores no tienen que ser contiguos. El enlace se logra mediante fijación en sitios de restricción convenientes. Si dichos sitios no existen, se usan los adaptadores o conectores de oligonucleótidos sintéticos de acuerdo con la práctica convencional.

Como se usa en el presente documento, el término "inmunoadhesina" designa moléculas similares a anticuerpo que combinan la especificidad de unión de una proteína heteróloga (una "adhesina") con las funciones efectoras de los dominios constantes de inmunoglobulina. Estructuralmente, las inmunoadhesinas comprenden una fusión de una secuencia de aminoácidos con la especificidad de unión deseada que es distinta del sitio de reconocimiento y unión a antígeno de un anticuerpo (es decir, es "heteróloga"), y una secuencia de dominio constante de inmunoglobulina. La parte de adhesina de una molécula de inmunoadhesina típicamente es una secuencia de aminoácidos contiguos que comprende al menos el sitio de unión de un receptor o un ligando. Se puede obtener la secuencia del dominio constante de inmunoglobulina en la inmunoadhesina de cualquier inmunoglobulina, tal como los subtipos IgG-1, IgG-2, IgG-3 o IgG-4, IgA (incluyendo IgA-1 e IgA-2), IgE, IgD o IgM. Las fusiones de Ig incluyen preferentemente la sustitución de un dominio de un polipéptido o anticuerpo descrito en el presente

documento en lugar de al menos una región variable dentro de una molécula de Ig. En un modo de realización preferente en particular, la fusión de inmunoglobulina incluye las regiones bisagra, CH2 y CH3, o las bisagra, CH1, CH2 y CH3, de una molécula de IgG1. Para la producción de fusiones de inmunoglobulina, véase también la patente de EE. UU. n.º 5.428.130 concedida el 27 de junio de 1995.

Una formulación "isotónica" es una que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán en general una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. El término "hipotónico" describe una formulación con una presión osmótica por debajo de la de la sangre humana. De forma correspondiente, se usa el término "hipertónico" para describir una formulación con una presión osmótica por encima de la de la sangre humana. La isotonicidad se puede medir usando un osmómetro de tipo presión de vapor o congelación de hielo, por ejemplo. Las formulaciones de la presente invención son hipertónicas como resultado de la adición de sal y/o tampón.

Una formulación "reconstituida" es una que se ha preparado disolviendo una formulación de proteínas o anticuerpos liofilizada en un diluyente de modo que la proteína se disperse en la formulación reconstituida. La formulación reconstituida es adecuada para su administración (por ejemplo, administración parenteral) a un paciente que se va a tratar con la proteína de interés y, en determinados modos de realización de la invención, puede ser una que sea adecuada para su administración subcutánea.

Un "ácido farmacéuticamente aceptable" incluye ácidos inorgánicos y orgánicos que no sean tóxicos a la concentración y de la manera en la que se formulan. Por ejemplo, los ácidos inorgánicos adecuados incluyen clorhídrico, perclórico, bromhídrico, yodhídrico, nítrico, sulfúrico, sulfónico, sulfánico, sulfanílico, fosfórico, carbónico, etc. Los ácidos orgánicos adecuados incluyen mono, di y tricarbóxico, insaturado, saturado, heterocíclico, arilalifático, cicloalifático, cíclico, aromático, con alquilo de cadena lineal y ramificada, incluyendo, por ejemplo, fórmico, acético, 2-hidroxiacético, trifluoroacético, fenilacético, trimetilacético, t-butilacético, antranílico, propanoico, 2-hidroxiopropanoico, 2-oxopropanoico, propandioico, ciclopentanopropiónico, ciclopentanopropiónico, 3-fenilpropiónico, butanoico, butandioico, benzoico, 3-(4-hidroxibenzoil)benzoico, 2-acetoxi-benzoico, ascórbico, cinámico, lauril sulfúrico, esteárico, mucónico, mandélico, succínico, embónico, fumárico, málico, maleico, hidroximaleico, malónico, láctico, cítrico, tartárico, glicólico, glicónico, glucónico, pirúvico, glioxálico, oxálico, mesílico, succínico, salicílico, ftálico, palmoico, palmeico, tiociánico, metanosulfónico, etanosulfónico, 1,2-etanodisulfónico, 2-hidroxietanosulfónico, bencenosulfónico, 4-clorobencenosulfónico, naftaleno-2-sulfónico, p-toluenosulfónico, alcanforsulfónico, 4-metilbiciclo[2.2.2]-oct-2-eno-1-carboxílico, glucoheptónico, ácido 4,4'-metilenbis-3-(hidroxi-2-eno-1-carboxílico), hidroxinaftoico.

Las "bases farmacéuticamente aceptables" incluyen bases inorgánicas y orgánicas que no sean tóxicas a la concentración y de la manera en la que se formulan. Por ejemplo, las bases adecuadas incluyen las formadas a partir de metales formadores de bases inorgánicas tales como litio, sodio, potasio, magnesio, calcio, amonio, hierro, cinc, cobre, manganeso, aluminio, N-metilglucamina, morfina, piperidina y bases orgánicas no tóxicas que incluyen, amina primaria, secundaria y terciaria, aminas sustituidas, aminas cíclicas y resinas básicas de intercambio iónico, [por ejemplo, N(R')₄⁺ (donde R' es independientemente H o alquilo C₁₋₄, por ejemplo, amonio, Tris)], por ejemplo, isopropilamina, trimetilamina, dietilamina, trietilamina, tripropilamina, etanolamina, 2-dietilaminoetanol, trimetamina, dicitlohexilamina, lisina, arginina, histidina, cafeína, procaina, hidrabamina, colina, betaína, etilendiamina, glucosamina, metilglucamina, teobromina, purinas, piperacina, piperidina, N-etilpiperidina, resinas de poliamina y similares. Las bases orgánicas no tóxicas preferentes en particular son isopropilamina, dietilamina, etanolamina, trimetamina, dicitlohexilamina, colina y cafeína.

Los ácidos y bases farmacéuticamente aceptables adicionales utilizables con la presente invención incluyen los que se derivan de los aminoácidos, por ejemplo, histidina, glicina, fenilalanina, ácido aspártico, ácido glutámico, lisina y asparagina.

Los tampones y sales "farmacéuticamente aceptables" incluyen los derivados tanto de sales de adición de ácido como de base de los ácidos y bases indicados anteriormente. Los tampones y/o sales específicos incluyen histidina, succinato y acetato.

Un "lioprotector" es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, previene o reduce significativamente la inestabilidad fisicoquímica de la proteína tras su liofilización y posterior almacenamiento. Los lioprotectores ejemplares incluyen glúcidos y sus correspondientes alditoles; un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaína; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alditoles trihídricos o de peso molecular más alto, por ejemplo, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitól, xilitól, sorbitol y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; Pluronic®; y combinaciones de los mismos. Los lioprotectores ejemplares adicionales incluyen glicerina y gelatina, y los glúcidos melibiosa, melecitosa, rafinosa, manotriosa y estaquiosa. Los ejemplos de glúcidos reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, isomaltulosa y lactulosa. Los ejemplos de glúcidos no reductores incluyen glucósidos no reductores de compuestos polihidroxilados seleccionados de alditoles y otros polialcoholes de cadena lineal. Los alditoles preferentes son monoglucósidos, especialmente los compuestos obtenidos por reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo lateral glucosídico puede ser glucosídico o bien galactosídico. Los

ejemplos adicionales de alditos son glucitol, maltitol, lactitol e isomaltulosa. Los lioprotectores preferentes son los glúcidos no reductores trehalosa o sacarosa.

El lioprotector se añade a la formulación preliofilizada en una "cantidad lioprotectora", lo que significa que, tras la liofilización de la proteína en presencia de la cantidad lioprotectora del lioprotector, la proteína retiene esencialmente su estabilidad fisicoquímica tras su liofilización y almacenamiento.

Un "glúcido farmacéuticamente aceptable" es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, previene o reduce significativamente la inestabilidad fisicoquímica de la proteína tras el almacenamiento. Cuando se pretende liofilizar la formulación y, a continuación, reconstituir, los "glúcidos farmacéuticamente aceptables" también se pueden conocer como "lioprotectores". Los glúcidos ejemplares y sus alditos correspondientes incluyen: un aminoácido tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina tal como betaína; una sal liotrópica tal como sulfato de magnesio; un poliol tal como alditos trihídricos o de peso molecular más alto, por ejemplo, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitól, xilitol, sorbitol y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; Pluronic®; y combinaciones de los mismos. Los lioprotectores ejemplares adicionales incluyen glicerina y gelatina, y los glúcidos melibiosa, melecitosa, rafinosa, manotriosa y estaquiosa. Los ejemplos de glúcidos reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, isomaltulosa y lactulosa. Los ejemplos de glúcidos no reductores incluyen glucósidos no reductores de compuestos polihidroxilados seleccionados de alditos y otros polialcoholes de cadena lineal. Los alditos preferentes son monoglucósidos, especialmente los compuestos obtenidos por reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa. El grupo lateral glucosídico puede ser glucosídico o bien galactosídico. Los ejemplos adicionales de alditos son glucitol, maltitol, lactitol e isomaltulosa. Los glúcidos farmacéuticamente aceptables preferentes son los glúcidos no reductores trehalosa o sacarosa.

Los glúcidos farmacéuticamente aceptables se añaden a la formulación en una "cantidad protectora" (por ejemplo, preliofilización), lo que significa que la proteína retiene esencialmente su estabilidad fisicoquímica durante el almacenamiento (por ejemplo, después de su reconstitución y almacenamiento).

El "diluyente" de interés en el presente documento es uno que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para su administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida después de su liofilización. Los diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyectables (BWFI), una solución de pH tamponado (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. En un modo de realización alternativo, los diluyentes pueden incluir soluciones acuosas de sales y/o tampones.

Un "conservante" es un compuesto que se puede añadir a las formulaciones en el presente documento para reducir la actividad bacteriana. La adición de un conservante, por ejemplo, puede facilitar la producción de una formulación de usos múltiples (dosis múltiples). Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametONIO, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. El conservante más preferente en el presente documento es alcohol bencílico.

"Tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan tratamiento incluyen aquellos que ya presentan el trastorno, así como aquellos en los que se va a prevenir el trastorno.

"Mamífero" para propósitos de tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para la práctica de deportes o mascotas, tales como perros, caballos, conejos, ganado bovino, cerdos, hámsteres, jerbos, ratones, hurones, ratas, gatos, etc. Preferentemente, el mamífero es un ser humano.

Un "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el conjugado anticuerpo-toxina. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas, incluyendo las afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se van a tratar en el presente documento incluyen carcinomas e inflamaciones.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es al menos la concentración mínima requerida para lograr una mejora o prevención mensurables de un trastorno particular. Las cantidades terapéuticamente eficaces de proteínas conocidas se conocen bien en la técnica, si bien las cantidades eficaces de conjugados anticuerpo-toxina descubiertas a continuación en el presente documento se pueden determinar por técnicas estándar que están totalmente dentro de la experiencia de un experto en la técnica, tal como un médico normal.

Los procedimientos para la preparación de anticuerpos (incluyendo los anticuerpos que se conjugan con una toxina) y otras proteínas que se pueden formular como se describe en el presente documento se conocen bien en la técnica y se describen en detalle, por ejemplo, en el documento WO2007/001851.

Los anticuerpos y otros conjugados anticuerpo-toxina se pueden formular de acuerdo con la presente invención en forma acuosa o bien liofilizada, siendo esta última apta si se reconstituye en una forma acuosa.

5 Las formulaciones descritas en el presente documento se pueden preparar como formulaciones liofilizadas reconstituidas. Los conjugados anticuerpo-toxina descritos en el presente documento se liofilizan y, a continuación, se reconstituyen para producir las formulaciones líquidas de la invención. En este modo de realización particular, después de la preparación de la proteína de interés como se describe anteriormente, se produce una "formulación preliofilizada". La cantidad de proteína presente en la formulación preliofilizada se determina teniendo en cuenta
10 los volúmenes de dosis, modo(s) de administración, etc. deseados. Por ejemplo, la concentración inicial de un anticuerpo intacto puede ser de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, preferentemente de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml y lo más preferentemente de aproximadamente 20-30 mg/ml.

15 El conjugado anticuerpo-toxina que se va a formular está, en general, presente en solución. Por ejemplo, en las formulaciones líquidas de la invención, la proteína puede estar presente en una solución de pH tamponado a un pH de aproximadamente 4-8, y preferentemente de aproximadamente 5-7. La concentración de tampón puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, de forma alternativa de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 15 mM, dependiendo, por ejemplo, del tampón y de la tonicidad deseada de la formulación (por ejemplo, de la formulación reconstituida). Los tampones y/o sales ejemplares son aquellos que son farmacéuticamente aceptables y se pueden crear a partir de ácidos, bases y sales de los mismos adecuados, tales como los que se definen como ácidos, bases o tampones "farmacéuticamente aceptables".

25 En un modo de realización se añade un lioprotector a la formulación preliofilizada. La cantidad de lioprotector en la formulación preliofilizada es tal que, en general, tras su reconstitución, la formulación resultante será isotónica. Sin embargo, las formulaciones reconstituidas hipertónicas también pueden ser adecuadas. Además, la cantidad de lioprotector no debe ser demasiado baja de modo que se produzca una cantidad inaceptable de degradación/agregación de la proteína tras su liofilización. Sin embargo, las concentraciones de lioprotector ejemplares en la formulación preliofilizada son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM, de forma
30 alternativa de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM, de forma alternativa de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM. Los lioprotectores ejemplares incluyen glúcidos y alditos tales como sacarosa, manosa, trehalosa, glucosa, sorbitol, manitol. Sin embargo, en circunstancias particulares, determinados lioprotectores también pueden contribuir a un incremento de la viscosidad de la formulación. Como tal, se debe tener cuidado para seleccionar lioprotectores particulares que minimicen o neutralicen este efecto. Se describen
35 lioprotectores adicionales anteriormente en la definición de "lioprotectores", también denominados en el presente documento "glúcidos farmacéuticamente aceptables".

La proporción de conjugado anticuerpo-toxina con respecto a lioprotector puede variar para cada combinación particular de proteína o anticuerpo y lioprotector. En el caso de un anticuerpo como la proteína de elección y un
40 glúcido (por ejemplo, sacarosa o trehalosa) como el lioprotector para generar una formulación reconstituida isotónica con una alta concentración de proteína, la proporción molar de lioprotector con respecto a anticuerpo puede ser de aproximadamente 100 a aproximadamente 1500 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo, y preferentemente de aproximadamente 200 a aproximadamente 1000 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo, por ejemplo de aproximadamente 200 a aproximadamente 600 moles de lioprotector a 1 mol de anticuerpo.

45 Se puede usar una mezcla del lioprotector (tal como sacarosa o trehalosa) y un agente de relleno (por ejemplo, manitol o glicina) en la preparación de la formulación de preliofilización. El agente de relleno puede permitir la producción de una torta liofilizada uniforme sin cavidades excesivas en la misma, etc. Otros vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos en *Remington's Pharmaceutical Sciences*
50 16.^a edición, Osol, A. Ed. (1980) se pueden incluir en la formulación preliofilizada (y/o la formulación liofilizada y/o la formulación reconstituida) siempre que no afecten de forma adversa a las características deseadas de la formulación. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen: agentes de tamponamiento adicionales; conservantes; codisolventes; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA;
55 complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sal tales como sodio.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un conjugado anticuerpo-toxina según sea necesario para la indicación particular que se está tratando, preferentemente aquellas con actividades
60 complementarias que no afecten de forma adversa a la otra proteína. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar dos o más anticuerpos que se unan a la diana deseada (por ejemplo, receptor o antígeno) en una única formulación. Dichos conjugados anticuerpo-toxina están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito pretendido.

65 Las formulaciones que se van a usar para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de o después de la liofilización y reconstitución.

De forma alternativa, la esterilidad de toda la mezcla se puede conseguir por esterilización en autoclave de los ingredientes, excepto para proteína, a aproximadamente 120 °C durante aproximadamente 30 minutos, por ejemplo.

Después de que se mezclen entre sí el conjugado anticuerpo-toxina, el lioprotector opcional y otros componentes opcionales, la formulación se liofiliza. Están disponibles muchos liofilizadores diferentes para este propósito, tales como los liofilizadores Hull50™ (Hull, EE. UU.) o GT20™ (Leybold-Heraeus, Alemania). La liofilización se consigue congelando la formulación y posteriormente sublimando el hielo del contenido congelado a una temperatura adecuada para el secado primario. En esta condición, la temperatura del producto está por debajo del punto eutéctico o la temperatura de destrucción de la formulación. Típicamente, la temperatura de la bandeja para el secado primario variará de aproximadamente -30 a 25 °C (siempre que el producto permanezca congelado durante el secado primario) a una presión adecuada, que varíe típicamente de aproximadamente 50 a 250 mTorr. La formulación, el tamaño y el tipo del recipiente que contiene la muestra (por ejemplo, vial de vidrio) y el volumen de líquido determinarán principalmente el tiempo requerido para el secado, que puede variar desde unas pocas horas hasta varios días (por ejemplo, 40-60 h). Opcionalmente, también se puede realizar una fase de secado secundario dependiendo del nivel de humedad residual deseado en el producto. La temperatura a la que se lleva a cabo el secado secundario varía de aproximadamente 0 a 40 °C, dependiendo principalmente del tipo y tamaño del recipiente y del tipo de proteína empleada. Por ejemplo, la temperatura de la bandeja durante toda la fase de eliminación de agua de la liofilización puede ser de aproximadamente 15-30 °C (por ejemplo, aproximadamente 20 °C). El tiempo y la presión requeridos para el secado secundario serán los que produzcan una torta liofilizada adecuada, dependiente, por ejemplo, de la temperatura y otros parámetros. El tiempo de secado secundario dicta el nivel de humedad residual deseado en el producto y típicamente requiere al menos aproximadamente 5 horas (por ejemplo, 10-15 horas). La presión puede ser la misma que la empleada durante la etapa de secado primario. Las condiciones de liofilización se pueden variar dependiendo de la formulación y del tamaño del vial.

Antes de la administración al paciente, la formulación liofilizada se reconstituye con un diluyente farmacéuticamente aceptable, de modo que la concentración de conjugado anticuerpo-toxina en la formulación reconstituida sea al menos aproximadamente de 50 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 50 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml, de forma alternativa de aproximadamente 80 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml, de forma alternativa de aproximadamente 90 mg/ml a aproximadamente 150 mg/ml. Se considera que dichas altas concentraciones de conjugado anticuerpo-toxina en la formulación reconstituida son útiles en particular si se pretende la administración subcutánea de la formulación reconstituida. Sin embargo, para otras vías de administración, tales como administración intravenosa, se pueden desear concentraciones menores del conjugado anticuerpo-toxina en la formulación reconstituida (por ejemplo, de aproximadamente 5-50 mg/ml, o de aproximadamente 10-40 mg/ml de proteína en la formulación reconstituida). En determinados modos de realización, la concentración de conjugado anticuerpo-toxina en la formulación reconstituida es significativamente más alta que en la formulación preliofilizada. Por ejemplo, la concentración de conjugado anticuerpo-toxina en la formulación reconstituida puede ser de aproximadamente 2-40 veces, de forma alternativa de 3-10 veces, de forma alternativa de 3-6 veces (por ejemplo, al menos tres veces o al menos cuatro veces) la de la formulación preliofilizada.

La reconstitución tiene lugar, en general, a una temperatura de aproximadamente 25 °C para garantizar una hidratación completa, aunque se pueden emplear otras temperaturas según se desee. El tiempo requerido para la reconstitución dependerá, por ejemplo, del tipo de diluyente, la cantidad de excipiente(s) y la proteína. Los diluyentes ejemplares incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyectables (BWHI), una solución de pH tamponado (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. El diluyente contiene opcionalmente un conservante. Los conservantes ejemplares se han descrito anteriormente, siendo los alcoholes aromáticos, tales como alcohol bencílico o fenol, los conservantes preferentes. La cantidad de conservante empleado se determina evaluando diferentes concentraciones de conservante para pruebas de compatibilidad con la proteína y eficacia del conservante. Por ejemplo, si el conservante es un alcohol aromático (tal como alcohol bencílico), puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 0,1-2,0 % y preferentemente de aproximadamente 0,5-1,5 %, pero lo más preferentemente de aproximadamente 1,0-1,2 %.

Preferentemente, la formulación reconstituida tiene menos de 6000 partículas por vial que tienen un tamaño de $\geq 10 \mu\text{m}$.

Las formulaciones terapéuticas se preparan para su almacenamiento mezclando el ingrediente activo que tiene el grado de pureza deseado con vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables opcionales (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 18.^a edición, Mack Publishing Co., Easton, Pa. 18042 [1990]). Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen tampones, antioxidantes que incluyen ácido ascórbico, metionina, vitamina E, metabisulfito de sodio, conservantes, isotonicificadores, estabilizantes, complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína) y/o agentes quelantes tales como EDTA.

Cuando el agente terapéutico es un fragmento de anticuerpo, es preferente el fragmento más pequeño que se une

específicamente al dominio de unión de la proteína diana. Por ejemplo, en base a las secuencias de la región variable de un anticuerpo, se pueden diseñar fragmentos de anticuerpo o incluso moléculas peptídicas que retienen la capacidad de unirse a la secuencia de la proteína diana. Dichos péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producir por tecnología de ADN recombinante (véase, por ejemplo, Marasco *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 7889-7893 [1993]).

Se usan tampones para controlar el pH en un intervalo que optimiza la eficacia terapéutica, especialmente si la estabilidad es dependiente del pH. Los tampones están presentes preferentemente a concentraciones que varían de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM. Los agentes tamponadores adecuados para su uso con la presente invención incluyen tanto ácidos orgánicos como inorgánicos y sales de los mismos. Por ejemplo, citrato, fosfato, succinato, tartrato, fumarato, gluconato, oxalato, lactato, acetato. Adicionalmente, los tampones pueden estar compuestos de sales de histidina y trimetilamina, tales como Tris.

Se añaden conservantes para retardar el crecimiento microbiano y están típicamente presentes en un intervalo de 0,2 %-1,0 % (p/v). Los conservantes adecuados para su uso con la presente invención incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; haluros de benzalconio (por ejemplo, cloruro, bromuro, yoduro), cloruro de bencetonio; timerosal, fenol, alcohol butílico o bencilico; alquilparabenos tales como metil o propilparabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol.

Los agentes de tonicidad, a veces conocidos como "estabilizantes" están presentes para ajustar o mantener la tonicidad de una composición líquida. Cuando se usan con biomoléculas grandes cargadas, tales como proteínas y anticuerpos, a menudo se denominan "estabilizantes" debido a que pueden interactuar con los grupos cargados de las cadenas laterales de aminoácidos, disminuyendo de este modo la posibilidad de que se produzcan interacciones inter e intramoleculares. Los agentes de tonicidad pueden estar presentes en cualquier cantidad entre un 0,1 % a un 25 % en peso, preferentemente de un 1 a un 5 %, teniendo en cuenta las cantidades relativas de los demás ingredientes. Los agentes de tonicidad preferentes incluyen alditoles polihídricos, preferentemente alditoles trihídricos o superiores, tales como glicerina, eritritol, arabitol, xilitol, sorbitol y manitol.

Los excipientes adicionales incluyen agentes que pueden servir como uno o más de los siguientes: (1) agentes de relleno, (2) potenciadores de la solubilidad, (3) estabilizantes y (4) agentes que previenen la desnaturalización o adherencia a la pared del recipiente. Dichos excipientes incluyen: alditoles polihídricos (enumerados anteriormente); aminoácidos tales como alanina, glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, lisina, ornitina, leucina, 2-fenilalanina, ácido glutámico, treonina, etc.; glúcidos orgánicos o alditoles tales como sacarosa, lactosa, lactitol, trehalosa, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioinositosa, mioinisol, galactosa, galactitol, glicerol, ciclitols (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como urea, glutatión, ácido tiótico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, α -monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular tales como seroalbúmina humana, seroalbúmina bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; monosacáridos (por ejemplo, xilosa, manosa, fructosa, glucosa); disacáridos (por ejemplo, lactosa, maltosa, sacarosa); trisacáridos tales como rafinosa; y polisacáridos tales como dextrina o dextrano.

Las formulaciones deben ser estériles a fin de usarse para administración *in vivo*. La formulación se puede hacer estéril por filtración a través de membranas de filtración estériles. Las composiciones terapéuticas en el presente documento se disponen, en general, en un recipiente que tiene un orificio de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o vial que tenga un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica.

La vía de administración es de acuerdo con los procedimientos conocidos y aceptados, tales como por inyección intravenosa rápida o infusión única o múltiple durante un período de tiempo prolongado de una manera adecuada, por ejemplo, inyección o infusión por vías subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, intramuscular, intrarterial, intralesional o intrarticular, administración tópica, inhalación o por medios de liberación mantenida o de liberación prolongada.

La formulación en el presente documento también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se trata, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se vean afectadas de forma adversa entre sí. De forma alternativa o además, la composición puede comprender un agente citotóxico, citocina o agente inhibidor del crecimiento. Dichas moléculas están presentes de forma adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

Los ingredientes activos también se pueden atrapar en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, microcápsulas de hidroximetilcelulosa o gelatina y microcápsulas de poli(metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 18.^a edición, *supra*.

Se pueden preparar preparaciones de liberación mantenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación mantenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el

anticuerpo, en las que dichas matrices se encuentran en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación mantenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE. UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, copolímeros de etileno-acetato de vinilo no degradables, de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico). La microencapsulación de proteínas recombinantes para liberación mantenida se ha realizado con éxito con hormona del crecimiento humana (rhGH), interferón-(rhIFN-), interleucina-2 y MN rpg 120. Johnson *et al.*, *Nat. Med.* 2: 795-799 (1996); Yasuda *et al.*, *Biomed. Ther.* 27: 1221-1223 (1993); Hora *et al.*, *Bio/Technology* 8: 755-758 (1990); Cleland, "Design and Production of Single Immunization Vaccines Using Polylactide Polyglycolide Microsphere Systems", en *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach*, Powell y Newman, eds., (Plenum Press: Nueva York, 1995), pp. 439-462; documentos WO 97/03692; WO 96/40072; WO 96/07399; y patente de EE. UU. n.º 5.654.010.

Las formulaciones de liberación mantenida de estas proteínas se pueden desarrollar usando un polímero de poli(ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) debido a su biocompatibilidad y su amplia gama de propiedades biodegradables. Los productos de degradación de PLGA, ácidos láctico y glicólico, se pueden eliminar rápidamente dentro del cuerpo humano. Además, la degradabilidad de este polímero se puede ajustar de meses a años, dependiendo de su peso molecular y composición. Lewis, "Controlled release of bioactive agents from lactide/glycolide polymer", en *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (Marcel Dekker; Nueva York, 1990), M. Chasin y R. Langer (Eds.) pp. 1-41.

Aunque polímeros tales como etileno-acetato de vinilo y ácido láctico-ácido glicólico posibilitan la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando los anticuerpos encapsulados permanecen en el cuerpo durante un largo periodo de tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, lo que da como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para su estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de enlaces S-S intermoleculares a través del intercambio tio-disulfuro, la estabilización se puede lograr modificando los residuos de sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

También se pueden usar composiciones liposómicas o proteínoides para formular los conjugados anticuerpo-toxina divulgados en el presente documento. Véanse las patentes de EE. UU. n.ºs 4.925.673 y 5.013.556.

La estabilidad de los conjugados anticuerpo-toxina descritos en el presente documento se puede potenciar a través del uso de "sales metálicas polivalentes solubles en agua" no tóxicas. Los ejemplos incluyen Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Sn^{2+} , Sn^{3+} , Al^{2+} y Al^{3+} . Los ejemplos de aniones que pueden formar sales solubles en agua con los cationes metálicos polivalentes anteriores incluyen los formados a partir de ácidos inorgánicos y/o ácidos orgánicos. Dichas sales solubles en agua tienen una solubilidad en agua (a 20 °C) de al menos aproximadamente 20 mg/ml, de forma alternativa de al menos aproximadamente 100 mg/ml, de forma alternativa de al menos aproximadamente 200 mg/ml.

Los ácidos inorgánicos adecuados que se pueden usar para formar las "sales metálicas polivalentes solubles en agua" incluyen ácido clorhídrico, acético, sulfúrico, nítrico, tiocianico y fosfórico. Los ácidos orgánicos adecuados que se pueden usar incluyen ácido carboxílico alifático y ácidos aromáticos. Los ácidos alifáticos dentro de esta definición se pueden definir como ácidos carboxílicos C_{2-9} saturados o insaturados (por ejemplo, ácidos mono-, di- y tricarboxílicos alifáticos). Por ejemplo, los ácidos monocarboxílicos ejemplares dentro de esta definición incluyen los ácidos monocarboxílicos C_{2-9} saturados acético, propiónico, butírico, valérico, caproico, enántico, caprílico, pelargónico y capríónico, y los ácidos monocarboxílicos C_{2-9} insaturados ácidos acrílico, propiólico, metacrílico, crotónico e isocrotónico. Los ácidos dicarboxílicos ejemplares incluyen los ácidos dicarboxílicos C_{2-9} saturados malónico, succínico, glutárico, adípico y pimélico, mientras que los ácidos dicarboxílicos C_{2-9} insaturados incluyen los ácidos maléico, fumárico, citracónico y mesacónico. Los ácidos tricarboxílicos ejemplares incluyen los ácidos tricarboxílicos C_{2-9} saturados ácido tricarbálico y 1,2,3-butanotricarboxílico. Adicionalmente, los ácidos carboxílicos de esta definición también pueden contener uno o dos grupos hidroxilo para formar ácidos hidroxicarboxílicos. Los ácidos hidroxicarboxílicos ejemplares incluyen ácido glicólico, láctico, glicérico, tartrónico, málico, tartárico y cítrico. Los ácidos aromáticos dentro de esta definición incluyen ácido benzoico y salicílico.

Las sales metálicas polivalentes solubles en agua comúnmente empleadas que se pueden usar para ayudar a estabilizar los polipéptidos encapsulados de la presente invención incluyen, por ejemplo: (1) las sales metálicas de ácidos inorgánicos de haluros (por ejemplo, cloruro de cinc, cloruro de calcio), sulfatos, nitratos, fosfatos y tiocianatos; (2) las sales metálicas de ácidos carboxílicos alifáticos (por ejemplo, acetato de calcio, acetato de cinc, propionato de calcio, glicolato de cinc, lactato de calcio, lactato de cinc y tartrato de cinc); y (3) las sales metálicas de ácidos carboxílicos aromáticos de benzoatos (por ejemplo, benzoato de cinc) y salicilatos.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosificación apropiada de un agente activo dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, como se define anteriormente, de la gravedad y evolución de la enfermedad, de si el agente se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis y respuesta del paciente al agente y del criterio del médico especialista. El agente se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos.

El procedimiento de la invención se puede combinar con procedimientos conocidos de tratamiento para un trastorno, como etapas de tratamientos combinados o adicionales o bien como componentes adicionales de una formulación terapéutica.

Las dosificaciones y la concentración de fármaco deseada de las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo del uso particular concebido. La determinación de la dosificación o vía de administración apropiadas está completamente dentro de la experiencia de un experto en la técnica. Los experimentos con animales proporcionan una orientación fiable para la determinación de las dosis eficaces para el tratamiento en seres humanos. El ajuste a escala entre especies de las dosis eficaces se puede realizar siguiendo los principios establecidos por Mordenti, J. y Chappell, W. "The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics", en *Toxicokinetics and New Drug Development*, Yacobi *et al.*, Eds, Pergamon Press, Nueva York 1989, pp. 42-46.

Cuando se usa la administración *in vivo* de los conjugados anticuerpo-toxina descritos en el presente documento, las cantidades de dosificación normales pueden variar de aproximadamente 10 ng/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal de mamífero o más por día, preferentemente de aproximadamente 1 mg/kg/día a 10 mg/kg/día, dependiendo de la vía de administración. En la literatura se proporciona orientación sobre dosificaciones y procedimientos de administración particulares; véanse, por ejemplo, las patentes de EE. UU. n.º 4.657.760; 5.206.344; o 5.225.212. Está dentro del alcance de la invención que diferentes formulaciones sean eficaces para diferentes tratamientos y diferentes trastornos, y que la administración que pretende tratar un órgano o tejido específico pueda necesitar la administración de una manera diferente de la de otro órgano o tejido. Además, se pueden administrar dosificaciones por una o más administraciones separadas o por infusión continua. Para administraciones repetidas durante varios días o más, dependiendo de la afección, se prolonga el tratamiento hasta que se produzca una supresión deseada de los síntomas de la enfermedad. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. La evolución de este tratamiento se monitoriza fácilmente por técnicas y ensayos convencionales.

Las formulaciones de la presente invención, que incluyen pero no se limitan a formulaciones reconstituidas, se administran a un mamífero que necesita tratamiento con la proteína, preferentemente un ser humano, de acuerdo con procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa como una inyección intravenosa rápida o por infusión continua durante un período de tiempo, por vías intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intrarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación.

En modos de realización preferentes, las formulaciones se administran al mamífero por administración subcutánea (es decir, debajo de la piel). Para dichos propósitos, la formulación se puede inyectar usando una jeringa. Sin embargo, otros dispositivos para la administración de la formulación están disponibles, tales como dispositivos de inyección (por ejemplo, los dispositivos Inject-ease™ y Genject™); plumas de inyección (tales como la GenPen™); dispositivos de autoinyección, dispositivos sin aguja (por ejemplo, MediJector™ y BioJector™); y sistemas de administración de parches subcutáneos.

En un modo de realización específico, la presente invención se dirige a kits para una unidad de administración de dosis única. Dichos kits comprenden un recipiente de una formulación acuosa de conjugado anticuerpo-toxina terapéutico, que incluye jeringas precargadas tanto de cámara única como de cámaras múltiples. Las jeringas precargadas ejemplares están disponibles de Vetter GmbH, Ravensburg, Alemania.

La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") del conjugado anticuerpo-toxina dependerá, por ejemplo, de la afección que se va a tratar, de la gravedad y evolución de la afección, de si el conjugado anticuerpo-toxina se administra para propósitos preventivos o terapéuticos, del tratamiento previo, de la anamnesis y respuesta del paciente al conjugado anticuerpo-toxina, del tipo de proteína usada y del criterio del médico especialista. El conjugado anticuerpo-toxina se administra de forma adecuada al paciente de una vez o durante una serie de tratamientos y se puede administrar al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. El conjugado anticuerpo-toxina se puede administrar como el tratamiento único o junto con otros fármacos o tratamientos útiles en el tratamiento de la afección en cuestión.

Si la proteína de elección es un conjugado anticuerpo-toxina, de aproximadamente 0,1-20 mg/kg es una dosificación inicial candidata para su administración al paciente, ya sea, por ejemplo, por una o más administraciones separadas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. La evolución de este tratamiento se monitoriza fácilmente por técnicas convencionales.

En otro modo de realización de la invención se proporciona un artículo de fabricación que contiene la formulación

y proporciona preferentemente instrucciones para su uso. El artículo de fabricación comprende un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, frascos, viales (por ejemplo, viales de doble cámara), jeringas (tales como jeringas de cámara simple o de doble cámara) y tubos de ensayo. El recipiente se puede formar a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio o plástico. La etiqueta, que está en, o asociada con, el recipiente que contiene la formulación puede indicar instrucciones para su reconstitución y/o uso. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o se pretende usar para administración subcutánea. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial multiuso, que permite administraciones repetidas (por ejemplo, de 2-6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado (por ejemplo, BWFI). Tras mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración de proteínas final en la formulación reconstituida será, en general, de al menos 50 mg/ml. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos del envase con instrucciones para su uso.

Solo los ejemplos que divulgan los rasgos característicos de las reivindicaciones no son ejemplos comparativos:

EJEMPLO COMPARATIVO 1: Investigación de alquilglucósidos como tensioactivos no iónicos para evitar la agregación de proteínas/anticuerpos

Este ejemplo ilustra el uso de alquilglucósidos como tensioactivos no iónicos para prevenir la agregación de anticuerpos en solución acuosa. Se evaluó la acción protectora de diversos alquilglucósidos y polisorbato 20 frente a la agregación inducida por agitación de diversos anticuerpos monoclonales en solución usando dos formas diferentes de agitación: agitación energética y remoción.

Agregación inducida por agitación energética

En este conjunto de estudios, se sometió una solución tamponada (tampón fosfato de sodio 20 mM, pH 7,4) de anticuerpo monoclonal a agitación energética en un agitador orbital a 150 rpm, a una temperatura controlada de 37 °C. Estos estudios se llevaron a cabo usando 3 ml de la solución de anticuerpos en un vial de vidrio de 6 cm³. Se extrajeron muestras a intervalos regulares y se analizaron para determinar el porcentaje de monómeros usando cromatografía de exclusión por tamaño. Se evaluaron diversos tensioactivos de la clase de alquilglucósidos en cuanto a su eficacia para prevenir la agregación de proteínas durante la agitación energética. Los tensioactivos se usaron a concentraciones por debajo de su concentración micelar crítica (CMC) respectiva o por encima de su CMC respectiva.

Agregación inducida por remoción

En este conjunto de estudios, se usó una varilla magnética de remoción recubierta con teflón para inducir la agitación en una solución tamponada (acetato de histidina 20 mM, pH 5,5) de anticuerpo monoclonal. Se añadieron 3 ml de la solución de anticuerpos a un vial de vidrio de 6 cm³ y la solución se removió a 500 rpm usando una varilla de remoción recubierta con teflón. La solución se removió durante un periodo de 90 minutos y se extrajeron muestras a intervalos regulares y se analizaron para determinar la turbidez como una indicación de la formación de agregados insolubles. Se evaluaron diversos tensioactivos de la clase de alquilglucósidos en cuanto a su eficacia para prevenir la agregación de proteínas durante la agitación energética. Los tensioactivos se usaron a concentraciones por debajo de su concentración micelar crítica (CMC) respectiva o por encima de su CMC respectiva.

Resultados

La figura 1 muestra la dependencia en el tiempo del porcentaje de monómeros de un anticuerpo monoclonal anti-MUC16 en solución, tras agitar energicamente a 150 rpm a 37 °C durante 64 horas sin tensioactivo y en presencia de diversos tensioactivos, incluyendo n-decil-β-D-glucopiranosido, n-octil-β-D-glucopiranosido o polisorbato 20. Los tensioactivos se emplearon a la mitad de la concentración de sus valores de CMC respectivos, es decir, n-decil-β-D-glucopiranosido 1,1 mM (0,035 % p/v), n-octil-β-D-glucopiranosido 9 mM (0,24 %) y polisorbato 20 0,04 mM (0,0035 %).

Como se muestra en la figura 1, en ausencia de cualquier tensioactivo, se observó una disminución en el porcentaje de monómeros del anticuerpo tras la agitación energética durante un periodo de 64 horas. Aunque el polisorbato 20 no fue eficaz en la prevención de la pérdida de monómeros inducida por agitación energética en estas condiciones, los dos tensioactivos de la clase de alquilglucósidos sometidos a prueba, es decir, n-decil-β-D-glucopiranosido y n-octil-β-D-glucopiranosido, fueron eficaces en la prevención de la pérdida de monómeros del anticuerpo monoclonal anti-MUC16 tras la agitación energética. De ahí que tanto n-decil-β-D-glucopiranosido como n-octil-β-D-glucopiranosido (es decir, alquilglucósidos que tienen valores de CMC mayores de 1,0 mM) prevengan eficazmente la agregación inducida por agitación del anticuerpo monoclonal anti-MUC16 en solución.

Las figuras 2 y 3 muestran la evolución temporal de la formación de turbidez en una solución del anticuerpo

monoclonal anti-MUC16 tras remover a 500 rpm usando una varilla magnética recubierta con teflón a temperatura ambiente durante un periodo de 90 minutos. Se evaluó la turbidez en soluciones que no contenían tensioactivo, así como en soluciones que contenían diferentes tensioactivos alquilglucósidos o polisorbato 20. En la figura 2, la concentración de tensioactivo empleada fue la décima parte de sus valores de CMC respectivos, es decir, n-octil- β -D-glucopiranosido 1,8 mM (0,053 %), n-decil- β -D-maltopiranosido 0,18 mM (0,008 %), n-decil- β -D-glucopiranosido 0,22 mM (0,007 %), n-hexil- β -D-glucopiranosido 25 mM (0,66 %) y polisorbato 20 0,008 mM (0,0007 %). En la figura 3, la concentración de tensioactivo empleada fue el doble de sus valores de CMC respectivos, es decir, n-octil- β -D-glucopiranosido 36 mM (1,0 %), n-decil- β -D-maltopiranosido 3,6 mM (0,16 %), n-decil- β -D-glucopiranosido 4,4 mM (0,14 %), n-hexil- β -D-glucopiranosido 500 mM (12 %) y polisorbato 20 0,16 mM (0,014 %).

Como se observa en la figura 2, a una décima parte de la concentración de sus valores de CMC respectivos, n-octil- β -D-glucopiranosido y polisorbato 20 fueron eficaces en la prevención del desarrollo de turbidez en comparación con la solución de anticuerpos que no contenía tensioactivo. La formación de turbidez se atribuye típicamente a la formación de grandes agregados insolubles del anticuerpo.

Como se observa además en la figura 3, al doble de la concentración de sus CMC respectivas, todos los tensioactivos de la clase de alquilglucósidos fueron eficaces en la prevención de la agregación del anticuerpo en solución, medida por la formación de turbidez.

En la figura 4 se investigó el efecto de variar la concentración de n-octil- β -D-glucopiranosido sobre la turbidez de las formulaciones de anticuerpo monoclonal anti-MUC16 durante la agitación enérgica a 300 rpm durante 72 horas a 37 °C. Como se muestra en la figura 4, en todas las diversas concentraciones sometidas a prueba, es decir, 0,72 mM (0,02 p/v), 1,8 mM (0,05 p/v), 3,6 mM (0,1 p/v), 9 mM (0,25 p/v), 18 mM (0,5 p/v), n-octil- β -D-glucopiranosido inhibió eficazmente la formación de agregados de anticuerpos visibles tras la agitación enérgica, medida por la formación de turbidez.

En la figura 5 se investigó el efecto de variar la concentración de n-octil- β -D-glucopiranosido sobre el porcentaje de monómeros del anticuerpo monoclonal anti-MUC16 en solución, tras agitar enérgicamente a 300 rpm a 37 °C durante 72 horas. Como se muestra en la figura 5, en todas las diversas concentraciones sometidas a prueba, n-octil- β -D-glucopiranosido mantuvo eficazmente el porcentaje de monómeros del anticuerpo anti-MUC16 tras la agitación enérgica en comparación con el de una muestra no agitada enérgicamente almacenada en condiciones similares.

En las figuras 6-9 se investigó el efecto de polisorbato 20 0,23 mM (0,02 % p/v) o n-octil- β -D-glucopiranosido 3,6 mM (0,1 % p/v) sobre la turbidez de las formulaciones acuosas de un anticuerpo monoclonal anti-MUC16 (figura 6), un anticuerpo monoclonal anti-IgE (figura 7), un anticuerpo monoclonal anti-CD11a (figura 8) y un anticuerpo monoclonal anti-CD22 (figura 9), durante la agitación enérgica a 300 rpm durante 72 horas a 37 °C. Como se muestra en las figuras 6-9, tanto polisorbato 20 como n-octil- β -D-glucopiranosido inhibieron eficazmente la formación de agregados de anticuerpos visibles para todos los anticuerpos sometidos a prueba tras la agitación enérgica, medida por la formación de turbidez.

En las figuras 10-13 se investigó el efecto de polisorbato 20 0,23 mM (0,02 % p/v) o n-octil- β -D-glucopiranosido 3,6 mM (0,1 % p/v) sobre el porcentaje de monómeros de las formulaciones acuosas de un anticuerpo monoclonal anti-MUC16 (figura 10), un anticuerpo monoclonal anti-IgE (figura 11), un anticuerpo monoclonal anti-CD11a (figura 12) y un anticuerpo monoclonal anti-CD22 (figura 13), durante la agitación enérgica a 300 rpm durante 72 horas a 37 °C. Como se muestra en las figuras 10-13, n-octil- β -D-glucopiranosido mantuvo eficazmente el porcentaje de monómeros de los diversos anticuerpos sometidos a prueba tras la agitación enérgica en comparación con el de una muestra no agitada enérgicamente almacenada en condiciones similares.

EJEMPLO COMPARATIVO 2: Investigación de alquilglucósidos como tensioactivos no iónicos para prevenir la oxidación de proteínas/anticuerpos

Este ejemplo ilustra el uso de alquilglucósidos como tensioactivos no iónicos para prevenir la oxidación de anticuerpos en solución acuosa.

En un primer experimento, se almacenaron soluciones de tensioactivos de la clase de alquilglucósidos, es decir, n-decil- β -D-glucopiranosido, n-octil- β -D-glucopiranosido y n-decil- β -D-maltopiranosido, así como polisorbato 20 a una concentración de un 0,1 % p/v en agua a 40 °C durante un periodo de un mes. A continuación, se extrajeron las muestras y se analizaron para determinar la presencia de peróxido de hidrógeno usando el ensayo para peróxido de hidrógeno con Amplex Red. Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 14.

Como se muestra en la figura 14, las soluciones que contienen tensioactivos de alquilglucósido producen cantidades insignificantes de peróxido de hidrógeno tras el almacenamiento de estas soluciones a 40 °C durante un periodo de un mes. Por el contrario, se formaron aproximadamente 10 μ M de peróxido de hidrógeno en la solución que contenía polisorbato 20 en condiciones de almacenamiento similares. Estos datos sugieren que el

uso de alquilglucósidos como agentes estabilizantes de proteínas en formulaciones acuosas puede ser preferente en comparación con el polisorbato 20, debido a la propensión relativamente menor de los alquilglucósidos a producir peróxido de hidrógeno oxidante con el tiempo en solución.

En un segundo experimento, se evaluó la oxidación del residuo de aminoácido Met256 en un anticuerpo monoclonal anti-CD11a en soluciones que contenían n-decil-β-D-glucopiranosido, n-octil-β-D-glucopiranosido o bien polisorbato 20. Para este propósito, se almacenaron 3 ml de la solución de anticuerpos tamponada (pH 6,0) que contenía un 0,1 % p/v del tensioactivo en viales de 6 cm³ a 5 °C o bien 40 °C durante un periodo de 2 o bien 4 semanas. A continuación, se extrajeron muestras y se analizaron para determinar la oxidación del residuo Met256, un aminoácido en la secuencia de aminoácidos primaria de anti-CD11a que previamente ha demostrado ser propenso a la oxidación. Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 15.

Como se muestra en la figura 15, no se observó ningún incremento significativo en el porcentaje de Met256 oxidada de anti-CD11a en soluciones que contenían n-decil-β-D-glucopiranosido o n-octil-β-D-glucopiranosido tras el almacenamiento como se describe anteriormente, en comparación con la muestra inicial. En soluciones de anti-CD11a que contenían polisorbato 20, sin embargo, se encontró que aproximadamente un 16 % de los residuos de Met256 se oxidaron tras el almacenamiento a 40 °C durante un periodo de 4 semanas, en comparación con una oxidación de aproximadamente un 2 % del mismo residuo de aminoácido a un tiempo cero. Por tanto, estos datos sugieren que el uso de alquilglucósidos como agentes estabilizantes de proteínas en formulaciones acuosas puede ser preferente en comparación con el polisorbato 20, debido a la propensión relativamente menor de los alquilglucósidos a oxidar la proteína formulada con el tiempo en solución.

En un tercer experimento, se analizó la oxidación inducida por el reactivo de Fenton de los residuos de aminoácido Met y Trp (es decir, aminoácidos que se sabe que son susceptibles a la oxidación) en un anticuerpo monoclonal anti-CD22. Específicamente, se prepararon soluciones tamponadas (acetato de histidina 20 mM, pH 5,5) de anticuerpo monoclonal anti-CD22 que contenían 0,1 ppm de Fe³⁺ y 1 ppm de peróxido de hidrógeno y se almacenaron durante 2 o bien 4 semanas a 40 °C, en ausencia de tensioactivo o bien en presencia de polisorbato 20 0,23 mM (0,02 % p/v) o n-octil-β-D-glucopiranosido 3,6 mM (0,1 % p/v). A continuación, se extrajeron muestras y se determinó el porcentaje de oxidación de los residuos Met y Trp a partir del porcentaje de picos iniciales del anticuerpo que eluía a través de una columna de RP-HPLC de fenilo. Los resultados de estos análisis se muestran en la figura 16.

Como se muestra en la figura 16, la oxidación inducida por el reactivo de Fenton de aminoácidos susceptibles (Trp, Met) en el anticuerpo monoclonal anti-CD22 se inhibe en soluciones que contienen n-octil-β-D-glucopiranosido en comparación con las que contienen polisorbato 20, y es comparable con soluciones que no contienen tensioactivos. Por tanto, estos datos sugieren que el uso de alquilglucósidos como agentes estabilizantes de proteínas en formulaciones acuosas puede ser preferente en comparación con el polisorbato 20, debido a la propensión relativamente menor de los alquilglucósidos a oxidar la proteína formulada con el tiempo en solución.

EJEMPLO COMPARATIVO 3: Investigación de alquilglucósidos como tensioactivos no iónicos para prevenir la oxidación inducida por luz de residuos de triptófano en proteínas/anticuerpos

Este ejemplo ilustra el uso de alquilglucósidos como tensioactivos no iónicos para prevenir la oxidación inducida por luz de residuos de triptófano en proteínas/anticuerpos en solución acuosa.

Todos los siguientes experimentos se llevaron a cabo como sigue.

Muestras de MAb y tratamiento con luz: Se produjo el anticuerpo monoclonal anti-LDL oxidada humanizado en Genentech, Inc. a partir de una línea de células CHO. Se prepararon tres muestras independientes para los estudios de fotoestabilidad: 1) muestra de control, vial envuelto en papel de aluminio; 2) muestra de prueba, vial expuesto a la luz (no envuelto); 3) muestra de prueba, vial expuesto a la luz (no envuelto) que contenía el tensioactivo no iónico especificado. Tanto las muestras de control como las expuestas a la luz se mantuvieron en un negatoscopio durante 24 h. Exposición a la luz siguiendo la directriz de la ICH con la siguiente configuración para un negatoscopio Atlas SUNTEST CPS+: Nivel de irradiancia = 250 vatios/metro cuadrado; tiempo establecido en 24 horas; dosis de UV total = 538 vatios-hora/metro cuadrado; dosis visible total = 1.320.000 lux-horas.

LC/MS/MS de cartografía tripsínica de péptidos de MAb: Las muestras se hidrolizaron con tripsina después de su reducción y alquilación. Los péptidos resultantes se analizaron con un espectrómetro de masas Thermo LTQ-Orbitrap acoplado con un sistema de HPLC capilar Agilent 1200. Columna de HPLC: Jupiter 5 um C18 250 x 1,0 mm, caudal: 70 ul/min, temperatura de horno de columna: 55 °C. Disolvente A: TFA al 0,1 % en agua, B: TFA al 0,09 % en ACN al 90 %. Configuración de Orbitrap: resolución de MS 60000, MS/MS obtenida en modo dependiente de los datos, usando LTQ.

Mediciones de fluorescencia: Se obtuvieron los espectros de emisión de fluorescencia intrínseca de triptófano de las soluciones usando un espectrofluorómetro Horiba Jobin Yvon Fluoromax-4 (Edison, NJ) equipado con un baño de agua de temperatura controlada. Se obtuvo un espectro de emisión de triptófano de 300 a 450 nm tras la

excitación a 295 nm.

Se determinó el efecto de la luz y el efecto protector de los tensioactivos no iónicos sobre la oxidación de los residuos de triptófano en un anticuerpo anti-LDL oxidada. El anticuerpo sometido a prueba posee residuos de triptófano en las posiciones de aminoácido 33 (es decir, Trp33) y 92 (es decir, Trp92) y se determinó el porcentaje de oxidación inducida por luz en esos sitios como se describe anteriormente. Los resultados de estos análisis se muestran en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

<u>Condiciones/Tensioactivo</u>	<u>% de Trp33 oxidado</u>	<u>% de Trp92 oxidado</u>
Sin luz/Sin tensioactivo	0,0 %	0,6 %
Luz/Sin tensioactivo	0,3 %	6,0 %
Luz/n-hexil- β -D-glucopiranosido 0,39 mM	0,3 %	4,9 %
Luz/n-hexil- β -D-glucopiranosido 300 mM	0,0 %	1,6 %
Luz/n-hexil- β -D-maltopiranosido 0,39 mM	0,3 %	5,7 %
Luz/n-hexil- β -D-maltopiranosido 300 mM	0,0 %	2,2 %
Luz/n-dodecil- β -D-maltopiranosido 0,03 mM	0,0 %	10,6 %
Luz/n-dodecil- β -D-maltopiranosido 0,39 mM	0,1 %	2,7 %
Luz/n-dodecil- β -D-glucopiranosido 0,03 mM	0,4 %	8,9 %
Luz/polisorbato 20 al 0,02 %	0,6 %	8,9 %

Conclusiones

Los alquilglucósidos que tienen valores de CMC de aproximadamente 1 mM o mayor confieren estabilidad frente a la agregación inducida por agitación de proteínas, incluyendo anticuerpos monoclonales.

La estabilidad frente a la agregación inducida por agitación conferida por los alquilglucósidos que tienen valores de CMC de aproximadamente 1 mM o mayor no es dependiente del anticuerpo en tanto que se observa el efecto beneficioso con diversos anticuerpos de secuencias de aminoácidos diferentes.

De forma sorprendentemente, la estabilidad frente a la agregación inducida por agitación conferida por los alquilglucósidos que tienen valores de CMC de aproximadamente 1 mM o mayor se observa cuando el alquilglucósido se emplea a una concentración que está por debajo de su valor de CMC respectivo.

A diferencia del polisorbato 20, los alquilglucósidos que tienen valores de CMC de aproximadamente 1 mM o mayor no formaron peróxido de hidrógeno tras el almacenamiento durante un periodo de tiempo prolongado.

A diferencia del polisorbato 20, los alquilglucósidos que tienen valores de CMC de aproximadamente 1 mM o mayor no inducen significativamente la oxidación de los aminoácidos susceptibles a la oxidación en diversos anticuerpos monoclonales.

A diferencia del polisorbato 20, los alquilglucósidos que tienen valores de CMC de aproximadamente 1 mM o mayor pueden inhibir o reducir la cantidad de oxidación inducida por luz de los residuos de triptófano en los anticuerpos y otras proteínas, en particular cuando se usan a una concentración que está por encima de su valor de CMC respectivo.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de materia que comprende un conjugado anticuerpo-toxina y un alquilglucósido que tiene un valor de CMC de 1,0 mM o mayor en agua a 25 °C, en la que el alquilglucósido está presente en la composición de materia a una concentración que es menor que el valor de CMC del alquilglucósido en agua a 25 °C.
2. La composición de materia de la reivindicación 1, que comprende una cantidad que inhibe la agregación inducida por agitación de dicho alquilglucósido.
3. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que comprende una cantidad que previene la oxidación de dicho alquilglucósido.
4. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que es estable a una temperatura de 2-8 °C durante al menos un año.
5. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que es estable a una temperatura de 30 °C durante al menos un mes.
6. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que no está liofilizada y no se somete a liofilización previa.
7. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que es una formulación liofilizada reconstituida.
8. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el conjugado anticuerpo-toxina es susceptible a la agregación.
9. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el conjugado anticuerpo-toxina es susceptible a la oxidación.
10. Un procedimiento de prevención de la oxidación de un conjugado anticuerpo-toxina presente en una primera solución acuosa, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de añadir a dicha primera solución acuosa una cantidad que previene la oxidación de un alquilglucósido que tiene un valor de CMC de 1,0 mM o mayor en agua a 25 °C, en el que el alquilglucósido se añade a una concentración final que es menor que el valor de CMC del alquilglucósido en agua a 25 °C, proporcionando de este modo una segunda solución acuosa.
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que dicha oxidación es una oxidación inducida por luz.
12. El procedimiento de la reivindicación 10 u 11, en el que dicha oxidación inducida por luz es de residuos de triptófano en dicho conjugado anticuerpo-toxina.
13. Un procedimiento de inhibición de la agregación inducida por agitación de un conjugado anticuerpo-toxina presente en una primera solución acuosa, comprendiendo dicho procedimiento la etapa de añadir a dicha primera solución acuosa una cantidad que inhibe la agregación inducida por agitación de un alquilglucósido que tiene un valor de CMC de 1,0 mM o mayor en agua a 25 °C, en el que el alquilglucósido se añade a una concentración final que es menor que el valor de CMC del alquilglucósido en agua a 25 °C, proporcionando de este modo una segunda solución acuosa.
14. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 13, en la que el anticuerpo comprendido en dicho conjugado anticuerpo-toxina es un anticuerpo monoclonal.
15. La composición de materia de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 y 14 o el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 10 a 14, en la que el alquilglucósido se selecciona del grupo que consiste en n-hexil-β-D-glucopiranosido, n-heptil-β-D-glucopiranosido, n-octil-β-D-glucopiranosido, n-nonil-β-D-glucopiranosido, n-decil-β-D-glucopiranosido, 3-ciclohexil-1-propil-β-D-glucósido, 3-ciclohexil-1-butil-β-D-glucósido, n-hexil-β-D-maltopiranosido, n-octil-β-D-maltopiranosido, n-nonil-β-D-maltopiranosido, n-decil-β-D-maltopiranosido, ciclohexil-metil-β-D-maltósido, 2-ciclohexil-etil-β-D-maltósido, 3-ciclohexil-propil-β-D-maltósido, 4-ciclohexil-butil-β-D-maltósido y 5-ciclohexil-pentil-β-D-maltósido.

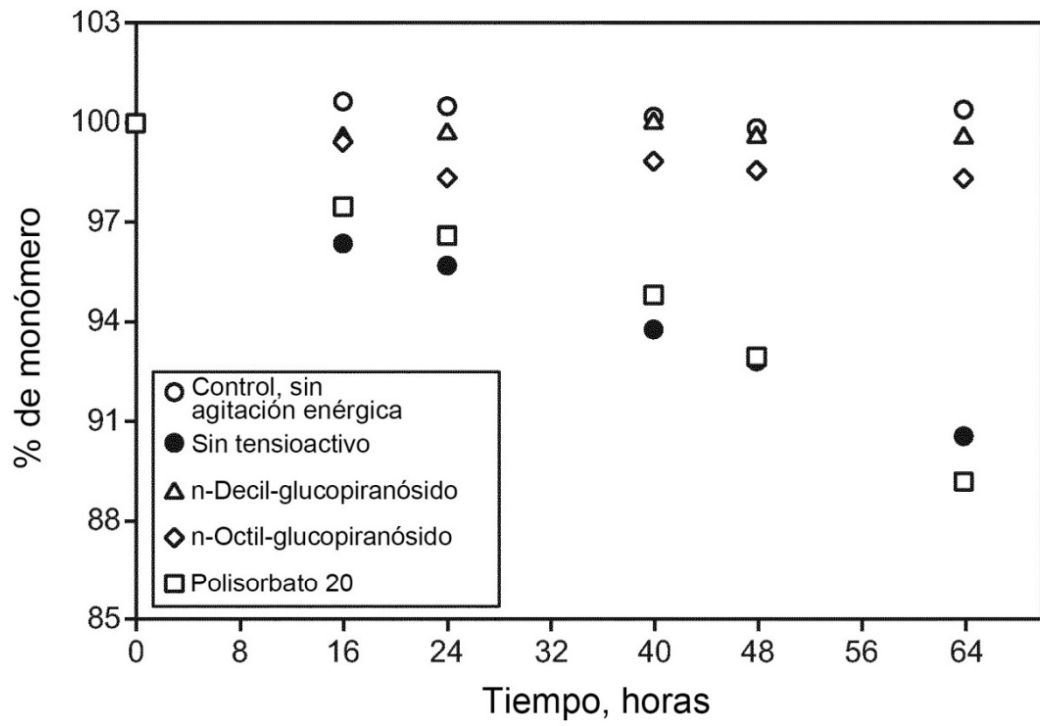


FIG. 1

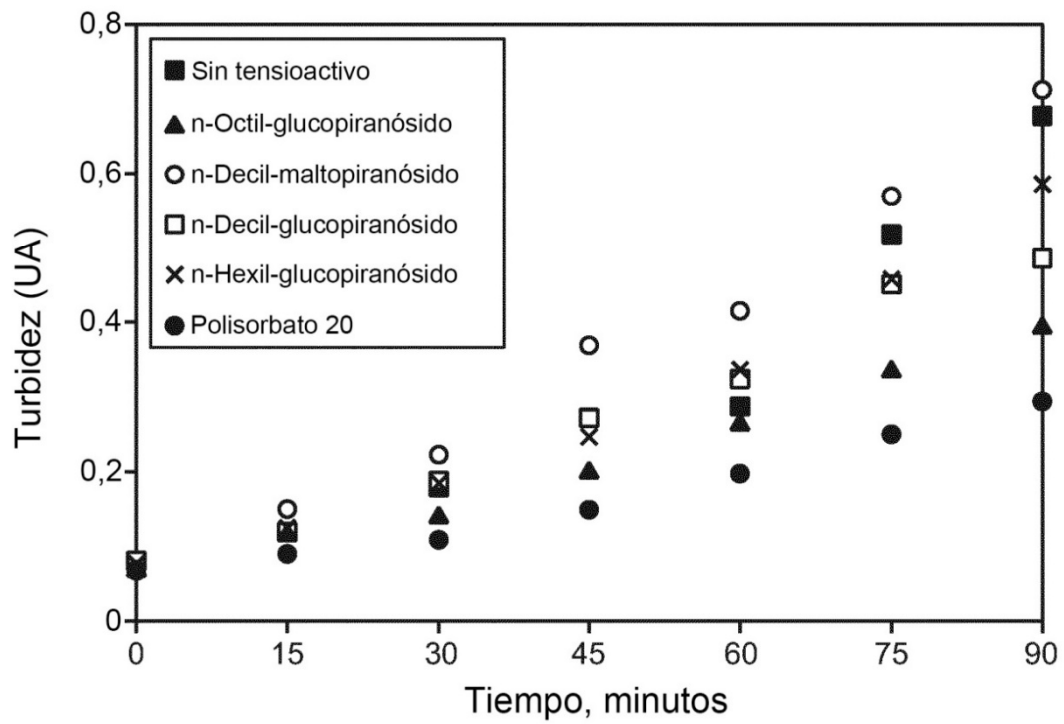


FIG. 2

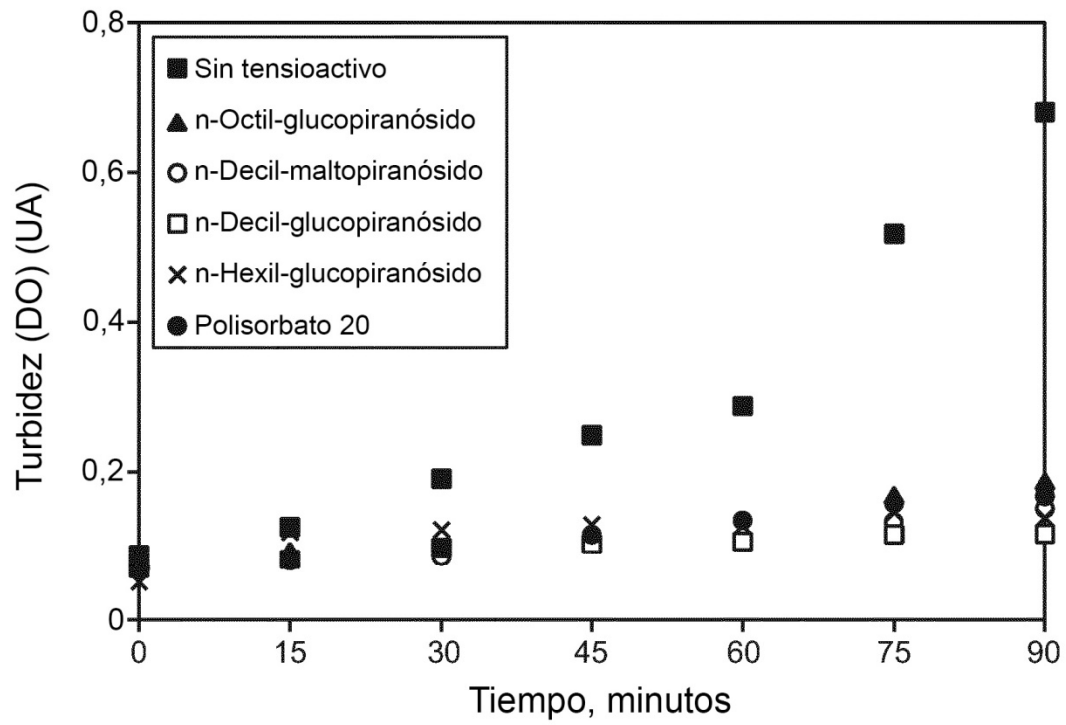


FIG. 3

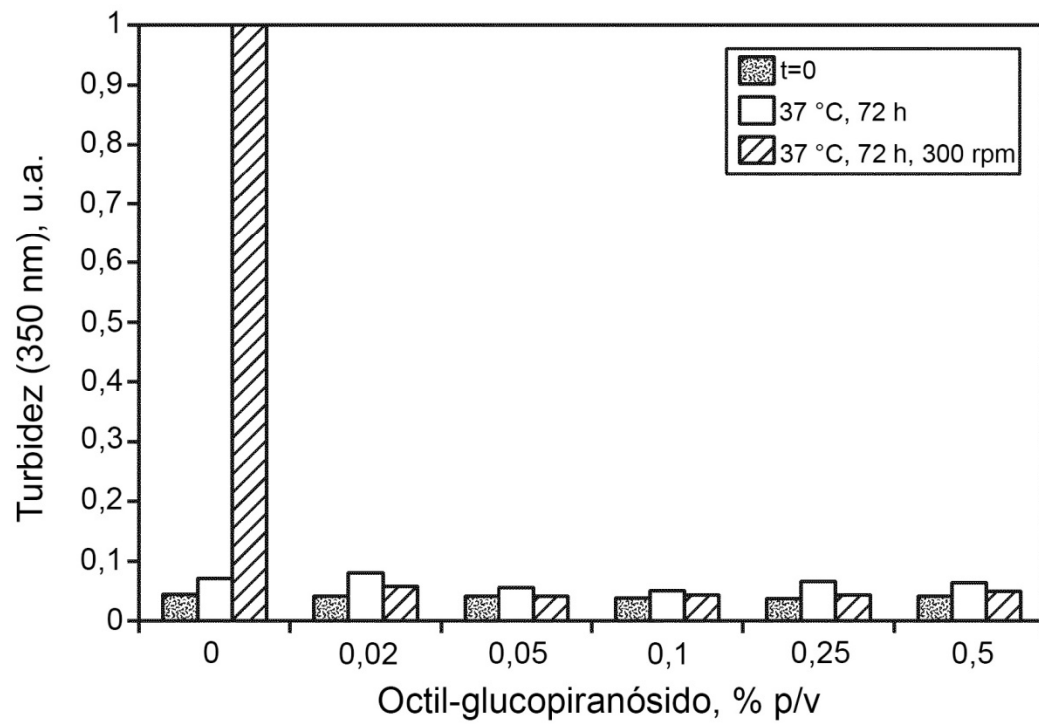
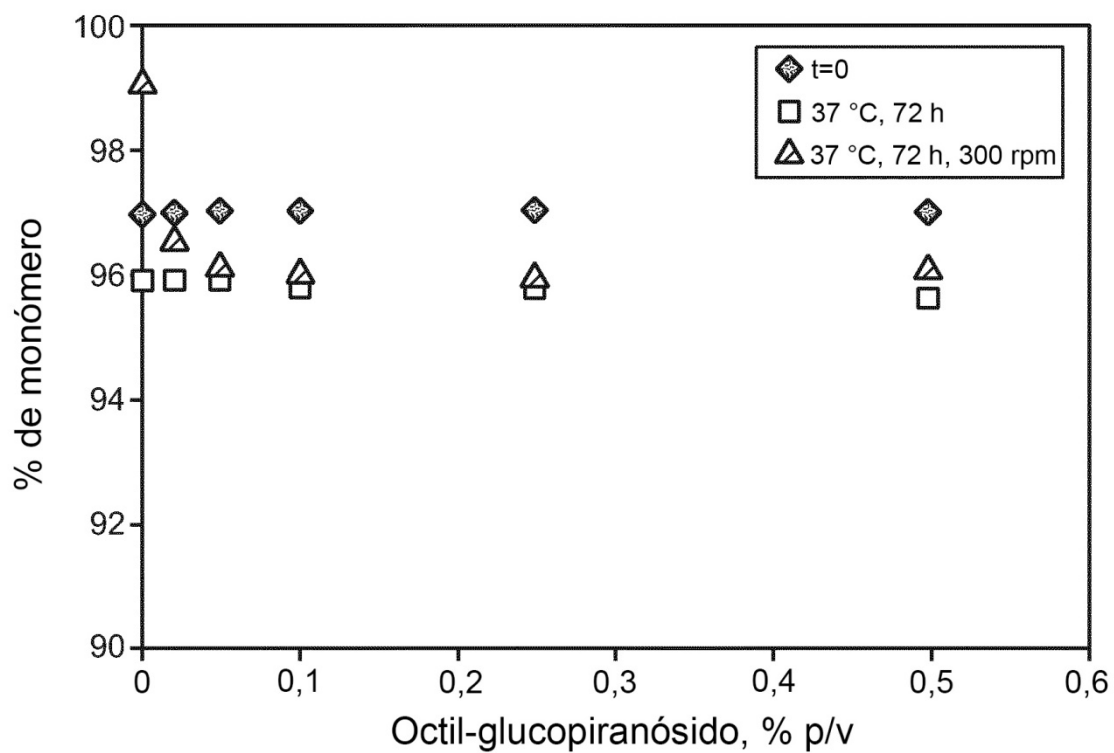
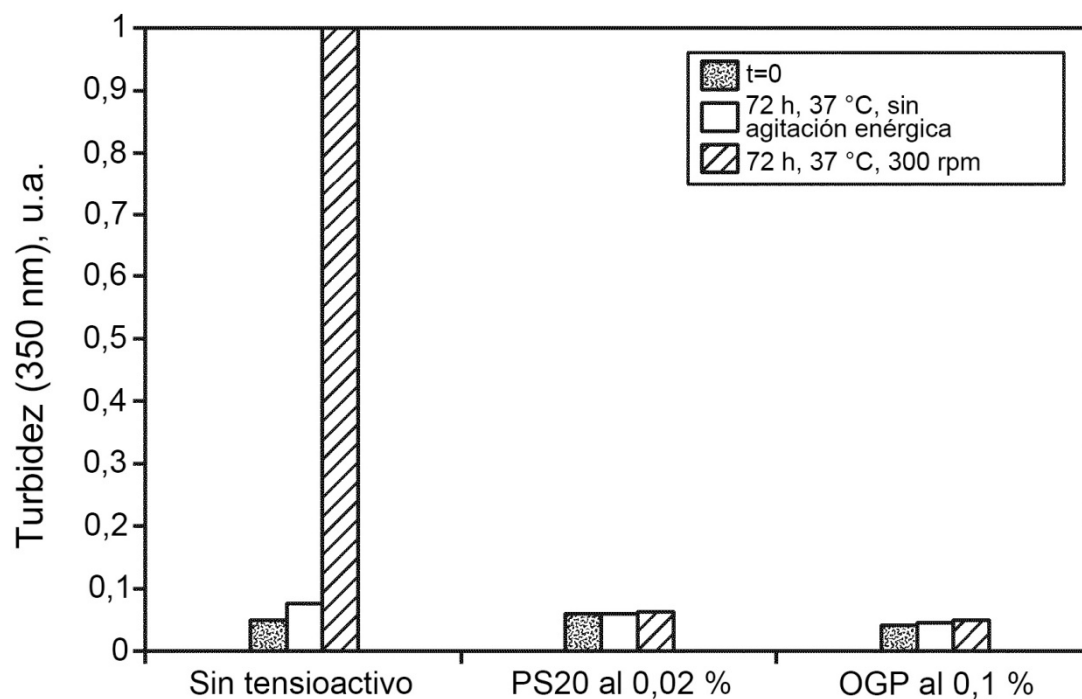
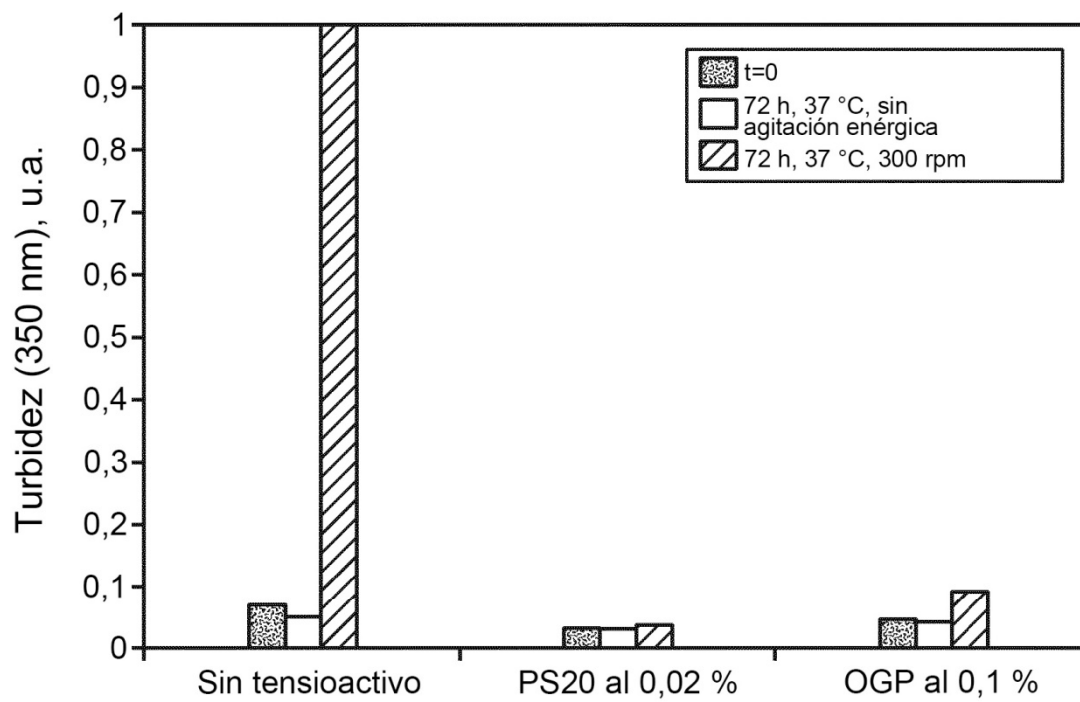
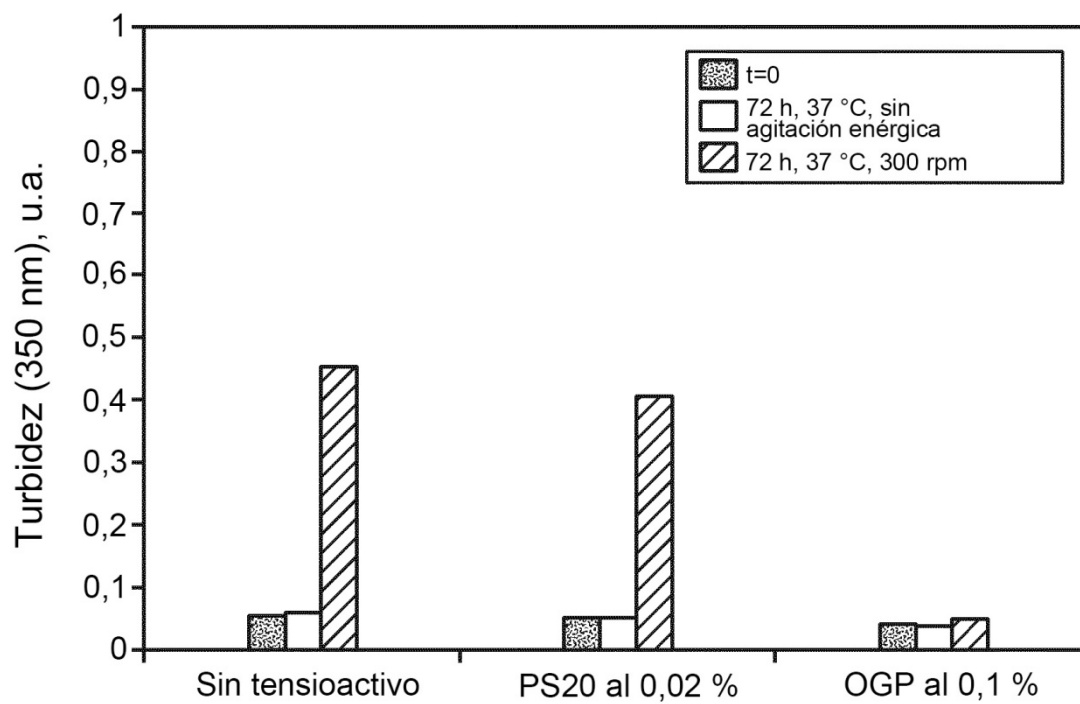
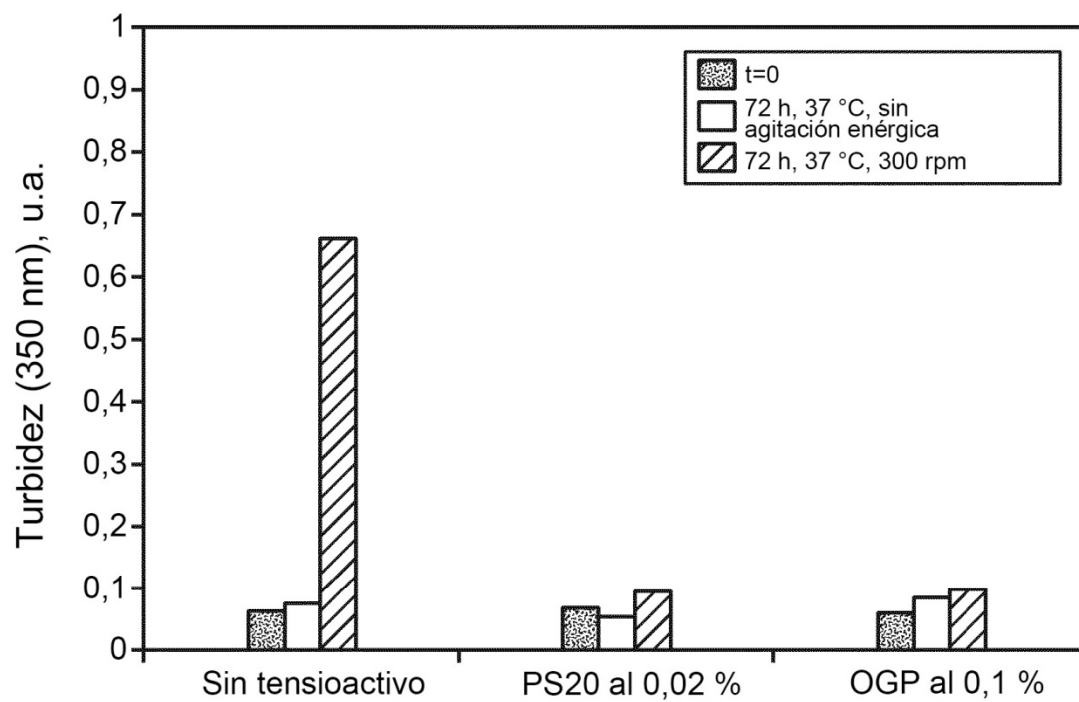
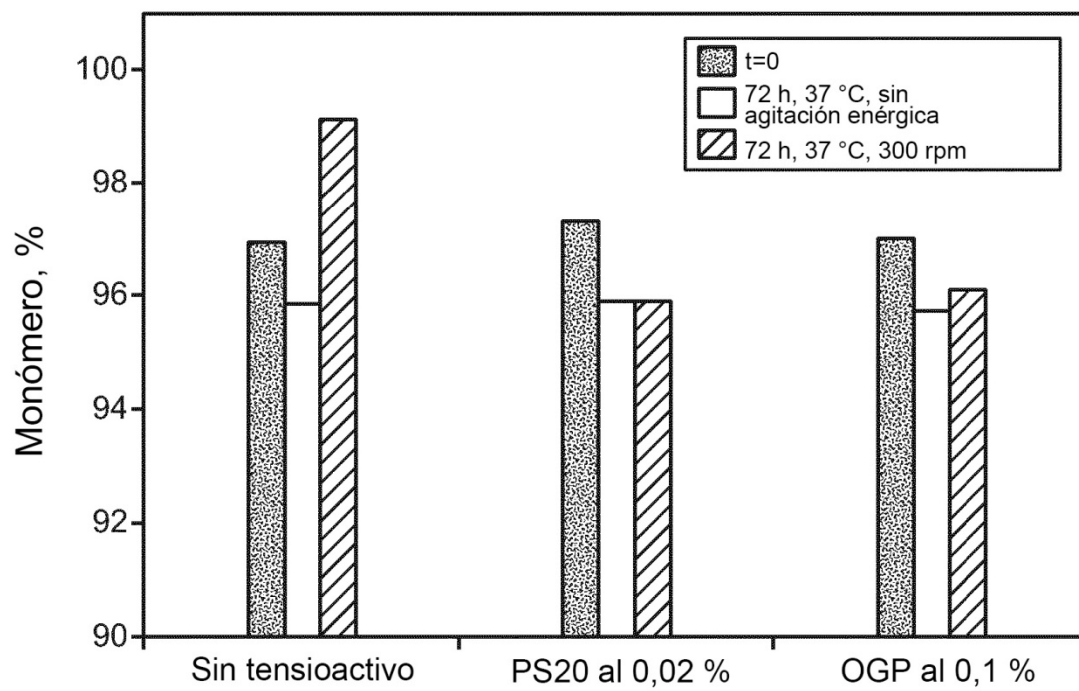


FIG. 4

**FIG. 5****FIG. 6**

**FIG. 7****FIG. 8**

**FIG. 9****FIG. 10**

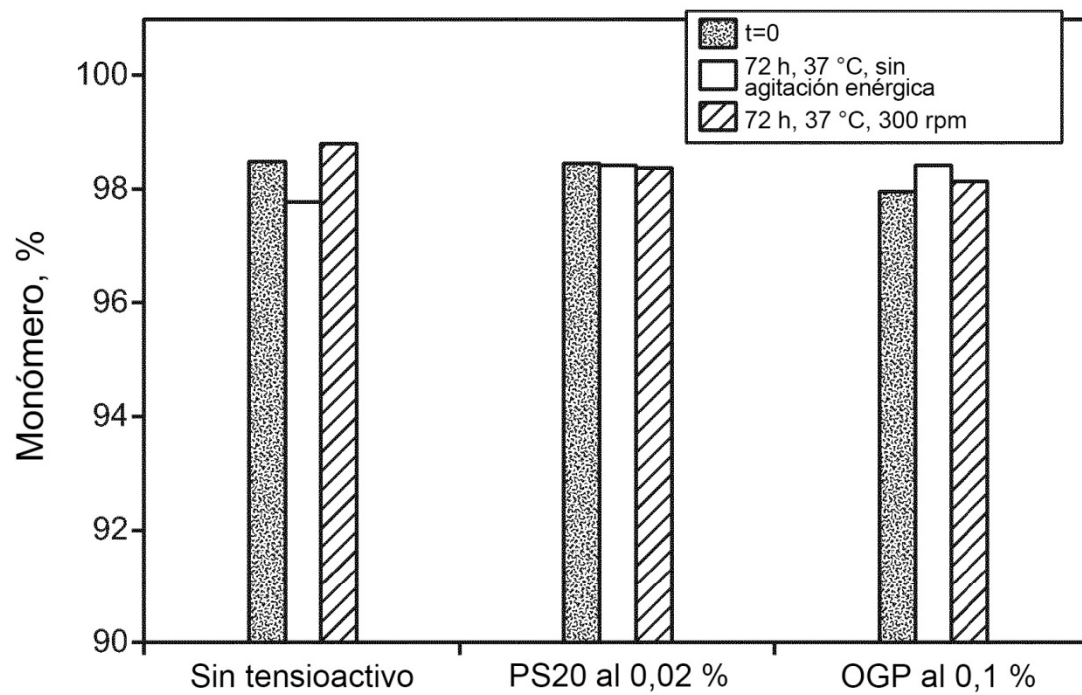


FIG. 11

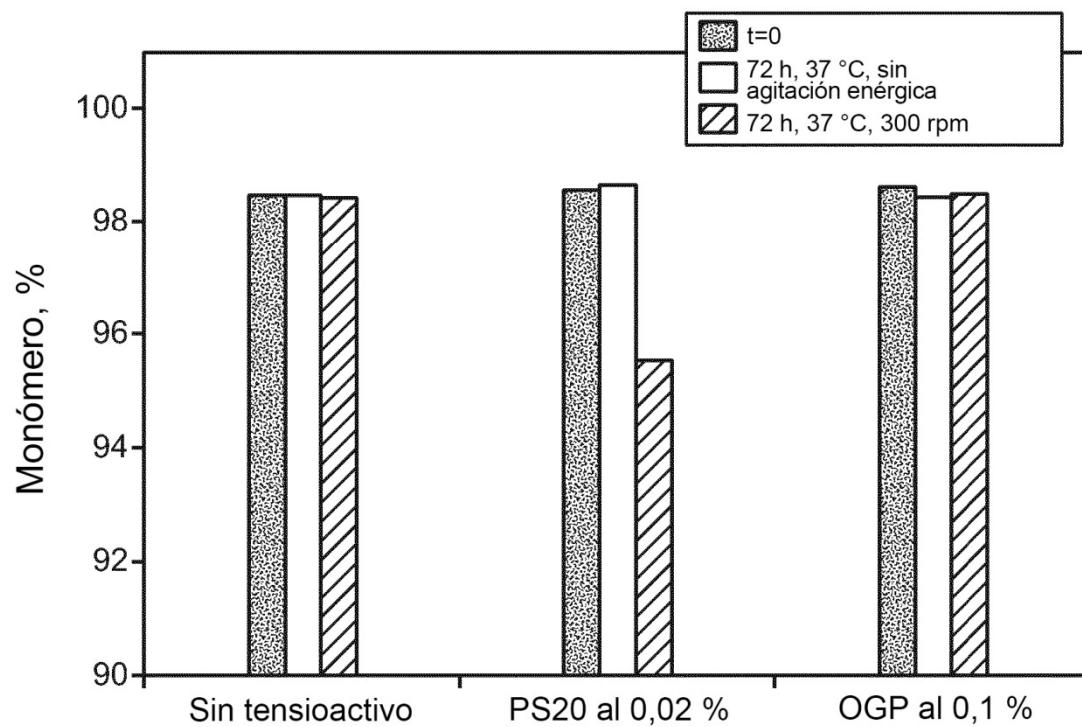


FIG. 12

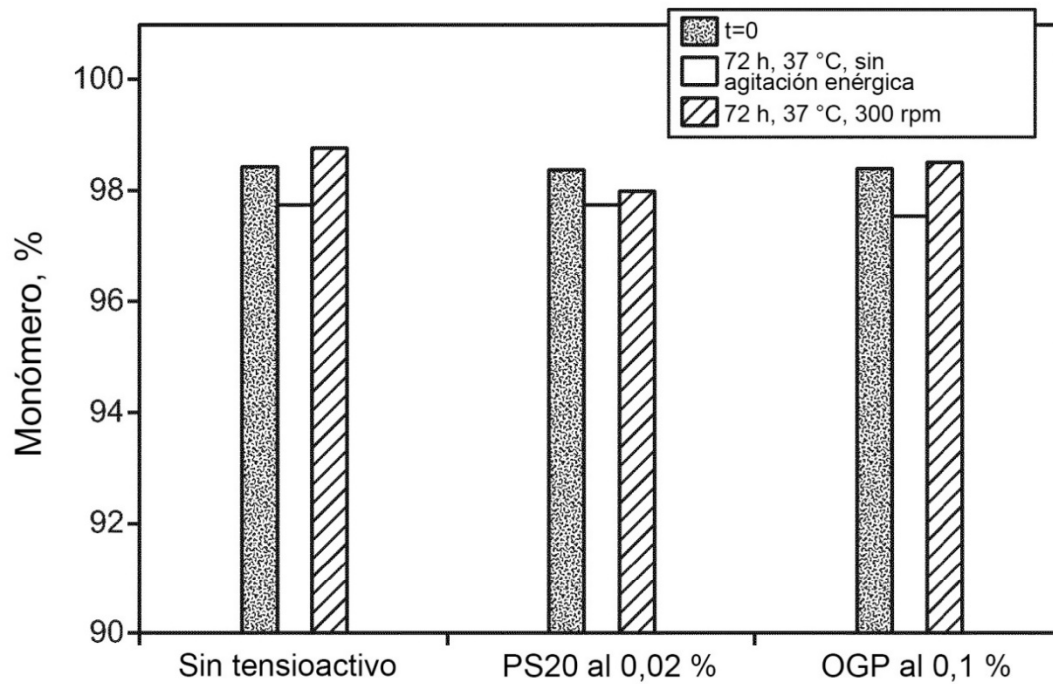


FIG. 13

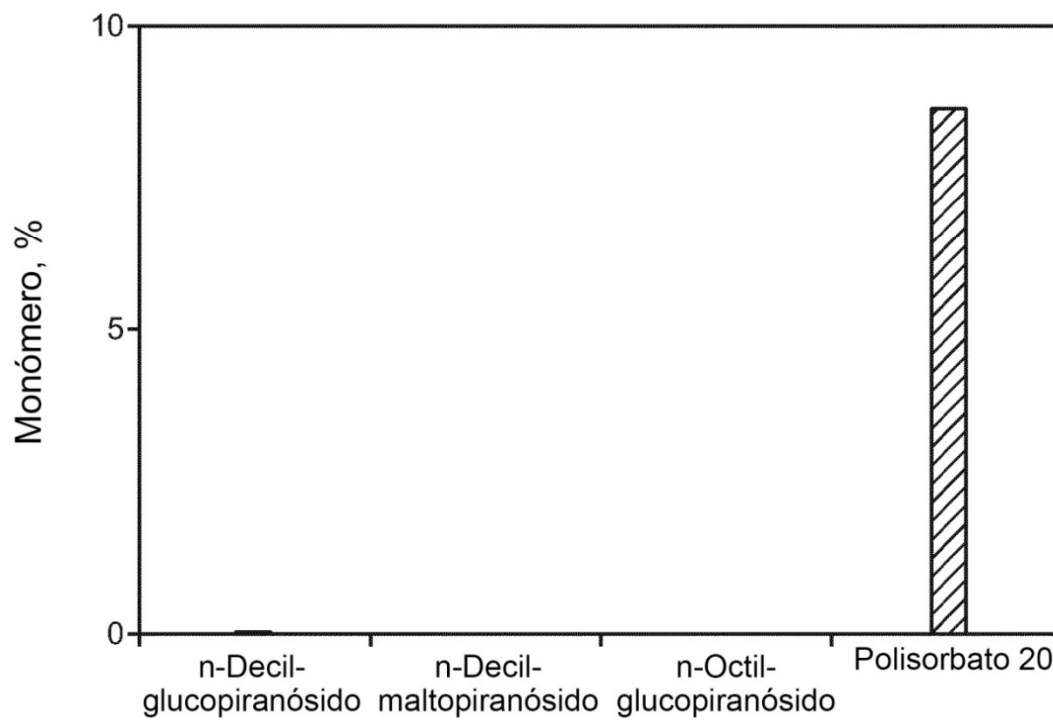


FIG. 14

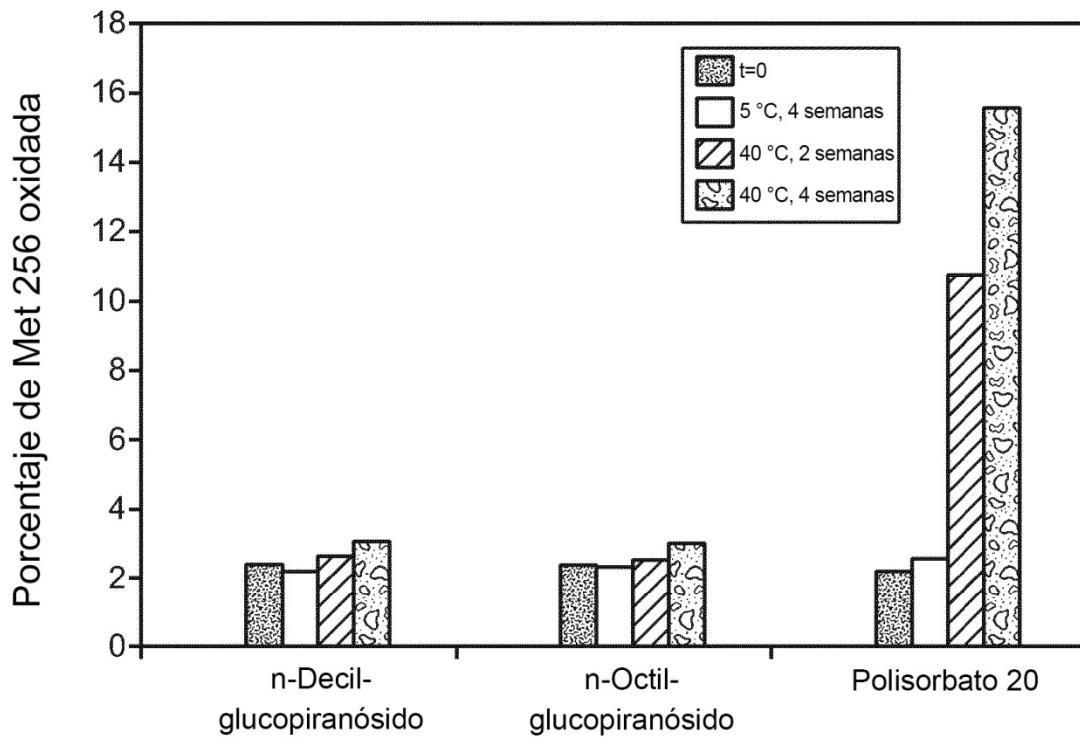


FIG. 15

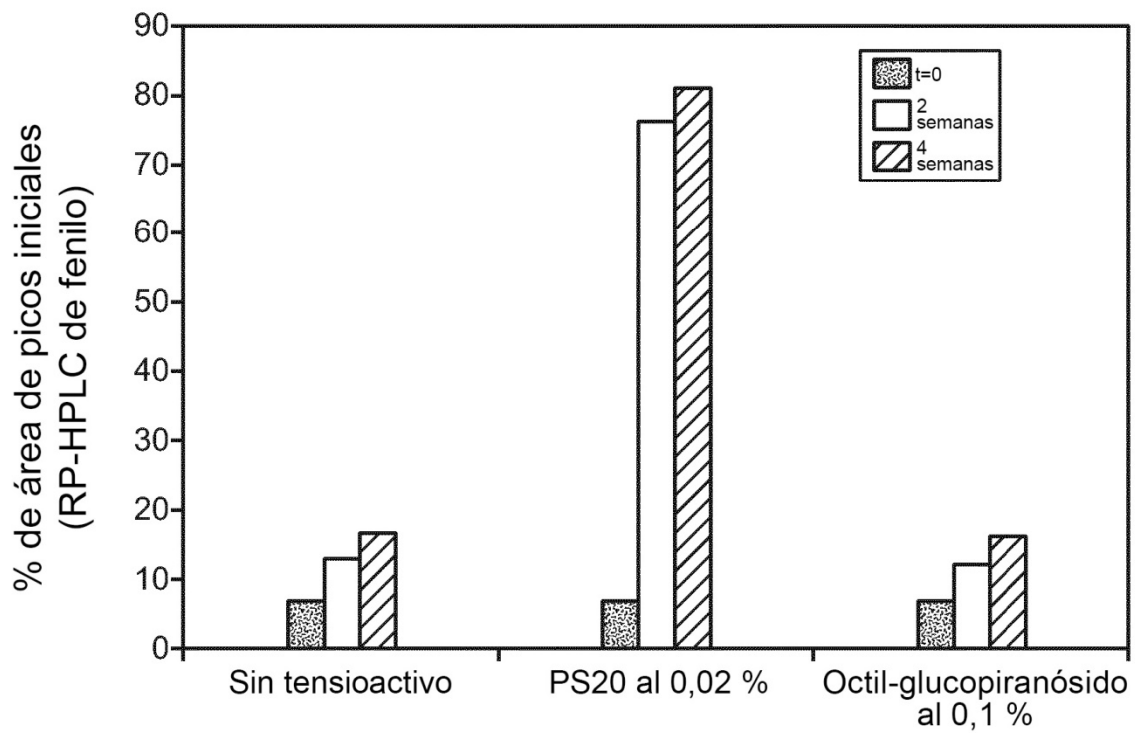


FIG. 16