

República Federativa do Brasil
Ministério do Desenvolvimento, Indústria
e do Comércio Exterior
Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

(21) **PI 0611901-8 A2**

(22) Data de Depósito: 08/06/2006
(43) Data da Publicação: 28/08/2012
(RPI 2173)



(51) *Int.Cl.:*
A61K 39/395
C12P 21/08

(54) **Título:** COMPOSIÇÃO, LIOFILIZADO, KIT, E, PROCESSO PARA PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO

(30) **Prioridade Unionista:** 14/06/2005 US 60/690582

(73) **Titular(es):** AMGEN, Inc

(72) **Inventor(es):** David N. Brems, Eva Kras, Richard Louis Remmele Jr, Susan Irene Hershenson, Yatin R. Gokarn

(74) **Procurador(es):** Momsen, Leonardos & CIA.

(86) **Pedido Internacional:** PCT US2006022599 de 08/06/2006

(87) **Publicação Internacional:** WO 2006/138181 de 28/12/2006

(57) **Resumo:** COMPOSIÇÃO, LIOFILIZADO, KIT, E PROCESSO PARA PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO. A invenção aqui descrita proporciona, entre outras coisas, formulações de proteína auto-tamponadoras. Particularmente, a invenção proporciona formulações de proteína farmacêuticas auto-tamponadoras que são vantajosas para uso médico veterinário e humano. As formulações de proteína auto-tamponadoras são substancialmente isentas de agentes tamponadores diferentes, conservam de forma estável o pH durante os períodos estendidos envolvidos na distribuição e no armazenamento de proteínas farmacêuticas para uso veterinário e médico humano. A invenção proporciona adicionalmente métodos para projetar, preparar, e usar a formulação. Adicionalmente a outras vantagens, as formulações evitam as desvantagens associadas com os agentes tamponadores usados convencionalmente em formulações correntes de proteínas para uso farmacêutico. Nestes e outros aspectos a invenção pode ser aplicada produtivamente a uma ampla variedade de proteínas e é particularmente útil para se preparar e usar formulações auto-tamponadoras de proteínas farmacêuticas para uso veterinário e médico, particularmente para o tratamento de doenças em indivíduos humanos.

“COMPOSIÇÃO, LIOFILIZADO, KIT, E PROCESSO PARA PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO”

Referência a pedidos relacionados

5 Este pedido é uma continuação-em-parte de, e reivindica pleno benefício relativamente ao Pedido Provisional dos E.U.A. com número de série 60/690.582 depositado em 14 de junho de 2005, que é incorporado aqui integralmente por referência.

Campo da invenção

10 A invenção refere-se à formulação de proteínas, particularmente proteínas farmacêuticas. Em particular, ela refere-se a composições de proteínas bio-farmacêuticas auto-tamponadoras, e a métodos para projetar, preparar, e usar as composições. Ela refere-se adicionalmente a composições de proteína farmacêuticas para uso médico veterinário e/ou humano, e a métodos relacionados com isso.

Anterioridades da invenção

15 Muitos aspectos da produção farmacêutica e de processo de formulação são sensíveis ao pH. A manutenção do pH correto de um produto farmacêutico acabado é crítica para sua estabilidade, efetividade, e vida-de-prateleira, e o pH é uma consideração importante para o projeto de
20 formulações para administração que serão aceitáveis, e, portanto, seguras e efetivas. Para conservar o pH, formulações e processos farmacêuticos usam um ou mais agentes tamponadores. Uma variedade de agentes tamponadores encontra-se disponível para uso farmacêutico. O tamponador ou tamponadores para uma dada aplicação precisam ser efetivos em um pH
25 desejado. Eles também precisam proporcionar suficiente capacidade tamponadora para conservar o pH desejado o mais tempo possível. Um bom tamponador para uma composição farmacêutica também precisa satisfazer numerosas outras exigências. Ele também precisa ser apropriadamente solúvel. Ele não pode formar complexos deletérios com íons metálicos, ser

tóxico, ou penetrar indevidamente, solubilizar, ou absorver sobre membranas ou outras suspensões. Ele não deveria interagir com outros componentes da composição de qualquer maneira que incrementa sua disponibilidade ou efetividade. Ele deveria ser estável ou efetivo para manter o pH na faixa de condições a que será exposto durante a formulação e durante o armazenamento do produto. Ele não deveria ser afetado de maneira prejudicial por oxidação ou outras reações que ocorrem neste ambiente, como aquelas que ocorrem no processamento da composição em que ele proporciona a ação tamponadora. Se levado ao produto final, ou incorporado no produto final, um agente tamponador precisa ser seguro para administração, compatível com outros componentes da composição, durante a vida-de-prateleira do produto, e aceitável para administração ao usuário final.

Embora haja muitos tamponadores no uso geral, apenas um número limitado é vantajoso para aplicações biológicas e, dentre estes, menos ainda são aceitáveis para formulações e processos farmacêuticos. Como um resultado, freqüentemente constitui um desafio encontrar um tamponador que não só será efetivo na manutenção do pH, mas que também atenderá todas as outras exigências para um dado processo, formulação, ou produto farmacêutico.

O desafio de encontrar um tamponador vantajoso para uso farmacêutico pode ser particularmente agudo para proteínas farmacêuticas. A conformação e a atividade de proteínas são criticamente dependentes do pH. Proteínas são suscetíveis a uma variedade de reações sensíveis ao pH e são prejudiciais para sua eficácia, tipicamente muito mais do que afetam drogas de moléculas pequenas. Por exemplo, para mencionar apenas alguns exemplos notáveis, as amidas de cadeia lateral de asparagina e glutamina são desamidadas a pH baixo (inferior a 4,0) e também a pH neutro ou alto (acima de 6,0). Radicais de ácido aspártico promovem a hidrólise de ligações peptídicas adjacentes a pH baixo. A estabilidade e disposição de ligações

dissulfeto é altamente dependente do pH, particularmente na presença de tióis. Solubilidade, floculação, agregação, precipitação, e fibrilação de proteínas são criticamente dependentes do pH. A configuração cristalina habitual importante para algumas formulações farmacêuticas também é criticamente dependente do pH, e o pH também é um fator importante na adsorção superficial de muitas proteínas e peptídeos farmacêuticos.

Além disso, agentes tamponadores que catalisam reações que inativam e/ou degradam um ou mais outros ingredientes, não podem ser usados em formulações farmacêuticas. Tamponadores para uso farmacêutico precisam apresentar não só a capacidade tamponadora requerida para manter o pH correto, mas eles também não podem tamponar tão intensamente a ponto que sua administração possa perturbar prejudicialmente o pH fisiológico de um indivíduo. Tamponadores para formulações farmacêuticas também precisam ser compatíveis com processos de formulação tipicamente complexos. Por exemplo, geralmente não se pode confiar que tamponadores que sublimam ou evaporam, como acetato e imidazol, venham a manter o pH durante a liofilização e no produto de liofilização reconstituído. Também não se pode confiar que outros tamponadores que cristalizam da fase amorfa da proteína, como fosfato de sódio, possam manter o pH em processos que exigem congelamento.

Tampões usados para manter o pH em produtos acabados farmacêuticos devem ser não somente efetivos para manter o pH, mas também devem ser seguros e aceitáveis para administração ao indivíduo. Por exemplo, vários outros tamponadores, de outra forma úteis, como citrato com baixa ou alta concentração, e acetato com alta concentração, são compreensivelmente dolorosos quando administrados parenteralmente. Verificou-se que alguns tamponadores são úteis na formulação de proteínas farmacêuticas, como acetato, succinato, citrato, histidina (imidazol), fosfato, e Tris. Todos estes apresentam desvantagens e limitações indesejáveis e todos

estes apresentam desvantagens inerentes de serem um ingrediente adicional na formulação, que complica o processo de formulação, impondo um risco de afetar prejudicialmente outros ingredientes, estabilidade, vida-de-prateleira, e aceitabilidade para o usuário final. Portanto, há uma necessidade de métodos adicionais e aperfeiçoados de manutenção do pH na produção e formulação de farmacêuticos e em composições farmacêuticas, particularmente na produção e formulação de proteínas biofarmacêuticas e em composições de proteínas biofarmacêuticas.

Sumário

10 Portanto, os vários objetos e aspectos da invenção tratam de proporcionar, em determinadas concretizações preferidas, formulações de proteína compreendendo uma proteína, particularmente formulações farmaceuticamente aceitáveis compreendendo uma proteína farmacêutica, que são tamponadas pela própria proteína, que não requerem agentes
15 tamponadores adicionais para manter um pH desejado, e em que a proteína é substancialmente o único agente tamponador (i.e., outros ingredientes, se houver, não atuam substancialmente como agentes tamponadores na formulação).

20 Com relação a isto e outros, os vários objetos e aspectos da invenção tratam de proporcionar, em determinadas concretizações preferidas, formulações auto-tamponadoras de uma proteína, particularmente de uma proteína farmacêutica, caracterizada pelo fato de que a concentração da proteína formulada proporciona uma capacidade tamponadora desejada.

25 Adicionalmente, os vários objetos e aspectos da invenção tratam de proporcionar, em determinadas concretizações preferidas formulações de proteína auto-tamponadoras, particularmente formulações de proteínas farmacêuticas, em que a concentração de sal total é inferior a 150 mM.

Adicionalmente, os vários objetos e aspectos da invenção

tratam de proporcionar, em determinadas concretizações preferidas, formulações de proteína auto-tamponadoras, particularmente formulações de proteínas farmacêuticas, que compreendem adicionalmente um ou mais polióis e/ou um ou mais tensoativos.

5 Adicionalmente, os vários objetos e aspectos da invenção tratam de proporcionar, em determinadas concretizações preferidas, formulações, formulações auto-tamponadoras compreendendo uma proteína, particularmente uma proteína farmacêutica, sendo que a concentração de sal total é inferior a 150 mM, que compreendem adicionalmente um ou mais
10 excipientes, incluindo, embora sem limitação, sais farmaceuticamente aceitáveis; agentes de balanço osmótico (agentes de tonicidade); tensoativos, polióis, antioxidantes; antibióticos; antimicóticos; agentes volumétricos; lio-protetores; agentes anti-espumantes; agentes quelantes; conservantes; colorantes; e analgésicos.

15 Adicionalmente, os vários objetos e aspectos da invenção tratam de proporcionar, em determinadas concretizações preferidas, formulações de proteína auto-tamponadoras, particularmente formulações de proteínas farmacêuticas, que compreendem, adicionalmente à proteína, um ou
mias outros agentes farmaceuticamente ativos.

20 Vários aspectos e concretizações da invenção são descritos ilustrativamente nos parágrafos numerados a seguir. A invenção é descrita como referência a cada um dos itens apresentados nos parágrafos, individualmente e/ou considerados em conjunto em qualquer combinação. O requerente reserva-se especificamente o direito de indicar reivindicações
25 baseadas em qualquer uma dessas combinações.

1. Uma composição de acordo com qualquer um dos seguintes, sendo que a composição foi aperfeiçoada para uso farmacêutico por uma autoridade nacional ou internacional autorizada por lei para assegurar referida aprovação, de preferência a Agência Européia para a Avaliação de Produtos

Médicos, Ministério da Saúde, Trabalho e Previdência do Japão, a Administração de Drogas do Estado Chinês, Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (FDA), ou seu(s) sucessor(es) nesta autoridade, de forma particularmente preferível a Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos ou seu(s) sucessor(es) nesta autoridade.

2. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a composição é produzida de acordo com boas práticas de fabricação aplicáveis na produção de farmacêuticos para uso em humanos.

3. Uma composição de acordo com qualquer dos precedentes ou a seguir, compreendendo uma proteína, sendo que a proteína apresenta uma capacidade tamponadora por volume unitário por unidade de pH de, pelo menos, aproximadamente: 2,0 ou 3,0 ou 4,0 ou 5,0 ou 6,50 ou 8,00 ou 10,0 ou 15,0 ou 20,0 ou 30,0 ou 40,0 ou 50,0 ou 75,0 ou 100 ou 125 ou 150 ou 200 ou 250 ou 300 ou 350 ou 400 ou 500 mM de tampão de acetato de sódio em água pura na faixa de pH 5,0 a 4,0 ou pH de 5,0 a 5,5, de preferência, conforme determinado com os métodos descritos no Exemplo 1 e 2, de forma particularmente preferível de pelo menos 2,0 mM, de forma particularmente preferível, pelo menos, 3,0 mM, de forma mui particularmente preferível, pelo menos, 4,0 mM ou, pelo menos, 5,0 mM, de forma particularmente preferível, pelo menos, 7,5 mM, de forma particularmente preferível, pelo menos, 10 mM, de preferência, pelo menos 20 mM.

4. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir em que, exclusivamente a capacidade da proteína, a capacidade tamponadora por volume unitário por unidade de pH da composição é igual ou inferior a 1,0 ou 1,5 ou 2,0 ou 3,0 ou 4,0 ou 5,0 mM de tampão de acetato de sódio em água pura na faixa de pH de 4,0 a 5,0 ou de pH de 5,0 a 5,5, de preferência, como determinado de acordo com os métodos descritos no Exemplo 1 e 2, de forma particularmente preferível inferior a 1,0

mM, de forma mui particularmente preferível inferior a 2,0 mM, de forma particularmente preferível, inferior a 2,5 mM, de forma particularmente preferível inferior a 3,0 mM, de preferência, inferior a 5,0 mM.

5 5. Uma composição de acordo com qualquer dos itens
precedentes ou a seguir compreendendo uma proteína em que, na faixa de
mais ou menos 1 unidade de pH do pH da composição, a capacidade
tamponadora da proteína é de pelo menos aproximadamente: 1,00 ou 1,50 ou
1,63 ou 2,00 ou 3,00 ou 4,00 ou 5,00 ou 6,50 ou 8,00 ou 10,0 ou 15,0 ou 20,0
10 ou 30,0 ou 40,0 ou 50,0 ou 75,0 ou 100 ou 125 ou 150 ou 200 ou 250 ou 300
ou 350 ou 400 ou 500 ou 700 ou 1.000 mEq por litro por unidade de pH, de
preferência, pelo menos aproximadamente 1,00, de forma particularmente
preferível 1,50, de forma particularmente preferível, 1,63, de forma mui
particularmente preferível 2,00, de forma mui particularmente preferível 3,00,
de forma mui particularmente preferível 5,0, de forma particularmente
15 preferivelmente 10,0, de forma particularmente preferível 20,0.

6. Uma composição de acordo com qualquer dos itens
precedentes ou a seguir compreendendo uma proteína, sendo que, na faixa de
mais ou menos 1 unidade de pH do pH da composição, exclusivamente da
proteína, a capacidade tamponadora por volume unitário por unidade de pH
20 da composição é igual ou inferior a 0,50 ou 1,00 ou 1,50 ou 2,00 ou 3,00 ou
4,00 ou 5,00 ou 6,50 ou 8,00 ou 10,0 ou 20,0 ou 25,0 mM de tampão de
acetato de sódio em água pura na faixa de pH de 5,0 a 4,0 ou de pH de 5,0 a
5,5, de forma particularmente preferível determinada de acordo com o
Exemplo 1 e/ou Exemplo 2.

25 7. Uma composição de acordo com qualquer dos itens
precedentes ou a seguir, sendo que numa faixa de mais ou menos 1 unidade
de pH de um pH desejado, a proteína proporciona pelo menos
aproximadamente 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, ou 99,5 % da capacidade tamponadora da composição, de

preferência, pelo menos aproximadamente 75 %, de forma particularmente preferível, pelo menos, aproximadamente 85 %, de forma particularmente preferível, pelo menos, aproximadamente 90 %, de forma mui particularmente preferível pelo menos aproximadamente 95 %, de forma mui particularmente preferível pelo menos aproximadamente 99 % da capacidade tamponadora da composição.

8. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a concentração da proteína é entre aproximadamente: 20 e 400, ou 20 e 300, ou 20 e 250, ou 20 e 200, ou 20 e 150 mg/ml, de preferência, entre aproximadamente 20 e 400 mg/ml, de forma particularmente preferível entre aproximadamente 20 e 250, particularmente entre aproximadamente 20 e 150 mg/ml.

9. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que o pH mantido pela ação tamponadora da proteína é entre aproximadamente: 3,5 e 8,0, ou 4,0 e 6,0, ou 4,0 e 5,5, ou 4,0 e 5,0, de preferência, entre aproximadamente 3,5 e 8,0, de forma particularmente preferível, aproximadamente 4,0 e 5,5.

10. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a concentração de sal é inferior a: 150 mM ou 125 mM ou 100 mM ou 75 mM ou 50 mM ou 25 mM, de preferência, 150 mM, de forma particularmente preferível 125 mM, de forma particularmente preferível 100 mM, de forma mui particularmente preferível 75 mM, de forma particularmente preferível 50 mM, de preferência, 25 mM.

11. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, compreendendo adicionalmente um ou mais sais farmacêuticamente aceitáveis; polióis; tensoativos; agentes de balanço osmótico; agentes de tonicidade; antioxidantes; antibióticos; antimicóticos; agentes volumétricos; lio-protetores; agentes anti-espumantes; agentes quelantes; conservantes; colorantes; analgésicos; ou agentes farmacêuticos

adicionais.

12. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, compreendendo um ou mais polióis farmacêuticamente aceitáveis numa quantidade que é hipotônica, isotônica, ou hipertônica, de preferência, aproximadamente isotônica, de forma particularmente preferível isotônica, de forma particularmente preferível qualquer um ou mais dentre sorbitol, manitol, sacarose, trealose, ou glicerol, de forma particularmente preferível, aproximadamente 5 % de sorbitol, 5 % de manitol, 9 % de sucrose, 9 % de trealose, ou 2,5 % de glicerol, de forma mui particularmente relacionada com 5 % de sorbitol, 5 % de manitol, 9 % de sucrose, 9 % de trealose, ou 2,5 % de glicerol.

13. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, compreendendo adicionalmente um tensoativo, de preferência, um ou mais dentre polissorbato 20, polissorbato 80, outros ésteres de ácido graxo de sorbitano, polietoxilatos, e poloxâmero 188, de forma particularmente preferível, polissorbato 20 ou polissorbato 80, de preferência, de aproximadamente 0,001 a 0,1 % de polissorbato 20 ou polissorbato 80, mui preferivelmente de aproximadamente de 0,002 a 0,02 % de polissorbato 20 ou polissorbato 80, particularmente de 0,002 a 0,02 % de polissorbato 20 ou polissorbato 80.

14. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a proteína é um agente farmacêutico e a composição é uma formulação estéril da mesma vantajosa para tratamento de um indivíduo humano ou não-humano.

15. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a proteína é um agente farmacêutico efetivo para tratar uma doença e a composição é uma formulação estéril da mesma vantajosa para administração a um indivíduo para tratamento da mesma.

16. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a proteína não induz uma resposta antigênica significativamente antigênica após administração a um indivíduo.

5 17. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a proteína não induz uma resposta imune significativamente prejudicial após administração a um indivíduo.

18. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a proteína é uma proteína humana.

10 19. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a proteína é uma proteína humanizada.

20. Um método de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a proteína é um anticorpo, de preferência, um anticorpos IgA, IgD, IgE, IgG, ou IgM, de forma particularmente preferível um anticorpo IgG, de forma mui particularmente preferível um anticorpo
15 IgG1, IgG2, IgG3, ou IgG4, particularmente um anticorpo IgG2.

21. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a proteína compreende um: fragmento Fab, fragmento Fab₂, fragmento Fab₃, fragmento Fc, fragmento scFv, fragmento bis-scFv(s), minicorpo, diacorpo, triacorpo, tetracorpo, domínio
20 V_HH, domínio V-NAR, domínio V_H, domínio V_L, Ig de camelo, Ig NAR, ou pepticorpo, ou uma variante, derivado, ou modificação de qualquer um dos precedentes.

22. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a proteína compreende um fragmento Fc
25 ou uma parte do mesmo ou um derivado ou variante de um fragmento Fc ou parte do mesmo.

23. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a proteína compreende uma primeira porção de ligação de um par de porções de ligação cognatas, sendo que a

primeira porção liga-se à segunda porção especificamente.

24. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a proteína compreende (a) um fragmento Fc ou uma parte da mesma ou um derivado ou variante de um fragmento Fc ou parte do mesmo, e (b) uma primeira porção de ligação de um par de porções de ligação cognatas.

25. Uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1, 5, 7, 9, 11, 13, ou 14, sendo que a proteína é selecionada do grupo que consiste de proteínas que se ligam especificamente a uma ou mais proteínas CD, proteínas da família de receptor HER, moléculas de adesão de células, fatores de crescimento, fatores de crescimento de nervos, fatores de crescimento de fibroblastos, fatores de crescimento de transformação (TGF), fatores de crescimento similares a insulina, fatores osteoindutivos, insulinas e proteínas relacionadas com insulina, proteínas de coagulação e relacionadas com coagulação, fatores estimuladores de colônias (CSFs), outras proteínas do sangue e do soro, antígenos de grupo sanguíneo; receptores, proteínas associadas com receptores, receptores de hormônio do crescimento, receptores de células T; fatores neurotróficos, neurotrofinas, relaxinas, interferons, interleucinas, antígenos virais, lipoproteínas, integrinas, fatores reumatóides, imunotoxinas, proteínas de membrana de superfície, proteínas de transporte, receptores de direcionamento (*homing*), adressinas, proteínas reguladoras, e imunoadesinas.

26. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a proteína é selecionada do grupo que consiste de: proteínas de ligação específicas para OPGL, proteínas de ligação específicas para miostatina, proteínas de ligação específicas para receptor de IL-4, proteínas de ligação específicas para IL1-R1, proteínas de ligação específicas para Ang2, proteínas de ligação específicas para NGF, proteínas de ligação específicas para CD22, proteínas de ligação específicas para

receptor de IGF-1, proteínas de ligação específicas para receptor de B7RP-1, proteínas de ligação específicas para receptor de IFN gama, proteínas de ligação específicas para receptor de TALL-1, fatores de células-tronco, ligantes de Flt-3, e receptores de IL-17.

- 5 27. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a proteína é selecionada do grupo que consiste de proteínas que se ligam especificamente a um ou mais de: CD3, CD4, COS, CD 19, CD20, CD34; HER2, HER3, HER4, o receptor de EGF; LFA-1, Mo1, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, alfa v/beta 3 integrina; fator de
10 crescimento endotelial vascular ("VEGF"); hormônio do crescimento, hormônio estimulador da tireóide, hormônio estimulador de folículo, hormônio luteinizador, fator liberador do hormônio do crescimento, hormônio da para-tireóide, substância inibidora de mullerian, proteína inflamatória de macrófagos humanos (MIP-1-alfa), eritopoietina (EPO), NGF-beta, fator de
15 crescimento derivado de plaquetas (PDGF), aFGF, bFGF, fator de crescimento epidérmico (EGF), TGF-alfa, TGF-betal, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, IGF-I, IGF-II, des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cérebro), insulina, cadeia A de insulina, cadeia B de insulina, proinsulina, proteínas de ligação de fator de crescimento similar a insulina; como, entre outros, fator
20 VIII, fator de tecido, fator de von Willebrands, proteína C, alfa-1—antitripsina, ativadores de plasminogênio, como uroquinase e ativador de plasminogênio de tecido ("t-PA"), bombazina, trombina, e trombopoietina; M-CSF, GM-CSF, G-CSF, albumina, IgE, receptor de flk2/flt3, receptor de obesidade (OB), fator neurotrófico derivado de ossos (BDNF), NT-3, NT- 4, NT-5, NT-6); cadeia A de relaxina, cadeia B de relaxina, pro-relaxina; interferon-alfa, -beta, e -gama; IL-1 a IL-10; antígeno viral de envelope da AIDS; calcitonina, glucagon, fator natriurético atrial, tensoativo pulmonar, fator de necrose de tumor-alfa e -beta, encefalinase, PvANTES, peptídeo associado com gonadotropina de camundongo, Dnase, inibina, e activina;

proteína A ou D, proteína morfogenética dos ossos (BMP), superóxido dismutase, fator acelerador de degradação (DAF).

28. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, sendo que a proteína é selecionada do grupo que
 5 consiste de: Actimune (Interferon-gama-1b), Activase (Alteplase), Aldurazme (Laronidase), Amevive (Alefacept), Avonex (Interferon beta-1a), BeneFDC (Nonacog alfa), Beromun (Tasonermina), Beatseron (Interferon-beta-1b), BEXXAR (Tositumomab), Tev-Tropina (Somatropina), Bioclote ou RECOMBINATE (Recombinante), CEREZME (Imiglucerase), ENBREL
 10 (Etanorcept), Eprex (epoetina alfa), EPOGEN/Procit (Epoetina alfa), FABRAZYME (Agalsidase beta), Fasturtec/Elitek ELITEK (Rasburicase), FORTEO (Teriparatide), GENOTROPIN (Somatropina), GlucaGen (Glucagon), Glucagon (Glucagon, de origem de rDNA), GONAL-F (folitropina alfa), KOGENATE FS (Octocog alfa), HERCEPTIN
 15 (Trastuzumab), HUMATROPE (SOMATROPIN), HUMIRA (Adalimumab), Insulina em solução, INFERGEN® (Interferon alfacon-1), KINERET® (anakinra), Kogenate FS (fator anti-hemofílico), LEUKIN (SARGRAMOSTIM, fator estimulador de colônias de macrófagos-granulócitos humanos recombinantes (rhuGM-CSF)), CAMPATH
 20 (Alemtuzumab), RITUXAN® (Rituximab), TNKase (Tenecteplase), MYLOTARG (gemtuzumab ozogamicina), NATRECOR (nesiritida), ARANESP (darbepoetina alfa), NEULASTA (pegfilgrastima), NEUMEGA (oprelvequina), NEUPOGEN (Filgrastim), NORDITROPIN CARTRIDGES (Somatropina), NOVOSEVEN (Eptacog alfa), NUTROPIN AQ
 25 (somatropina), Oncaspar (pegaspargase), ONTAK (denileucina diftitox), ORTHOCLONE OKT (muromonab-CD3), OVIDREL (coriogonadotropina alfa), PEGASYS (peginterferon alfa-2a), PROLEUKIN (Aldesleucina), PULMOZYME (dornase alfa), Retavase (Reteplase), REBETRON Terapia de Combinação contendo REBETOL® (Ribavirin) e INTRON® A (Interferon

alfa-2b), REBIF (interferon beta-1a), REFACTO (fator anti-hemofílico), REFLUDAN (lepirudina), REMICADE (infliximab), REOPRO (abciximab), ROFERON®-A (Interferon alfa-2a), SIMULECT (baasiliximab), SOMAVERT (Pegivisomant), SYNAGIS® (palivizumab), Stemben
 5 (Ancestim, Fator de células-tronco), THYROGEN, INTRON® A (Interferon alfa-2b), PEG- INTRON® (Peginterferon alfa-2b), XIGRIS® (Drotrecogina alfa ativada), XOLAIR® (Omalizumab), ZENAP AX® (daclizumab), e ZEVALIN® (Ibritumomab Tiuxetan).

29. Uma composição de acordo com qualquer dos itens
 10 precedentes ou a seguir, sendo que a proteína é Ab-hCD22 ou um fragmento da mesma, ou uma variante, derivado, ou modificação de Ab-hCD22 ou de um fragmento da mesma; Ab-hIL4R ou um fragmento da mesma, ou uma variante, derivado, ou modificação de Ab-hIL4R ou de um fragmento da mesma; Ab-hOPGL ou um fragmento da mesma, ou uma variante, derivado,
 15 ou modificação de Ab-hOPGL ou de um fragmento da mesma, ou Ab-hB7RP 1 ou um fragmento da mesma, ou uma variante, derivado, ou modificação de Ab-hB7RP1 ou de um fragmento da mesma.

30. Uma composição de acordo com qualquer dos itens
 precedentes ou a seguir, sendo que a proteína é: Ab-hCD22 ou Ab-hIL4R ou
 20 Ab-hOPGL ou Ab-hB7RP1.

31. Uma composição de acordo com qualquer dos itens
 precedentes ou a seguir compreendendo uma proteína e um solvente, sendo
 que a proteína apresenta uma capacidade tamponadora por volume unitário
 por unidade de pH de pelo menos 4,0 mM de acetato de sódio em água na
 25 faixa de pH 4,0 a 5,0 ou de pH de 5,0 a 5,5, particularmente como
 determinado por meio dos métodos descritos nos Exemplos 1 e 2, sendo que a
 capacidade tamponadora por volume unitário da composição exclusivamente
 da proteína é igual ou inferior a 2,0 mM de acetato de sódio em água nas
 mesmas faixas determinadas, de preferência, da mesma maneira.

32. Uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir compreendendo uma proteína e um solvente, sendo que no pH da composição a capacidade tamponadora da proteína é de pelo menos 1,63 mEq por litro para uma alteração de pH da composição de mais ou menos 1 unidade de pH, sendo que a capacidade tamponadora da composição exclusiva da proteína é igual ou inferior a 0,81 mEq por litro no pH da composição para uma alteração de pH de mais ou menos 1 unidade de pH.

33. Um liofilizado que após reconstituição proporciona uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir.

34. Kit compreendendo, em um ou mais recipientes, uma composição ou um liofilizado de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, e instruções relativas a seu uso.

35. Processo para preparar uma composição ou um liofilizado de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, compreendendo remoção do tampão residual usando-se um contra-íon.

36. Processo para preparar uma composição ou um liofilizado de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, compreendendo remoção do tampão residual usando-se qualquer um ou mais dos seguintes, na presença de um contra-íon: cromatografia, diálise, e/ou filtração de fluxo tangencial.

37. Processo para preparar uma composição ou um liofilizado de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, compreendendo remoção do tampão residual usando-se filtração de fluxo tangencial.

38. Processo para preparar uma composição ou um liofilizado de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir compreendendo uma etapa de diálise contra uma solução a um pH abaixo daquele da preparação, e, se necessário, ajustar o pH em seguida por meio de adição de ácido diluído ou base diluída.

39. Um método para tratar um indivíduo compreendendo administrar a um indivíduo numa quantidade e por uma via efetiva para tratamento uma composição de acordo com qualquer dos itens precedentes ou a seguir, incluindo um liofilizado reconstituído.

5

Breve descrição das Figuras

Figura 1 ilustra dados de titulação e capacidade tamponadora como uma função para tamponadores padrão de acetato de sódio na faixa de pH de 5,0 a 4,0. Quadro A é um gráfico que ilustra a faixa de pH quando da titulação de ácido de várias concentrações diferentes de um tampão de acetato de sódio padrão, como descrito no Exemplo 1, pH é indicado no eixo vertical. A quantidade de ácido adicionada em cada solução é indicou no eixo horizontal em microequivalentes de HCl adicionados por ml de solução ($\mu\text{Eq/ml}$). A linhas de tendência de menos quadrados lineares são ilustradas para cada conjunto de dados. Concentrações de acetato são indicadas no inserto. Quadro B é um gráfico que ilustra a capacidade tamponadora dos tamponadores de acetato na faixa de pH ácida como determinado a partir dos dados de titulação ilustrados no Quadro A, como descrito no Exemplo 1. A capacidade tamponadora é indicada no eixo vertical como microequivalentes de ácido por ml de solução tamponadora por alteração unitária no pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). A concentração de acetato é indicada no eixo horizontal em mM.

15
20

25

Figura 2 ilustra dados de titulação e capacidade tamponadora como uma função da concentrações para tamponadores padrão de acetato de sódio na faixa de pH de 5,0 a 5,5. Quadro A é um gráfico que ilustra a faixa de pH quando da titulação de base de várias concentrações diferentes de um tampão de acetato de sódio padrão, como descrito no Exemplo 2, pH é indicado no eixo vertical. A quantidade de base adicionada em cada solução é indicada no eixo horizontal em microequivalentes de NaOH adicionada por ml de solução ($\mu\text{Eq/ml}$). As linhas de tendência de menos quadrados lineares

são ilustradas para cada conjunto de dados. Concentrações de acetato são indicadas no inserto. Quadro B é um gráfico que ilustra a capacidade tamponadora dos tamponadores de acetato na faixa de pH básica como determinado a partir dos dados de titulação ilustrados no Quadro A e descrito no Exemplo 2. A capacidade tamponadora é indicada no eixo vertical como micro equivalentes de base por ml de solução tamponadora por alteração unitária no pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). A concentração de acetato é indicada no eixo horizontal em mM.

Figura 3 ilustra a determinação da concentração de acetato em padrões de tampão de acetato, como descrito no Exemplo 3. O gráfico mostra uma curva padrão para as determinações, com área de pico indicada no eixo vertical e a concentração de acetato indicada no eixo horizontal. As quantidades nominal e medida de acetato nas soluções usadas para a determinação empírica da capacidade tamponadora são tabuladas sob o gráfico.

Figura 4 é um gráfico que ilustra a faixa de pH quando da titulação de ácido de várias concentrações diferentes de Ab-hOPGL na faixa de pH 5,0 a 4,0, como descrito no Exemplo 4, pH é indicado no eixo vertical. A quantidade de ácido adicionado às soluções é indicada no eixo horizontal em microequivalentes de HCl adicionados por ml de solução tamponadora ($\mu\text{Eq/ml}$). As linhas de tendência de menos quadrados lineares são ilustradas para cada conjunto de dados. Ab-hOPGL concentrações são indicadas no inserto.

Figura 5 é um gráfico que ilustra a faixa de pH quando da titulação de base de várias concentrações diferentes de Ab-hOPGL na faixa de 5,0 a 6,0, como descrito no Exemplo 5. O pH é indicado no eixo vertical. A quantidade de base adicionada às soluções é indicada no eixo horizontal em microequivalentes de NaOH adicionados por ml de solução tamponadora ($\mu\text{Eq/ml}$). As linhas de tendência de menos quadrados lineares são ilustradas

para cada conjunto de dados. As concentrações de Ab-hOPGL são indicadas no inserto.

Figura 6 mostra os níveis de acetato residuais em soluções de Ab-hOPGL usadas para se determinar a capacidade tamponadora. O gráfico mostra a curva padrão usada para as determinações de acetato como descrito no Exemplo 6. As concentrações de acetato nominal e medida experimentalmente nas soluções são tabuladas sob o gráfico.

Figura 7 é um gráfico que ilustra a capacidade tamponadora de Ab-hOPGL mais ou menos acetato residual na faixa de pH de 5,0 a 4,0. Os dados foram obtidos como descrito no Exemplo 7. A linha superior mostra a capacidade tamponadora do Ab-hOPGL com acetato residual. A linha inferior mostra a capacidade tamponadora do Ab-hOPGL ajustada para o acetato residual. O eixo vertical indica a capacidade tamponadora em microequivalentes de ácido por ml de solução de Ab-hOPGL por unidade de pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). O eixo horizontal indica a concentração de Ab-hOPGL em mg/ml. As capacidades tamponadoras de diferentes concentrações de tamponadores de acetato padrão como descrito no Exemplo 1 são mostradas como linhas horizontais. As concentrações dos tamponadores são indicadas acima das linhas.

Figura 8 é um gráfico que ilustra a capacidade tamponadora de Ab-hOPGL mais ou menos acetato residual na faixa de pH básico de pH 5,0 a 6,0. Os dados foram obtidos como descrito no Exemplo 8. A linha superior ilustra a capacidade tamponadora do Ab-hOPGL com acetato residual. A linha inferior ilustra a capacidade tamponadora do Ab-hOPGL ajustada para acetato residual. O eixo vertical indica a capacidade tamponadora em microequivalentes de base adicionada por ml de solução tamponadora por unidade de pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). O eixo horizontal indica a concentração de Ab-hOPGL em mg/ml. As capacidades tamponadoras de várias concentrações de tamponadores de acetato de sódio padrão como descrito no Exemplo 2 são

indicadas por linhas horizontais. As concentrações de acetato são indicadas acima de cada linha.

Figura 9 ilustra, em um par de gráficos, estabilidade do Ab-hOPGL e pH em formulações auto-tamponadoras e tamponadas convencionalmente. Quadro A ilustra a estabilidade de Ab-hOPGL auto-tamponado, Ab-hOPGL formulado em tampão de acetato, e Ab-hOPGL formulado em glutamato como uma função do tempo de armazenamento a 4°C durante um período de seis meses. O eixo vertical indica estabilidade do Ab-hOPGL em por cento de monômero de Ab-hOPGL determinado por meio de SE-HPLC. Tempo de armazenamento é indicado no eixo horizontal. Quadro B ilustra o pH das mesmas três formulações medido durante o mesmo período. As determinações da estabilidade da proteína e as medições de pH são descritas no Exemplo 9.

Figura 10 ilustra curvas de titulação e capacidades tamponadoras para várias concentrações de formulações de Ab-hB7RP1 auto-tamponadoras na faixa de pH 5,0 a 4,0. Quadro A mostra os dados de titulação. O pH é indicado no eixo vertical. A quantidade de ácido adicionada às soluções é indicada no eixo horizontal em microequivalentes de HCl adicionado por ml de solução tamponadora ($\mu\text{Eq/ml}$). As linhas de tendência de menos quadrados lineares são ilustradas para cada conjunto de dados. As concentrações de Ab-hB7RP1 são indicadas no inserto. Quadro B ilustra as capacidades tamponadoras das formulações de Ab-hB7RP1. A linha superior mostra as capacidades tamponadoras para as formulações incluindo a contribuição de acetato residual. A linha inferior mostra as capacidades tamponadoras para formulações após subtração da contribuição de acetato residual baseado em determinações de SE-HPLC como descrito no Exemplo 3. Linhas de tendência de menos quadrados lineares são mostradas para os dois conjuntos de dados. O eixo vertical indica a capacidade tamponadora em microequivalentes de ACID por ml de solução tamponadora por unidade de

pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). A concentração de Ab-hB7RP1 é indicada no eixo horizontal em mg/ml. As capacidades tamponadoras de várias concentrações de tamponadores de acetato de sódio padrão como descrito no Exemplo 1 são mostradas por linhas horizontais tracejadas. A concentração de tampão de acetato é mostrada abaixo de cada linha. Os resultados foram obtidos como descrito no Exemplo 10.

Figura 11 ilustra curvas de titulação e capacidades tamponadoras para várias concentrações de formulações de Ab-hB7RP1 auto-tamponadoras na faixa de pH 5,0 a 6,0. Quadro A mostra os dados de titulação. O pH é indicado no eixo vertical. A quantidade de base adicionada às soluções é indicada no eixo horizontal em microequivalentes de NaOH adicionado por ml de solução tamponadora ($\mu\text{Eq/ml}$). As linhas de tendência de menos quadrados lineares são ilustradas para cada conjunto de dados. As concentrações de Ab-hB7RP1 são indicadas no inserto. Quadro B ilustra as capacidades tamponadoras de formulações de Ab-hB7RP1. A linha superior mostra as capacidades tamponadoras para as formulações contendo acetato residual. A linha inferior mostra as capacidades tamponadoras para formulações ajustadas de forma a remover a contribuição de acetato residual. Linhas de tendência de menos quadrados lineares são mostradas para os dois conjuntos de dados. O eixo vertical indica a capacidade tamponadora em microequivalentes de base por ml de solução tamponadora por unidade de pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). A concentração de Ab-hB7RP1 é indicada no eixo horizontal em mg/ml. As capacidades tamponadoras de várias concentrações de tamponadores de acetato de sódio padrão como descrito no Exemplo 2 são mostradas por linhas horizontais tracejadas. As concentrações de tampão de acetato são mostradas acima de cada linha. Os resultados foram obtidos como descrito no Exemplo 11.

Figura 12 ilustra a estabilidade do Ab-hB7RP1 em formulações auto-tamponadoras e tamponadas convencionalmente a 4°C e

29°C. Quadro A ilustra a estabilidade de Ab-hB7RP1 auto-tamponado, Ab-hB7RP1 formulado em tampão de acetato, e Ab-hB7RP1 formulado em glutamato como uma função do armazenamento a 4°C durante um período de seis meses. O eixo vertical ilustra o monômero de Ab-hB7RP1 nas amostras determinado por meio de SE-HPLC. O tempo é indicado no eixo horizontal. Quadro B ilustra a estabilidade das mesmas três formulações como uma função do armazenamento a 29°C durante o mesmo período. Eixos no Quadro B são os mesmos como no Quadro A. As determinações da estabilidade da proteína por meio de HPLC-SE são descritas no Exemplo 12.

Figura 13 ilustra estabilidade do pH formulações auto-tamponadoras de Ab-hB7RP1 a 4°C e 29°C. O eixo vertical indica o pH. Tempo, em semanas, é indicado no eixo horizontal. Temperaturas dos conjuntos de dados são indicadas no inserto. Os dados foram obtidos como descrito no Exemplo 13.

Figura 14 ilustra a capacidade tamponadora de formulações auto-tamponadoras de Ab-hCD22 como uma função da concentração de Ab-hCD22 na faixa de pH 4,0 a 6,0. Quadro A ilustra as capacidades tamponadoras de formulações de Ab-hCD22 auto-tamponadoras como uma função da concentração de Ab-hCD22 na faixa de pH 4,0 a 5,0. Quadro B ilustra as capacidades tamponadoras de formulações de Ab-hCD22 auto-tamponadoras como uma função da concentração na faixa de pH 5,0 a 6,0. Em ambos os quadros o eixo vertical indica a capacidade tamponadora em microequivalentes de base por ml de solução tamponadora por unidade de pH ($\mu\text{Eq}/\text{ml-pH}$), e o eixo horizontal indica concentrações de Ab-hCD22 em mg/ml. Como referência, a capacidade tamponadora de 10 mM de acetato de sódio como descrito no Exemplo 1 é mostrada em ambos os quadros por meio de uma linha horizontal tracejada. Os resultados mostrados na Figura foram obtidos como descrito no Exemplo 14.

Figura 15 ilustra curvas de titulação e capacidades

tamponadoras para várias concentrações de formulações de Ab-hIL4R auto-tamponadoras na faixa de pH 5,0 a 4,0. Quadro A mostra os dados de titulação. O pH é indicado no eixo vertical. A quantidade de ácido adicionada às soluções é indicada no eixo horizontal em microequivalentes de HCl
5 adicionado por ml de solução tamponadora ($\mu\text{Eq/ml}$). As linhas de tendência de menos quadrados lineares são ilustradas para cada conjunto de dados. As concentrações de Ab-hIL4R são indicadas no inserto. Quadro B ilustra as capacidades tamponadoras de Ab-hIL4R como uma função da concentração. A linha de tendência de menos quadrados linear é mostrada para o conjunto
10 de dados. O eixo vertical indica a capacidade tamponadora em microequivalentes de base por ml de solução tamponadora por unidade de pH ($\mu\text{Eq/ml-pH}$). A concentração de Ab-hIL4R é indicada no eixo horizontal em mg/ml. As capacidades tamponadoras de várias concentrações de tamponadores de acetato de sódio padrão como descrito no Exemplo 1 são
15 mostradas por linhas horizontais tracejadas. As concentrações de tampão de acetato são mostradas acima de cada linha. Os resultados foram obtidos como descrito no Exemplo 15.

Figura 16 ilustra curvas de titulação e capacidades tamponadoras para várias concentrações de formulações de Ab-hIL4R auto-tamponadoras na faixa de pH 5,0 a 6,0. Quadro A mostra os dados de
20 titulação. O pH é indicado no eixo vertical. A quantidade de base adicionada às soluções é indicada no eixo horizontal em microequivalentes de NaOH adicionados por ml de solução tamponadora ($\mu\text{Eq/ml}$). As linhas de tendência de menos quadrados lineares são ilustradas para cada conjunto de dados. As
25 concentrações de Ab-hIL4R são indicadas no inserto. Quadro B ilustra as capacidades tamponadoras de Ab-hIL4R como uma função da concentração. A linha de tendência de menos quadrados linear é mostrada para o conjunto de dados. O eixo vertical indica a capacidade tamponadora em microequivalentes de base por ml de solução tamponadora por unidade de pH

($\mu\text{Eq/ml-pH}$). A concentração de Ab-hIL4R é indicada no eixo horizontal em mg/ml. As capacidades tamponadoras de várias concentrações de tamponadores de acetato de sódio padrão como descrito no Exemplo 2 são mostrados por linhas horizontais tracejadas. As concentrações de tampão de acetato são mostradas acima de cada linha. Os resultados foram obtidos como descrito no Exemplo 16.

Figura 17 ilustra Ab-hIL4R e estabilidade do pH em formulações auto-tamponadas e tamponadas com acetato de Ab-hIL4R a 37°C como uma função do tempo. Quadro A é um gráfico de barras apresentando estabilidade do Ab-hIL4R durante quatro semanas a 37°C. O eixo vertical indica estabilidade em por cento de Ab-hIL4R monomérico como determinado por meio de SE-HPLC. O eixo horizontal indica tempo de armazenamento em semanas. O inserto identifica os dados para o acetato e para as formulações auto-tamponadas. Quadro B mostra a estabilidade do pH das mesmas formulações para as mesmas condições e períodos de tempo. O pH é indicado no eixo vertical. Tempo de armazenamento em semanas é indicado no eixo horizontal. Dados para as formulações auto-tamponadas e tamponadas com acetato são indicadas no inserto. Os dados foram obtidos como descrito no Exemplo 17.

Glossário

Os significados atribuídos a vários termos e expressões como usadas aqui são explicados ilustrativamente abaixo.

"Um" ou "uma" significa aqui "pelo menos um", "um ou mais do que um".

"Cerca de", exceto se indicado explicitamente aqui, significa $\forall$ de 20 %. Por exemplo, aqui, cerca de 100 significa de 80 a 120, cerca de 5 significa de 4 a 6, cerca de 0,3 significa de 0,24 a 0,36, e cerca de 60 % significa de 48 % a 72 % (não de 40 % a 80 %).

"Agonista(s)" significa aqui uma entidade molecular que é

diferente de um ligante estimulador correspondente, mas que apresenta o mesmo efeito estimulador. Por exemplo, (embora agonistas operem através de outros mecanismos), para um hormônio que estimula uma atividade por meio de ligação a um receptor de hormônio correspondente, um agonista é uma entidade quimicamente diferente que se liga ao receptor de hormônio e estimula sua atividade.

"Antagonista(s)" significa aqui uma entidade molecular que é diferente de um ligante correspondente e apresenta um efeito oposto. Por exemplo, (embora antagonistas operem por meio de outros mecanismos) um tipo de antagonista de um hormônio que estimula uma atividade por meio de ligação a um receptor de hormônio correspondente é uma entidade química que é diferente do hormônio e que se liga ao receptor de hormônio, mas que não estimula a atividade gerada pela ligação do hormônio, e, mediante esta ação, inibe a atividade efetora do hormônio.

"Anticorpo(s)" é usado aqui de acordo com seu significado ordinário nas técnicas bioquímica e biotecnológica.

Entre anticorpos, como o termo é usado aqui, compreende-se aqueles isolados de fontes biológicas, incluindo anticorpos monoclonais e policlonais, anticorpos preparados por meio de técnicas de DNA recombinante (também referidos aqui, por vezes, como anticorpos recombinantes), incluindo aqueles preparados por meio de processos que envolvem ativar um gene endógeno e aqueles que envolvem a expressão de uma construção de expressão exógena, incluindo anticorpos preparados em cultura de células e aqueles preparados em animais e plantas transgênicas, e anticorpos preparados por meio de métodos envolvendo síntese química, incluindo síntese de peptídeos e semi-síntese de peptídeos. Também se compreende no escopo do termo, como usado aqui, exceto se indicado explicitamente de outra forma, anticorpos quiméricos e anticorpos híbridos, entre outros.

O anticorpo prototípico é uma glicoproteína tetramérica constituída de dois dímeros idênticos de cadeia leve-cadeia pesada conjugados entre si por ligações dissulfeto. Há dois tipos de cadeias leves de vertebrados, capa (κ) e lambda. Cada cadeia leve é constituída de uma região constante e uma região variável. As duas cadeias leves são diferenciadas por seqüências de região constante. Há cinco tipos de cadeias pesadas de vertebrados: alfa, delta, épsilon, gama, e mu. Cada cadeia pesada é constituída de uma região variável e três regiões constantes. Os cinco tipos de cadeia pesada definem cinco classes de anticorpos de vertebrados (isótipos): IgA, IgD, IgE, IgG, e IgM. Cada isótipo é constituído, respectivamente, (a) de duas cadeias pesadas alfa, delta, épsilon, gama, ou mu, e (b) duas cadeias leves capa ou duas lambda. As cadeias pesadas em cada classe associam-se com ambos os tipos de cadeias leves; porém as duas cadeias leves em uma dada molécula são ambas capa, ou ambas lambda. IgD, IgE, e IgG ocorrem geralmente como glicoproteínas heterotetraméricas "livres". IgA e IgM ocorrem geralmente em complexos compreendendo vários heterotetrâmeros IgA ou vários IgM associados com um polipeptídeo de cadeia "J". Alguns isótipos de vertebrados são classificados em subclasses, diferenciados uns dos outros por diferenças de seqüências de região constante. Há quatro subclasses de IgG humana, IgG1, IgG2, IgG3, e IgG4, e as duas subclasses de IgA, IgA1 e IgA2, por exemplo. Todas estas e outras não especificamente descritas acima são incluídas no significado do termo "anticorpo(s)" como usado aqui.

O termo "anticorpo(s)" inclui adicionalmente variantes de seqüências de aminoácidos de qualquer um dos precedentes como descrito adicionalmente alhures aqui.

"Derivado de anticorpos" como usado aqui meio qualquer proteína produzida de um anticorpo, e qualquer proteína de um projeto baseado em um anticorpo. O termo inclui em seu significado proteínas produzidas usando todo um anticorpo ou parte do mesmo, aqueles

compreendendo todo ou parte de um anticorpo, e aqueles projetados em parte ou integralmente com base em todo ou parte de um anticorpo. Proteínas "derivadas de anticorpo" incluem, embora sem limitação, fragmentos Fc, Fab, e Fab, e proteínas compreendendo os mesmos, fragmentos de domínio V_H e 5 domínio VL e proteínas compreendendo os mesmos, outras proteínas que compreendem uma região variável e/ou uma região constante de um anticorpo, ao todo ou em parte, intracorpos de scFv(s), maxicorpos, minicorpos, diacorpos, variantes de seqüências de aminoácidos dos precedentes, e uma variedade de outras moléculas do tipo referido, incluindo, 10 embora sem limitação, outras aqui descritas.

"Relacionado com anticorpo" como usado aqui significa qualquer proteína ou mimético similar em estrutura, função, ou projeto de um anticorpo ou qualquer parte de um anticorpo. Entre proteínas "relacionadas com anticorpos", como o termo é usado aqui, compreende-se proteínas 15 "derivadas de anticorpos" como descrito acima. Deve-se observar que os termos "derivado de anticorpo" e "relacionado com anticorpo" se sobrepõem substancialmente; ambos os termos aplicam-se a muitas proteínas do tipo referido. Exemplos de proteínas "relacionadas com anticorpo", sem implicar qualquer limitação neste aspecto, compreendem peptícorpos e receptícorpos. 20 Outros exemplos de proteínas "relacionadas com anticorpo" são descritas alhures aqui.

"Polipeptídeo(s) de anticorpos" como usado aqui, exceto se indicado de outra forma, meio um polipeptídeo que é parte de um anticorpo, como um polipeptídeo de cadeia leve, um polipeptídeo de cadeia pesada e um 25 polipeptídeo de cadeia J, para mencionar alguns poucos exemplos, incluindo, entre outros, fragmentos, derivados, e variantes dos mesmos, e polipeptídeos relacionados.

"Aproximadamente", exceto se indicado de outra forma, significa o mesmo que 'cerca de'.

"Porção de ligação ou porções de ligação" meio uma parte de uma molécula ou um complexo de moléculas que se liga especificamente a parte de outra molécula ou complexo de moléculas. A porção de ligação pode ser igual ou diferente da parte da molécula ou complexo de moléculas a que se liga. A porção de ligação também pode ser toda uma molécula ou complexo de moléculas.

"Liga-se especificamente" é usado aqui de acordo com seu significado ordinário na técnica e significa, exceto se indicado de outra forma, que a ligação é mais forte com determinadas porções específicas do que é com outras porções de uma maneira geral, que é mais forte do que a ligação não-específica que pode ocorrer com uma ampla variedade de porções, e que a ligação é seletiva para determinadas porções e não ocorre em medida tão intensa com outras. No caso extremo de ligação específica, ocorrem ligação muito forte com um único tipo de porção, e não há ligação não-específica com qualquer outra porção.

"Co-administrar" significa uma administração de dois ou mais agentes em conjunto um com o outro, incluindo administração simultânea e/ou seqüencial.

"Cognato(s)" significa aqui complementar, adequando-se mutuamente, equiparado, como, por exemplo, dois quebra-cabeças que se encaixam um no outro, o mecanismo de cilindro de uma fechadura e a chave que a abre, o sítio de ligação de substrato de uma enzima e o substrato da enzima, e um alvo e proteína de ligação de alvo que se liga especificamente ao mesmo.

"Porções de ligação cognatas" significa aqui porções de ligação que se ligam especificamente entre si. Tipicamente, mas não sempre, isto significa um par de porções de ligação que se ligam especificamente entre si. As porções responsáveis por ligação altamente seletiva de um ligante específico e receptor de ligante proporcionam um exemplo ilustrativo da

porções de ligação cognatas. Outro exemplo é proporcionado pelas porções que se ligam a um antígeno e um anticorpo.

"Composição" significa qualquer composição de substância compreendendo um ou mais constituintes, como uma formulação.

5 "Constituído de" é um sinônimo de "compreendendo" (ver abaixo).

"Compreendendo" significa incluindo, sem qualificação, limitação, ou exclusão adicional o que pode ou não ser incluído. Por exemplo, "uma composição compreendendo x e y" significa qualquer composição que
10 contém x e y, não importando o que mais pode conter. Da mesma forma, "um método compreendendo x" é qualquer método em que x é realizado, não importa o que mais pode ocorrer.

"Concentração" é usado aqui de acordo com seu significado bem conhecido na técnica significando a quantidade de um item, numa dada
15 quantidade, de uma mistura contendo o item, expresso tipicamente como uma relação. Por exemplo, a concentração de um soluto, como uma proteína em uma solução, pode ser expressa de várias maneiras, como (embora sem limitação): (A) percentual em peso (i) = peso de soluto por 100 unidades de volume de solvente; (B) Percentual em peso (ii) = peso de soluto por 100
20 unidades de peso total; (C) Percentual em peso (iii) = peso de soluto por 100 unidades de solvente em peso; (D) Percentual em peso = massa de soluto por 100 unidades de massa de solução; (E) Fração em mol = moles de soluto por moles totais de todos os componentes; (F) Molaridade = moles de soluto por litro de solução (i.e., soluto mais solvente); (G) Molalidade = moles de soluto
25 por Kg de solvente; e (H) Molalidade em volume = moles de soluto por litro de solvente.

"Região ou regiões de controle" é usado aqui de acordo com seu significado bem conhecido na técnica, e exceto se indicado de outra forma, refere-se a regiões no DNA ou proteínas que são responsáveis para

controlar uma ou mais funções ou atividades das mesmas. Por exemplo, "região de controle de expressão" com referência ao controle da expressão gênica, significa as regiões no DNA que são necessárias para que ocorra transcrição apropriada e que estão envolvidas na regulação quando ocorre transcrição, quão eficientemente isto ocorre, quando é interrompido, e análogos.

"*De novo*" é usado aqui de acordo com seu significado bem conhecido na técnica, para indicar algo feito a partir do novo. Por exemplo, uma sequência de aminoácidos *de novo* é uma que não é derivada de uma sequência de aminoácidos naturalmente ocorrente, muito embora uma referida sequência *de novo* pode apresentar similaridades com uma sequência naturalmente ocorrente. Sequências de aminoácidos *de novo* podem ser geradas, por exemplo, por meio de um projeto prévio, por meio de métodos combinatoriais, por meio de métodos de seleção. Elas podem ser realizadas, por exemplo, por meio de síntese química, por meio de semi-síntese, e por meio de uma variedade de técnicas de DNA recombinante, todas elas bem conhecidas por aqueles com prática na técnica.

"Deletério" significa, como usado aqui, prejudicial. A título de ilustração, processos "deletérios" incluem, por exemplo, efeitos nocivos de processos de doença e efeitos colaterais nocivos de tratamentos.

"Derivado(s)" é usado aqui para significar derivado, em substância, forma, ou design, como por exemplo, um polipeptídeo que é baseado em um polipeptídeo de referência, mas que difere do mesmo, por exemplo, por meio de alterações em sua sequência de aminoácidos, por meio de fusão a outro polipeptídeo, ou por meio de modificação covalente.

"Doença(s)" [é] uma patologia, uma condição que afeta prejudicialmente a saúde de um indivíduo.

"Distúrbio(s)" [é] um acometimento, uma condição que altera prejudicialmente a saúde.

"Disfunção" significa, como usado aqui, um distúrbio, doença, ou efeito deletério de um processo de outra forma normal.

"Quantidade efetiva" significa geralmente uma quantidade que proporciona o efeitos local ou sistêmico desejado. Por exemplo, uma
5 quantidade efetiva é uma quantidade suficiente para efetuar um resultado clínico benéfico ou desejado. A quantidade efetiva pode ser proporcionada de uma só vez em uma única administração ou em quantidades fracionadas que proporcionam a quantidade efetiva em diversas administrações. A determinação precisa do que poderia ser considerado uma quantidade efetiva
10 pode basear-se em fatores individuais para cada indivíduo, incluindo seu tamanho, idade, lesão, e/ou doença ou lesão que está sendo tratada, e do tempo decorrido desde que a lesão ocorreu ou a doença começou. Alguém com prática na técnica será capaz de determinar a quantidade efetiva para um dado indivíduo com base nestas considerações que são rotineiras na técnica.
15 Como usado aqui, "dose efetiva" significa o mesmo que "quantidade efetiva".

"Via efetiva" significa geralmente uma via que proporciona fornecimento de um agente em um compartimento desejado, sistema ou local desejado. Por exemplo, uma via efetiva é uma através da qual um agente pode ser administrado para proporcionar, no sítio de ação desejado, uma quantidade
20 do agente que é suficiente para efetuar um resultado clínico benéfico ou desejado.

"Endógeno" (como um gene endógeno) é usado aqui para referir, por exemplo, a genes e outros aspectos do DNA, como regiões de controle, que ocorrem naturalmente em um genoma e organismo, exceto se
25 indicado de outra forma.

"Exógeno" (como gene exógeno), exceto se indicado de outra forma, é usado aqui de uma maneira geral significando, por exemplo, DNA de uma fonte exterior, como DNA introduzido numa célula e incorporado em seu genoma.

"FBS" significa soro bovino fetal [FBS].

"Formulação(Formulações)" significa uma combinação de pelo menos um ingrediente ativo com um ou mais outros ingredientes para um ou mais usos particular, como armazenamento, processamento adicional, venda, e/ou administração a um indivíduo, como, por exemplo, administração a um indivíduo de um agente específico numa quantidade específica, por meio de uma via específica, para tratar uma doença específica.

"Fragmento(s)" significa aqui parte de uma entidade maior, como um parte de uma proteína; por exemplo, um polipeptídeo que consiste de menos do que a seqüência de aminoácidos inteira de um polipeptídeo maior. Como usado aqui, o termo inclui fragmentos formados por meio de deleção terminal e fragmentos formados por meio de deleção interna, incluindo aqueles em que duas ou mais porções não-contíguas de um polipeptídeo são conjugadas entre si para formar um polipeptídeo menor, que é um fragmento do original.

"Proteína(s) de fusão" significa aqui uma proteína formada por meio de fusão de polipeptídeos inteiros ou de parte de dois polipeptídeos, que podem ser iguais ou diferentes. Proteínas de fusão típicas são preparadas por meio de técnicas de DNA recombinantes, por meio de conjugação ponta-a-ponta de nucleotídeos codificando os dois (ou mais) polipeptídeos.

"Geneticamente modificado" significa aqui produzido usando-se um processo em que se usa um processo deliberado de alteração genética, como por meio de tecnologia de DNA recombinante, métodos clássicos de manipulação genética, métodos químicos, uma combinação de todos os três, ou outros métodos.

"Homólogo(s)" significa aqui apresentando homologia com outra entidade, como uma proteína que é homóloga com outra proteína. Homólogo significa assemelhando-se em estrutura ou em função.

"Ionização" significa aqui a alteração da carga pura em uma

substância por pelo menos um, incluindo perda ou ganho de carga, como a ionização de ácido acético, em solução de baixo pH, de HOAc a OAc⁻ e H⁺.

"k" indica aqui um equilíbrio co-eficiente, de acordo com seu significado convencional na química.

5 "k_a" indica aqui a constante de dissociação de um hidrogênio particular de uma molécula, de acordo com seu significado convencional na química, como, por exemplo, a constante de dissociação do hidrogênio ácido do ácido acético.

10 "k_d" indica aqui uma constante de dissociação de um par de entidades químicas (ou porções), de acordo com seu significado convencional na química.

"Kit" significa uma reunião de itens usados em conjunto para um determinado fim ou fins.

15 "Ligante(s)" significa aqui uma entidade molecular que se liga seletivamente e estequiometricamente a um ou mais sítios específicos em uma ou mais entidades moleculares. Tipicamente, ligação é não-covalente, mas também pode ser covalente. Alguns poucos exemplos, entre muitos outros, são (a) antígenos, que se ligam tipicamente não-covalentemente aos sítios de ligação em anticorpos cognatos; (b) hormônios, que se ligam tipicamente a
20 receptores de hormônios, de maneira não-covalente; (c) lectinas, que se ligam especificamente açúcares, não-covalentemente; (d) biotinas, que ligam sítios múltiplos na avidina e outras proteínas similares a avidina, não-covalentemente; (e) antagonistas de hormônios, que se ligam a receptores de hormônios e inibem sua atividade e/ou aquela do hormônio correspondente; e
25 (f) agonistas de hormônios, que, de maneira análoga, ligam-se a receptores de hormônios mas estimulam sua atividade.

"Porção/Porções de ligação de ligante" significa aqui uma entidade molecular que se liga a um ligante, tipicamente, uma parte de uma entidade molecular maior que se liga ao ligante, ou uma entidade molecular

derivada do mesmo.

"Proteína(s) de ligação de ligante" significa aqui uma proteína que se liga a um ligante.

5 "Porção/Porções de ligante" significa aqui uma entidade molecular que se liga a um entidade molecular de ligação de ligante de maneira muito parecida à que ocorre com o ligante correspondente. Um porção de ligante pode ser um ligante inteiro, ou parte do mesmo, derivado de um ligante, ou gerado *de novo*. Tipicamente, contudo, a porção de ligante é mais ou menos exclusivamente o seu aspecto que se liga a entidades de
10 ligação de ligante correspondentes. A porção de ligante não precisa compreender, e o termo geralmente não o indica, características estruturais diferentes daquelas exigidas para ligação de ligante.

"mEq" significa aqui miliequivalente(s).

"µEq" significa aqui microequivalente(s).

15 "Mimético (s)" significa aqui uma entidade química com características estruturais ou funcionais de outra entidade química geralmente não-relacionada. Por exemplo, um tipo de mimético de hormônio é uma molécula orgânica não-peptídica que se liga ao receptor correspondente da mesma maneira que o hormônio correspondente.

20 "mM" meio milimolar; 10^{-3} moles por litro.

"Proteína(s) modificada", "polipeptídeo(s) modificado(s), ou "fragmento(s) modificado(s)" significa aqui uma proteína ou um polipeptídeo ou um fragmento de uma proteína ou polipeptídeo compreendendo uma porção química (estrutura) diferente daquela dos vinte aminoácidos
25 naturalmente ocorrentes que formam proteínas naturalmente ocorrentes. Na maior parte das vezes, modificações são ligadas covalentemente, mas também podem ser ligadas não-covalentemente a uma proteína ou outro polipeptídeo, como um fragmento de uma proteína.

"Porção/Porções" significa aqui uma entidade molecular que

concretiza uma estrutura e/ou função específica, sem componentes estranhos. Por exemplo, na maior parte dos casos, apenas uma pequena parte de uma proteína de ligação de ligante é responsável pela ligação de ligante. Esta parte da proteína, quer codificada continuamente ou descontinuamente, é um exemplo de uma porção de ligação de ligante.

"Naturalmente ocorrente" significa que ocorre na natureza, sem intervenção humana.

"Não-naturalmente ocorrente" significa que não ocorre na natureza ou, se ocorrer na natureza, não se encontra em seu estado, ambiente, circunstâncias ou análogos, naturalmente ocorrentes.

"PBS" significa solução salina tamponada com fosfato.

"Peptícorpo" refere-se a uma molécula compreendendo um domínio Fc de anticorpo (i.e., domínios de C_H2 e C_H3 de anticorpo) que exclui anticorpo C_H1, CL, VH, e LVs de domínio e também Fab e F(ab)₂, sendo que o domínio Fc é ligado a um ou mais peptídios, de preferência, um peptídio farmacologicamente ativo, de forma particularmente preferível um peptídio farmacologicamente ativo gerado randomicamente. A produção de peptícorpos é descrita, de uma maneira geral, na publicação PCT WO00/24782, publicada em 4 de maio de 2000, que é incorporada aqui integralmente por referência, particularmente quanto à estrutura, síntese, propriedades, e usos de peptícorpos.

"Peptídeo(s)" significa aqui o mesmo que polipeptídeo; freqüentemente, mas não necessariamente, é usado com referência a um polipeptídeo relativamente curto.

"pH" é usado de acordo com sua definição universal e bem conhecida, como a seguir:

$$\text{pH} = \log[\text{H}_3\text{O}^+]$$

"Farmacêutico" como usado aqui significa que é aceitável para uso em um indivíduo humano ou não-humano visando o seu tratamento,

particularmente para uso em humanos, e que é aprovado para o mesmo por uma autoridade reguladora com poderes para regular o seu uso, como por exemplo, a Administração de Alimentos e Drogas nos Estados Unidos [FDA], Agência Européia para a Avaliação de Produtos Mediciais, Ministério da Saúde, Trabalho e Previdência do Japão, ou outra agência reguladora, como aquelas listadas por R. Ng, DRUGS: FROM DISCOVERY TO APPROVAL [Drogas: da Descoberta à Aprovação], Wiley-Liss (Hoboken, NJ) (2004), que é incorporada aqui integralmente por referência, particularmente no que se refere às autoridades reguladoras que tratam da aprovação da droga, particularmente como listado no Capítulo 7. Como usado aqui, a expressão "sendo que a composição foi aprovada para uso farmacêutico por uma autoridade legalmente autorizada para conceder referida aprovação" significa uma entidade ou instituição ou análoga, estabelecida por lei e encarregada por lei com a responsabilidade e o poder de regular e aprovar o uso de drogas para uso em humanos, e, em alguns casos, em não-humanos. A aprovação por qualquer uma dessas agências em qualquer lugar atende esta qualificação. Não é necessário que a agência aprovadora seja aquela do estado em que, por exemplo, está ocorrendo a infração. Exemplos de referidas entidades incluem a Administração de Alimentos e Drogas [FDA] dos E.U.A. e outras agências listadas aqui acima.

Como usado aqui, "farmacêutico" também pode referir-se a um produto produzido de acordo com boas práticas de fabricação, como aquelas descritas, entre outros, no Capítulo 9 e Capítulo 10 de R. Ng, DRUGS: FROM DISCOVERY TO APPROVAL, Wiley-Liss (Hoboken, NJ) (2004), que é incorporada aqui integralmente por referência, particularmente em partes pertinentes às boas práticas de fabricação para formulações de proteínas farmacêuticas, em particular, como apresentado nos Capítulos 9 e 10.

"Farmaceuticamente aceitável" é usado aqui de acordo com

seu significado bem conhecido na técnica para indicar que é aceitável para uso médico e veterinário, de preferência, para uso médico em humanos, particularmente aprovado para tal uso pela Administração de Alimentos e Drogas dos E.U.A. ou outra autoridade como descrito acima com relação ao significado de "farmacêutico".

"Polipeptídeo(s)" ver "Proteína(s)".

"Precursor(es)" é usado aqui de acordo com seu significado bem conhecido na técnica para indicar uma entidade de que outra entidade é derivada. Por exemplo, uma proteína precursora é uma proteína que é submetida a processamento, como modificação ou clivagem proteolítica, dando origem, com isso, a outra proteína precursora (que será submetida a processamento adicional) ou uma proteína madura.

"Proteína(s)" significa aqui um polipeptídeo ou um complexo de polipeptídeos, de acordo com seu significado bem conhecido na técnica. Como usado aqui, "proteína(s)" inclui polipeptídeos de cadeia reta e também de cadeia ramificada. Isto inclui polipeptídeos não-modificados e modificados, incluindo modificações naturalmente ocorrentes e aquelas que não ocorrem naturalmente. Referidas modificações incluem modificações químicas das terminações, da espinha dorsal do peptídeo, e das cadeias laterais de aminoácidos; substituições, deleções e adições de aminoácidos; e a incorporação de aminoácidos inéditos e outras porções, apenas para nomear algumas poucas modificações do tipo referido. Isto também inclui polipeptídeos "manipulados" e complexos dos mesmos, como, embora sem limitação, qualquer polipeptídeo ou complexo de polipeptídeos que foi alterado deliberadamente em sua estrutura por, por exemplo, técnicas de DNA recombinantes, síntese química, e/ou modificação covalente, incluindo alteração deliberada de seqüência de aminoácidos e/ou modificações pós-tradução.

"Protonação" significa a adição de pelo menos um hidrogênio.

"Auto-tamponador" significa a capacidade de uma substância, como uma proteína farmacêutica, para resistir alteração de pH suficiente para uma dada aplicação, na ausência de outros tamponadores.

5 "Semi-*de novo*" significa aqui (a) parcialmente projetado de acordo com uma referência particular e ou produzido de um precursor, e (b) parcialmente projetado sem referência a uma referência particular (como projetado unicamente por princípios gerais e não baseado em qualquer referência particular). Por exemplo, um polipeptídeo preparado produzindo-se um primeiro peptídeo em um sistema de expressão bacteriana, produzindo-se
10 um segundo peptídeo por meio de síntese química, e, depois, conjugando-se os dois peptídios em conjunto para formar o polipeptídeo.

"Semi-síntese" significa como usado aqui uma combinação de métodos de síntese químicos e não-químicos.

"Indivíduo" significa um vertebrado, como um mamífero,
15 como um humano. Mamíferos incluem, embora sem limitação, humanos, animais agrícolas, animais esportivos, e animais de companhia. Indivíduos que necessitam de tratamento por meio de métodos e/ou composições da presente invenção incluem aqueles que sofrem de um distúrbio, disfunção, ou doença, ou um efeito colateral do mesmo, ou de um efeito colateral de um
20 tratamento do mesmo.

"Substancialmente" é usado aqui de acordo com sua definição simples e ordinária como significando uma grande extensão ou grau. Por exemplo, substancialmente completo significa completo em grande parte, completo até um grau elevado. A título de ilustração adicional,
25 substancialmente livre de resíduo significa livre de resíduo até grande parte, livre de resíduo até um grau elevado. Caso se exija precisão numérica, dependendo do contexto, "substancialmente" como usado aqui significa, pelo menos, 80 % ou mais, particularmente 90 % ou mais, muito particularmente 95 % ou mais.

"Terapeuticamente efetivo" é usado aqui de acordo com seu significado bem conhecido na técnica para indicar aquilo que proporciona um aperfeiçoamento no prognóstico ou na condição de um indivíduo ou que, de outra forma, proporciona um objetivo terapêutico, incluindo, por exemplo, uma redução na taxa de progresso de uma doença, mesmo que a condição de um indivíduo, continue a deteriorar-se.

"Quantidade therapeuticamente efetiva" é usado geralmente para qualificar a quantidade de um agente que compreende aquelas quantidades que proporcionam um melhoramento na gravidade do distúrbio. Por exemplo, agentes terapêuticos neoplásicos efetivos prolongam a capacidade de sobrevivência do indivíduo, inibem o crescimento de células rapidamente proliferante associado com o neoplasma, ou efetua uma regressão do neoplasma. Tratamentos que são therapeuticamente efetivos no significado do termo como usado aqui, incluem tratamentos que melhoram a qualidade de vida do indivíduo mesmo que não se melhore o desfecho da doença per se.

"Tratar", "tratando" ou "tratamento" são usados amplamente em relação à invenção e cada termo desses compreende, entre outros, prevenir, melhorar, inibir, ou curar a deficiência, disfunção, doença, ou outro processo deletério, incluindo aqueles que interferem com e/ou resultam de uma terapia.

"Variante(s)" significa aqui uma versão sintética ou naturalmente ocorrente de, por exemplo, uma proteína que é estruturalmente diferente da original, mas relacionada em estrutura e/ou função, como uma variante alélica, um parálogo, ou um homólogo de uma proteína.

Descrição da invenção

A invenção proporciona, pela primeira vez, formulações de proteína auto-tamponadoras, particularmente formulações de proteínas biofarmacêuticas, métodos para preparar as formulações, e métodos para usar

as formulações, entre outras coisas. Qualquer proteína que proporciona suficiente capacidade tamponadora na faixa de pH requerida a uma concentração vantajosa para seu uso intencionado pode ser preparada como um formulação de proteína auto-tamponadora de acordo com a invenção. A invenção pode ser praticada com uma variedade de proteínas, incluindo tanto proteínas naturalmente ocorrentes como também proteínas "manipuladas", particularmente proteínas biofarmacêuticas, como discutido adicionalmente abaixo.

A utilidade de proteínas, particularmente proteínas biofarmacêuticas, a serem formuladas em composições auto-tamponadoras, particularmente composições farmacêuticamente aceitáveis, não foi reconhecida antes da invenção aqui divulgada. A influência de proteínas na regulação do pH fisiológico foi reconhecida e estudada durante algum tempo. No entanto, até aqui não se reconheceu que proteínas, particularmente proteínas biofarmacêuticas, podem apresentar suficiente capacidade tamponadora para manter uma formulação dentro de uma faixa de pH desejada, sem agentes tamponadores adicionais.

Proteínas biofarmacêuticas para uso nos Estados Unidos são formuladas como soluções tamponadas, soluções não-tamponadas, suspensões amorfas ou cristalinas, e liofilizados.

A maior parte das formulações de solução tamponada usa um agente tamponador convencional. Duas proteínas, Pulmozyme® e Humulin®, são formuladas como soluções sem agentes tamponadores convencionais. Nenhuma destas proteínas proporciona substancial capacidade auto-tamponadora nas formulações.

Pulmozyme® tem um peso molecular de cerca de 37.000 Daltons e contém 5 histidinas, 22 ácidos aspárticos, e 12 ácidos glutâmicos, entre seus 260 aminácidos. A capacidade tamponadora da proteína dentro de 0,5 unidades de pH de pH 6,3 é determinada substancialmente de acordo com

seu teor de histidina. Com base nisto, o limite superior da capacidade auto-tamponadora da formulação é determinado pela concentração efetiva dos radicais histidina, 0,15 mM. A concentração molar de ácido aspártico e de ácido glutâmico na formação é de 0,9 mM. A concentração molar total de todos os três aminoácidos em conjunto, assim, encontra-se pouco acima de 1 mM, na concentração da formulação.

Humulin® é formulada a 3,5 g/ml. Ela apresenta um peso molecular de cerca de 6.000 Daltons e contém 2 ácidos aspárticos, 8 ácidos glutâmicos, e 2 histidinas. Nenhum destes aminoácidos é um tamponador particularmente efetivo no pH da formulação: de 7,0 a 7,8. A esta concentração a concentração molar de histidinas, que são mais próximas no pK_a ao pH da formulação, é de 1,16 mM.

Os liofilizados biofarmacêuticos são reconstituídos antes do uso formando soluções ou suspensões. A maior parte dos liofilizados contém tamponadores convencionais que conservam o pH apropriado das formulações reconstituídas. Alguns poucos outros, em que a concentração de proteína é baixa ou o pH precisa ser baixo (inferior a 3) ou alto (maior que 9,5), são efetivamente não-tamponados.

Assim, o tamponamento é obtido em formulações correntes de proteínas biofarmacêuticas usando-se agentes tamponadores convencionais. A capacidade de proteínas de, elas próprias, tamponarem formulações de proteínas farmacêuticas não foi plenamente apreciada e não foi usada para a fabricação de farmacêuticos de proteínas.

A determinação de proteína numa capacidade tamponadora, tipicamente, é importante para desenvolver formulações de proteína auto-tamponadoras de acordo com a invenção. Pertinente a isto, descreve-se abaixo métodos para medir a capacidade tamponadora e para determinar a capacidade tamponadora de proteínas. Para permitir fácil comparação de dados, a capacidade tamponadora da proteína precisa ser expressa em

unidades comparáveis e/ou relacionada com um padrão tamponador. Assim, a seção a seguir descreve medidas de pH e padrões que atendem estas exigências, de acordo com a invenção.

1. Tamponamento

5 Uma definição de tamponamento amplamente aceita é a resistência à alteração do pH de uma composição ao se adicionar ácido ou base. Assim, a capacidade tamponadora é freqüentemente definida como a capacidade de uma composição em resistir à alteração do pH.

10 Tipicamente, a capacidade tamponadora é expressa em termos da quantidade de base ou ácido forte requerida para alterar o pH de uma composição numa determinada quantidade. Van Slyke proporcionou a medida quantitativa mais amplamente usada de capacidade tamponadora, de acordo com o que, para uma solução, a capacidade tamponadora é expressa como a
15 da solução por uma unidade de pH em condições padrão de temperatura e pressão.

De acordo com esta medida, por exemplo, a capacidade tamponadora de 1 litro de HOAc 5 mM, NaOAc 5 mM, pH 4,76 em água pura é de $4,09 \times 10^{-3}$ moles de uma base forte univalente (i.e., $4,09 \times 10^{-3}$ equivalentes de base), que pode ser calculada como a seguir. A equação de
20 Henderson-Hasselbalch para a solução é: $\text{pH} = \log \{ [5 \text{ mM}] \text{NaOAc} / [5 \text{ mM}] \text{HOAc} \} + 4,76$

Assim, a concentração X de uma base forte univalente requerida para incrementar o pH deste tamponador é:

25 de 4,76 a 5,76 é $5,76 = \log \{ [5 \text{ mM} + X \text{ mM}] \text{NaOAc} / [5 \text{ mM} - X \text{ mM}] \text{HOAc} \} + 4,76$

Assim:

$1,00 = \log \{ [5 \text{ mM} + X \text{ mM}] \text{NaOAc} / [5 \text{ mM} - X \text{ mM}] \text{HOAc} \}$

$$10,0 = [5 \text{ mM} + X \text{ mM}] \text{ NaOAc} / [5 \text{ mM} - X \text{ mM}] \text{ HOAc}$$

$$10,0 = (5 \text{ mM} + X \text{ mM}) / (5 \text{ mM} - X \text{ mM})$$

$$50 \text{ mM} - 10X \text{ mM} = 5 \text{ mM} + X \text{ mM}$$

$$11X \text{ mM} = 45 \text{ mM}$$

$$5 \quad X = 4,09 \text{ mM},$$

que proporciona, para um litro:

$$(4,09 \times 10^{-3} \text{ moles/litro})(1 \text{ litro})(1 \text{ equivalente/mol}) = 4,09 \times 10^{-3} \text{ equivalentes}$$

Assim, de acordo com esta medida, a capacidade tamponadora de 1 litro de um tampão de acetato 10 mM contendo 5 mM de NaOAc e 5 mM de HOAc a um pH de 4,76 em água pura é de $4,09 \times 10^{-3}$ equivalentes de base por litro por unidade de pH. Explicado de outra maneira, a capacidade tamponadora da solução é 4,09 miliequivalentes de base por litro por unidade de pH, 4,09 microequivalentes de base por mililitro por unidade de pH, 0,409 microequivalentes de base por 100 microlitros por unidade de pH, 40,9 nanomoles de base por 10 microlitros por unidade de pH, e 4,09 nanomoles de base por microlitro por unidade de pH.

O mesmo cálculo fornece a capacidade tamponadora a seguir para outras concentrações deste tampão de acetato a pH 4,76. 2 mM de tampão de acetato como acima têm uma capacidade tamponadora de 0,818 mEq por litro por unidade de pH. A 4 mM, a capacidade tamponadora é de 1,636 mEq por litro por unidade de pH. A capacidade a 5 mM é de 2,045 mEq por litro por unidade de pH. A 7,5 mM, a capacidade é de 3,068 mEq por litro por unidade de pH. A 10 mM, o tampão de acetato apresenta uma capacidade tamponadora de 4,091 mEq por litro por unidade de pH. A 15 mM, esta capacidade é de 6,136 mEq por litro por unidade de pH.

É digno de nota que uma solução tamponadora do acetato no pK_a de ácido acético (pH 4,76) é equimolar em ácido acético e base de acetato, (i.e., no pK_a o ácido e a base estão presentes em quantidades iguais).

Como um resultado, a resistência à alteração do pH (capacidade tamponadora) de um tampão de acetato no pK_a do ácido acético é a mesma para adição de ácido e base. O equíponto para ácido e base é uma característica geral de agentes tamponadores em tamponadores a um pH igual a seu pK_a .

A qualquer outro pH, um tamponador conterá quantidades diferentes de formas de base e ácido e, portanto, conterá diferentes quantidades de formas de base e ácido e, portanto, sua resistência a alteração (i.e., sua capacidade tamponadora) mediante adição de ácido não será igual a sua resistência a alteração após adição de base. Como um resultado, é preferível definir a capacidade de referidos tamponadores em termos de (i) a quantidade de ácido requerida para diminuir o pH em uma unidade, e (ii) a quantidade de base requerida para elevar o pH em uma unidade.

A divisão em um tamponador entre formas de base e ácido em uma dada composição, como um padrão de pH, pode ser calculado a qualquer pH e concentração de tamponador usando-se os procedimentos apresentados acima na descrição da capacidade tamponadora de 10 mM de NaOAc a pH 4,76 mais ou menos (contendo quantidades equimolares de ácido acético e acetato de sódio) e os resultados podem ser usados para definir a capacidade tamponadora de um padrão para uso de referência.

Assim, por exemplo, a divisão de ácido acético em ácido acético e base de acetato em uma solução a pH 5,0 pode ser calculada facilmente usando-se os procedimentos a seguir, e esta capacidade tamponadora pode ser calculada tanto para base como para adição de ácido. Calculado desta forma, a capacidade tamponadora teórica de 10 mM de tampão de acetato de sódio na faixa de pH de 5,0 a 5,5 é de aproximadamente 2,1 mM por 0,5 unidade de pH, e de 4,2 mM por unidade de pH. Colocado de outra forma, a capacidade tamponadora do tamponador, teoricamente, é de aproximadamente 4,2 μ Eq por ml de solução tamponadora por unidade de

alteração de pH. De maneira análoga, a capacidade tamponadora teórica de 10 mM de tampão de acetato de sódio na faixa de pH de 5,0 a 4,0 é de 4,9 mM, e, colocado de outra forma, 4,9 μ Eq por ml de tamponador por unidade de alteração de pH numa dada faixa de pH.

5 Embora referidos cálculos sejam freqüentemente bastante úteis em muitos casos, prefere-se padrões empíricos e determinações empíricas. Entre padrões empíricos particularmente preferidos encontram-se tamponadores de acetato de sódio na faixa de pH 5,0 a 4,0 e pH 5,0 a 5,5 como exemplificado nos Exemplos 1 e 2. Prefere-se particularmente
10 tamponadores de acetato de sódio de acordo com os quais [] em que a concentração total de acetato é, em particular, de 10 mM, de preferência, 5 mM, particularmente 4 mM, entre outros como apresentado alhures aqui.

Tamponadores de acetato a pH 5,0 são mais resistentes a alteração do pH após adição de ácido do que após adição de base, como
15 discutido acima. Em um padrão empírico preferido de capacidade tamponadora, a capacidade tamponadora de um tampão de acetato padrão, como estes é definido como: (i) a inclinação da linha de regressão de menos quadrados calculada para dados de titulação de base para o tamponador de pH 5,0 a pH 5,5, e (ii) a curva da linha de regressão de menos quadrados
20 calculada para dados de titulação de ácido para o tamponador de pH 5,0 a pH 4,0. A preparação de tamponadores de acetato padrões e a determinação de suas capacidades tamponadoras são descritas nos Exemplos 1, 2, e 3. Deve-se considerar que é possível usar quase os mesmos métodos para estabelecer e usar padrões de capacidade tamponadora usando-se outros agentes
25 tamponadores vantajosos.

Na medição da capacidade tamponadora de uma composição de proteína de auto-tamponamento de acordo com a invenção, freqüentemente é vantajoso expressar a capacidade tamponadora em termos da concentração de um tamponador padrão no mesmo pH apresentando a mesma capacidade

tamponadora. Quando se usa um padrão que não se encontra no pK_a do agente tamponador, como um tampão de acetato de sódio inicialmente a pH 5,0, de acordo com a invenção a composição de auto-tamponamento é definida como apresentando uma capacidade tamponadora igual ou maior do que aquela do padrão, se sua capacidade tamponadora após titulação de base ou sua capacidade tamponadora após titulação de ácido (ou ambos) for igual ou exceder a capacidade tamponadora correspondente do padrão.

Deve-se considerar adicionalmente que o pH de composições de proteína auto-tamponadoras de acordo com a invenção geralmente não será no pK_a da proteína de auto-tamponamento, ou qualquer substituinte ácido-base ali. Efetivamente, proteínas são polipróticas e, como discutido aqui, freqüentemente apresentarão vários substituintes, sendo que cada uma com um pK_a um tanto diferente que contribui para sua capacidade tamponadora numa dada faixa de pH. Assim, a capacidade tamponadora de formulações de proteína auto-tamponadoras de acordo com a invenção é determinada, de preferência, empiricamente por meio de titulação de ácido e titulação de base numa dada faixa de alteração de pH relativamente ao pH desejado da composição. Em concretizações preferidas com relação a isto, a capacidade tamponadora é determinada por meio de titulação com ácido e, separadamente, com base numa faixa de respectivamente + e - 1 unidade de pH relativamente ao pH inicial da formulação. Em concretizações particularmente preferidas, os dados de titulação são coletados para uma alteração de pH de mais ou menos 0,5 unidades de pH. Como descrito nos Exemplos, a capacidade tamponadora é a inclinação da linha de regressão de menos quadrados para os dados para pH como uma função de equivalentes de ácido ou base adicionados à composição na faixa de titulação.

a. Medições empíricas e padrões de capacidade tamponadora

Em determinadas concretizações da invenção, a medida da capacidade tamponadora é um padrão empírico. Entre padrões empíricos

preferidos com relação a isto são um volume particular de uma solução aquosa a uma temperatura particular e um pH particular, contendo um agente de tamponamento particular a uma concentração particular e nenhum outro componente além de água, ou um ou mais outros componentes particulares, cada um numa concentração particular.

Um padrão específico particularmente preferido para determinar a capacidade tamponadora de acordo com vários aspectos e concretizações preferidas da invenção é de 10 mM de acetato de sódio pH 5,00 em água pura livre de outros constituintes a 21°C em equilíbrio com ar ambiente a 1 atmosfera, como descrito no Exemplos 1 e 2, de preferência, expresso em equivalentes por volume unitário por unidade de pH, como $\mu\text{Eq/ml-pH}$. A capacidade tamponadora do padrão deveria ser medida empiricamente como descrito no Exemplos 1, 2, e 3, e como discutido adicionalmente alhures aqui.

Um padrão específico particularmente preferido para determinação da capacidade tamponadora de acordo com vários aspectos e concretizações preferidas da invenção é de 10 mM de acetato de sódio pH 4,76 em água pura livre de outros constituintes a 21°C em equilíbrio, com ar ambiente a 1 atmosfera, como descrito no Exemplos 1 e 2, de preferência, expresso em equivalentes por volume unitário por unidade de pH, como $\mu\text{Eq/ml-pH}$. A capacidade tamponadora do padrão poderia ser medida empiricamente como descrito no Exemplos 1, 2, e 3, e como discutido adicionalmente alhures aqui. De acordo com a equação de Henderson-Hasselbalch, como indicado acima, a capacidade tamponadora calculada deste padrão na faixa de pH 4,76 mais ou menos 1 unidade de pH é de 4,09 microequivalentes por mililitro por unidade de pH ($4,09 \mu\text{Eq/ml-pH}$).

Uma variedade de outros tamponadores encontra-se disponível para uso como padrões em outras faixas de pH de acordo com vários aspectos e concretizações preferidas da invenção com relação a isto. Tamponadores de

referência são particularmente preferidos com relação a isto, como aqueles bem conhecidos e rotineiramente empregados para determinações da química analítica. Uma variedade de referidos agentes tamponadores é apresentada em livros de referência da química analítica e em monografias sobre a determinação precisa de pH e da capacidade tamponadora.

Com relação a isto, também são úteis na invenção tamponadores biológicos, como aqueles descritos, entre outros textos, em: TEITZ TEXTBOOK OF CLINICAL CHEMISTRY, 3ª ed., Burtis and Ashwood, eds., W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA (1999), em particular nas Tabelas de 50-13 a 50-16, que são incorporadas aqui integralmente por referência, no que se refere a agentes tamponadores e tamponadores e seu uso como padrões de pH e/ou de capacidade tamponadora de acordo com a invenção com relação a isto; THE TOOLS OF BIOCHEMISTRY, Terrance G. Cooper, John Wiley & Sons, New York, NY (1977), em particular Capítulo 1, páginas de 1 a 35, que é incorporado aqui integralmente por referência no que se refere a agentes tamponadores e tamponadores e seu uso como padrões de pH e de capacidade tamponadora de acordo com a invenção com relação a isto, mais particularmente no que se refere às Tabelas 1-3, 1-4, e 1-5 e texto relativo às mesmas, e PROTEIN PURIFICATION PRINCIPLES AND PRACTICE, 3ª Ed., Robert K. Scopes, Springer-Verlag, New York, NY (1994), em particular páginas de 160 a 164, particularmente nas Tabelas 6,4 e 6,5 e texto relativo às mesmas, capítulo 12, seção 3, páginas de 324 a 333, particularmente nas Tabelas 12-4 e 12-5 e texto relativo às mesmas, e todo o Apêndice C: Tamponadores para uso na Química de proteínas, que são incorporados aqui integralmente por referência no que se refere a agentes tamponadores e tamponadores e seu uso de acordo com a invenção com relação a isto.

Como alguns gases dissolvidos em água reagem com OH^- e/ou H_3O^+ , contudo, a capacidade tamponadora determinada empiricamente da

solução padrão pode variar um tanto do valor teórico. Portanto, a definição do padrão requer que a solução esteja em equilíbrio com a atmosfera a uma pressão de 1 atmosfera. Adicionalmente, o padrão de tamponador precisa ser conservado e contactado apenas com materiais que não alteram seus componentes ou sua capacidade tamponadora, como aqueles que lixiviam ácidos, bases, ou outros reagentes que podem alterar a concentração efetiva ou atividade do tampão de acetato de qualquer maneira que poderia alterar sua capacidade tamponadora. Considerando ambos previamente indicados, equilíbrio atmosférico e inércia do recipiente, a capacidade tamponadora do padrão se equipará diretamente e linearmente com seu volume. Assim, a capacidade tamponadora de 100 ml será de 1/10 daquela de 1,00 litro, e a capacidade tamponadora de 10 ml será de 1/100 daquela de 1,00 litro. Assim, o volume do padrão pode ser ajustado para maior conveniência e, depois, normalizado de volta a 1 litro, conforme desejado.

Pode nem sempre ser conveniente tornar o padrão precedente de capacidade tamponadora de 10 mM apto para uso em campo. No entanto, é possível preparar uma variedade de outros padrões de capacidades tamponadoras, e usá-los da mesma maneira que o tampão de acetato, usando-se uma variedade de outros agentes tamponadores. Desde que apenas os padrões de tamponamento sejam preparados adequadamente, eles podem ser calibrados contra o padrão de tamponamento de acetato descrito acima e, depois, usado no campo. Os resultados obtidos com referidos padrões alternativos podem então ser expressos em termos do padrão de acetato precedente sem erro ou distorção substancial.

A capacidade tamponadora de referidos padrões alternativos também pode ser calibrada por meio de cálculo. Para tal fim, a capacidade tamponadora do padrão alternativo é determinada diretamente e expressa em mEq por volume unitário por unidade de pH. Determinações baseadas no padrão alternativo podem então ser normalizadas ao padrão de acetato

usando-se a relação entre as capacidades de tamponamento expressas em mEq por volume unitário por unidade de pH da alternativa e dos padrões de acetato.

Usando-se referidos métodos, que são comumente empregados na metrologia para relacionar padrões de campo de volta a um padrão de referência, o padrão de tampão de acetato descrito acima proporciona uma referência portátil, escalável, confiável, e precisa para determinar a capacidade tamponadora de qualquer composição que pode ser facilmente preparada com medidas disparatas realizadas em outras composições usando-se métodos similares.

b. Preparação de padrões de capacidade tamponadora

Padrões de capacidade tamponadora podem ser preparados usando-se métodos bem estabelecidos da química analítica. Ver por exemplo, ANALYTICAL CHEMISTRY, 3ª Ed., Douglas A. Skoog e Donald M. West, Holt, Rinehart and Winston, New York (1979), particularmente o capítulo 9 (páginas de 186 a 226), capítulo 10 (páginas de 227 a 233), e métodos descritos nas páginas de 583 a 588; TEITZ TEXTBOOK OF CLINICAL CHEMISTRY, 3ª Ed., Burtis and Ashwood, eds., W.B. Saunders Company, Philadelphia, PA (1999), em particular o Capítulo 1 relativo a técnicas gerais de laboratório para a preparação e calibração de tamponadores e Tabelas de 50-13 a 50-16; THE TOOLS OF BIOCHEMISTRY, Terrance G. Cooper, John Wiley & Sons, New York, NY (1977), em particular o Capítulo 1, páginas de 1 a 35, e Tabelas 1-3, 1-4, e 1-5 e texto relativo às mesmas; PROTEIN PURIFICATION PRINCIPLES AND PRACTICE, 3ª Ed., Robert K. Scopes, Springer- Verlag, New York, NY (1994), em particular páginas de 160 a 164, particularmente nas Tabelas 6,4 e 6,5 e texto relativo às mesmas, Capítulo 12, seção 3, páginas de 324 a 333, particularmente nas Tabelas 12-4 e 12-5 e texto relativo às mesmas, e todas do Apêndice C: Tamponadores para Uso na Química de Proteínas; e REMINGTON: THE SCIENCE AND

PRACTICE OF PHARMACY, 21^a ed., Beringer *et al.* Editores, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2005), particularmente em partes relativas a agentes tamponadores, tamponadores, capacidade tamponadora e análogos; cada um dos quais é incorporado aqui integralmente por referência
5 quanto à preparação e uso de tamponadores e padrões de capacidade tamponadora de acordo com a invenção com relação a isto.

A água usada para preparar padrões de capacidade tamponadora deveriam ser altamente purificados, de preferência, água de tipo 1, como água milliQ, ou água triplamente destilada. Os reagentes de
10 tamponador deveriam ser puros e, em particular, livres de qualquer substância que possa alterar o pH ou a capacidade tamponadora da solução padrão, como reagentes de classe de referência e reagentes de classe reagente ACS vantajosos para uso em análises químicas analíticas exigentes, como descrito nas referências precedentes, TEITZ e REMINGTON, indicadas acima em
15 particular, que são incorporadas aqui integralmente por referência, particularmente em partes pertinentes a reagentes e água de classe analítica.

As composições exatas dos reagentes de tamponador precisam ser bem estabelecidas. O peso molecular dos reagentes de tamponador precisa ser conhecido precisamente para cada reagente de tamponador. Os
20 pesos moleculares precisam ser para o reagente exato que será usado, e precisam incluir o peso de produtos de adição química, como hidratos que estão presentes no reagente. O número efetivo de doadores de hidrogênio ou receptores de hidrogênio por molécula precisam ser conhecidos precisamente para cada reagente de tamponador. A distribuição proporcional de formas
25 diferentes, como hidratos, precisa ser conhecida para cada reagente que contém uma mistura de referidas formas. Concentrações de reagentes de tamponadores líquidos precisam ser conhecidas exatamente, de preferência, em moles/volume e em moles/massa (p. ex., moles/litro e moles/g ou kg. Agentes higroscópicos precisam ser secados para remover umidade de tal

forma que o reagente pode ser pesado precisamente.

De uma maneira geral, a informação proporcionada por vendedores bem estabelecidos de reagentes e químicos de classe reagente é suficientemente precisa para a preparação de padrões de capacidade tamponadora como descrito acima, e é possível usar técnicas convencionais bem conhecidas empregadas rotineiramente na química analítica para secar "reagentes higroscópicos" de forma que possam ser pesados precisamente.

Como descrito aqui, é possível empregar métodos da química analítica bem estabelecidos e empregados rotineiramente para preparar e calibrar soluções de base e ácido, como HCl 1 N e NaOH 1 N (apenas para nomear dois) para titulação de soluções de capacidade tamponadora padrão, e também soluções de proteína de amostra, para determinar a capacidade tamponadora. Deve-se observar que a preparação de soluções de NaOH para titulação deveria ser realizada para eliminar imprecisões que surgem da interação de determinados gases dissolvidos com soluções básicas, e os efeitos alteradores de pH de sua solvatação. Ver, por exemplo, Skoog and West (1979) e outras referências indicadas acima com relação à preparação e calibração de tamponadores e padrões de tamponador, que são incorporados aqui integralmente por referência particularmente em partes pertinentes à preparação de soluções padrão para titulação, como discutido acima.

c. Medição empírica da capacidade tamponadora

Titulação de padrões e amostras para determinar a capacidade tamponadora podem ser realizados com o uso de métodos rotineiros bem conhecidos. Titulações podem ser realizada manualmente. Elas também podem ser realizadas usando-se um auto-titulador. Uma grande variedade de auto-tituladores que são vantajosos para uso na invenção com relação a isto encontra-se comercialmente obténível de numerosos vendedores. Métodos vantajosos para uso na invenção com relação a isto são os mesmos descritos nas referências indicadas acima relativamente à preparação e calibração de

padrões de tamponador, sendo que cada um destes é incorporado aqui integralmente por referência, particularmente em partes pertinentes à titulação de soluções conhecidas e desconhecidas para determinar sua capacidade tamponadora.

5 2. Tamponamento com proteínas e capacidade tamponadora da proteína

a. Determinação dos equilíbrios de hidrogênio da proteína e capacidade tamponadora

Proteínas contém invariavelmente muitos constituintes ácidos e básicos. Como um resultado, o equilíbrio dos íons de hidrogênio de proteínas é altamente complexo, na verdade, uma descrição completa dos equilíbrios de íons de hidrogênio de uma proteína em um dado ambiente encontra-se além do alcance de métodos teóricos e computacionais correntes. Medições empíricas de capacidades tamponadoras da proteína são, portanto, preferidas. Métodos desenvolvidos para a medição empírica precisa dos equilíbrios de hidrogênio da proteína, que podem ser, e são, rotineiramente empregados por aqueles versados na técnica, são bem adequados para a medição das propriedades de tamponamento de proteínas pertinentes ao desenvolvimento de formulações de proteína auto-tamponadoras de acordo com a invenção. Assim, as curvas de titulação do pH de proteínas podem ser determinadas de acordo com a invenção por meio de métodos bem conhecidos, como aqueles descritos e exemplificado por estudos de titulação de pH de Tanford e colaboradores sobre a ribonuclease. Ver C. Tanford, "Hydrogen Ion Titration Curves of Proteins", em T. Shedlovsky (ed.), ELECTROCHEMISTRY IN BIOLOGY AND MEDICINE, John Wiley e Sons, New York, 1955, capítulo 13; C. Tanford e J.D. Hauenstein, *J. Am. Chem. Soc.* 78, 5287 (1956), C. Tanford, PHYSICAL CHEMISTRY OF MACROMOLECULES, John Wiley e Sons, New York, 1961, particularmente páginas de 554 a 567, todas incorporadas aqui por referência particularmente em partes pertinentes à titulação de íons de hidrogênio de

proteínas e para a determinação da ação de tamponamento e capacidade tamponadora de proteínas.

No entanto, a presente invenção não requer determinações tão precisas quanto aquelas descritas nas referências precedentes. Ao invés, as
5 propriedades de tamponamento e capacidade tamponadora de proteínas de acordo com a invenção podem ser determinadas usando-se os métodos descritos em referências padrão da química analítica e bioquímica, como, por exemplo, Skoog (1979), Cooper (1977), e Scopes (1994), indicado acima, cada uma incorporada aqui integralmente por referência, particularmente no
10 que se refere à determinação empírica de curvas de titulação, particularmente de proteínas numa dada faixa de pH de acordo com a invenção.

A determinação de curvas de titulação e capacidade tamponadora de acordo com a invenção é descrita de maneira detalhada para numerosos tamponadores de acetato e uma variedade de proteínas
15 farmacêuticas nos Exemplos abaixo. Assim, as curvas de titulação de pH de proteínas podem ser determinadas empiricamente de acordo com métodos como aqueles descritos nas referências precedentes sobre faixas limitadas particulares de pH que são interessantes para uma dada formulação. Em muitos casos estes métodos são iguais àqueles usados na química analítica
20 para a titulação de moléculas pequenas, como tamponadores de acetato (como ilustrado nos Exemplos). No entanto, é preciso tomar um cuidado maior no manuseio de proteínas para manter a conformação e função requerida para formulação efetiva.

Titulações de proteínas podem ser realizadas manualmente ou
25 usando-se tituladores automatizados. Equipamento para titulação manual e tituladores automatizados são facilmente obteníveis junto a um grande número de fornecedores e vendedores. Métodos vantajosos para a determinação das curvas de titulação de pH e capacidade tamponadora de proteínas são exemplificados nos Exemplos com referência à titulação de

padrões de tampão de acetato e à titulação de várias proteínas terapêuticas diferentes em faixas definidas de pH. Estes métodos podem ser empregados para se determinar o comportamento de ionização de hidrogênio e a capacidade tamponadora de qualquer outra proteína de acordo com a invenção.

Constitui um aspecto particular da invenção determinar a capacidade tamponadora de proteínas como uma função da concentração em solução. Em um método preferido com relação a isto, prepara-se soluções de uma dada proteína em uma série de concentrações graduadas. Determina-se uma curva de titulação de pH para a proteína a cada concentração na faixa de pH de interesse. De preferência, determina-se curvas de titulação para a faixa de interesse usando-se tanto titulação de base como também titulação de ácido. Em determinadas concretizações preferidas, os dados são plotados em um gráfico de equivalentes de ácido ou base adicionados versus o pH medido de cada solução. Tipicamente, para faixas de cerca de 0,5 a 1,0 unidade de pH, os dados de titulação para cada concentração ajustam-se estreitamente numa linha reta, de preferência, determinada por meio de uma análise de regressão de menos quadrados. Em concretizações preferidas com relação a isto, a capacidade tamponadora para a proteína a cada concentração é comparada à inclinação da linha de regressão, expressa em unidades de equivalentes por ml por unidade de pH (ou frações dos mesmos). Na invenção, com relação a isto, também é útil a relação entre a capacidade tamponadora da proteína e sua concentração. Em determinadas concretizações preferidas, esta relação é determinada por meio de análise de regressão de menos quadrados do melhor ajuste de linha reta de dados de capacidade tamponadora determinados de acordo com o gráfico precedente em um gráfico da capacidade tamponadora versus concentração de proteína.

Dados empíricos sobre a capacidade tamponadora de proteínas de acordo com a invenção são relacionados, de preferência, com a capacidade

tamponadora de um tampão de acetato padrão. Ou seja, em concretizações particularmente preferidas da invenção com relação a isto, uma capacidade tamponadora de uma dada proteína a uma dada concentração em uma dada formulação, determinada como acima, é comparada à concentração de um tampão de acetato padrão apresentando a mesma capacidade tamponadora.

Embora determinações empíricas como descritas aqui sejam geralmente um aspecto crucial da formulação de composições de auto-tamponamento de acordo com vários aspectos e concretizações preferidas da invenção, também é possível empregar produtivamente métodos teóricos e computacionais para orientar o projeto, fabricação, e uso de referidas composições (em conjunto com determinações empíricas), como descrito abaixo.

b. Predição dos equilíbrios de íons de hidrogênio da proteína e capacidade tamponadora

A ionização de hidrogênio em proteínas é complexa mas pode ser degradada, em termos gerais, em faixas de pH definidas pelos hidrogênios ionizáveis de cadeias laterais de aminoácidos, e os grupos carboxila e amino terminais. A pK_a de carboxilas terminais em polipeptídeos compreende tipicamente em torno de 3,1. A pK_a dos hidrogênios ácidos nas cadeias laterais de ácido aspártico e ácido glutâmico varia em torno de 4,4. A pK_a de histidina em polipeptídeos varia em torno de 6,0. A pK_a de ionização do hidrogênio no grupo amino terminal varia tipicamente em torno de 7,5. A sulfidrila na cisteína tem uma faixa de pK_a em torno de 8,5. A tirosina hidroxila e a lisina amida apresentam pK_a s em torno de 10. A pK_a da arginina abrangem em torno de 12.

A dobragem conformacional separa tipicamente grandes peptídios e proteínas, em solventes polares, em regiões expostas acessíveis a solvente e regiões de núcleo mais ou menos não-polares que apresentam pouco ou nenhum contato com o ambiente circundante. A dobragem produz

muitos ambientes entre estes dois extremos. Adicionalmente, o microambiente em torno de uma dada cadeia de aminoácidos em uma proteína é afetado tipicamente por um ou mais dentre: efeitos de solvente; ligação de íons; quelação; complexação; associação com co-fatores; e modificações pós-tradução; apenas para nomear algumas possibilidades. Cada um destes pode influenciar a pK_a de uma dada ionização de aminoácidos em uma proteína. Assim, as pK_a s para radicais específicos em uma dada proteína podem variar drasticamente daquela de um aminoácido livre.

Efetivamente, a perturbação de pK_a s por micro-ameientes de aminoácidos em proteínas tem sido usada para estudar a dobragem de proteínas e a disposição e estado de carga de aminoácidos específicos em proteínas dobradas. As curvas de titulação de proteína reportadas por Tanford e outros são complexas, com algumas poucas características amplas em comum. Tipicamente, apenas alguns dos prótons ionizáveis contribuem para as curvas de titulação. Outros encontram-se localizados aparentemente no núcleo e são inacessíveis ao solvente. Em alguns casos, as pK_a s de cadeias laterais individuais, do mesmo tipo que pode ser detectado, podem ser diferenciadas umas das outras. No entanto, embora detectavelmente diferentes, suas pK_a s são geralmente próximas daquelas do aminoácido livre.

A ação de tamponamento mais forte de proteínas não ocorre geralmente no ponto isoelétrico, como erroneamente se supunha. Efetivamente, o tamponamento depende dos hidrogênios da cadeia lateral de aminoácidos e dos hidrogênios laterais, e, portanto, ocorre em faixas que compreendem as pK_a s dos hidrogênios ionizáveis nos aminoácidos livres, como discutido acima. O mais importante dentre estes, para a formulação de composições de proteínas, particularmente determinadas proteínas farmacêuticas que são mais solúveis e/ou mais estáveis, entre outras coisas, a pH fracamente ácido (pH de 4 a 6), é a ação de tamponamento que ocorre na faixa das pK_a s do hidrogênio carboxila dos aminoácidos ácido aspártico e

ácido glutâmico; ou seja, pH de 4,0 a 5,5, particularmente em torno de 4,5.

Há uma variedade de maneiras com que se pode estimar a capacidade tamponadora de uma dada proteína em uma dada solução a um dado pH. Métodos compreendem desde modelos de computador altamente complexos e técnicos até aqueles que podem ser realizados numa calculadora de mão. Nenhum destes métodos é completo ou inteiramente preciso; porém, em alguns casos, eles podem proporcionar estimativas úteis.

Por exemplo, uma idéia potencialmente útil da capacidade tamponadora pode ser calculada, em alguns casos, para uma proteína em uma solução com base em sua composição de aminoácidos, nas pK_a s (no solvente em questão) dos grupos carbóxi e amina terminais, e nos receptores e doadores de hidrogênio das cadeias laterais de aminoácidos, na concentração da proteína, e no pH da solução.

Por exemplo, uma estimativa potencialmente útil da capacidade tamponadora de uma proteína a um pH na faixa das pK_a do hidrogênio carboxila da cadeia lateral de ácido glutâmico (como um aminoácido livre), pode ser obtida a partir do peso molecular da proteína e do número de radicais de ácido glutâmico que contém. Dividindo-se o primeiro pelo último obtém-se o peso por equivalente de ácido glutâmico e, portanto, o peso por equivalente de hidrogênio ionizável na pK_a de ácido glutâmico. Como grupos carboxila de cadeia lateral de ácido glutâmico e ácido aspártico têm quase as mesmas pK_a s, resultados de tais cálculos para os dois deveriam ser adicionados entre si para proporcionar uma estimativa da capacidade tamponadora numa faixa em torno de suas pK_a s. A capacidade tamponadora estimada de uma solução da proteína à pK_a pode ser calculada a partir da concentração de proteína na solução e o fator intrínseco há pouco proporcionado, nominalmente peso por equivalente de hidrogênio ionizável. Dividindo-se a concentração em peso por equivalentes obtém-se uma estimativa para a capacidade tamponadora em unidades de Eq/volume.

Freqüentemente, referidas estimativas serão altas demais, porque alguns radicais são usualmente seqüestrados em regiões da proteína não acessíveis ao solvente, e, portanto, não contribuem para sua efetiva capacidade tamponadora. Em determinados casos, pode ser possível atribuir o efeito de seqüestro na capacidade tamponadora. Por exemplo, um coeficiente fracional que reflete estimativas teóricas ou empíricas de seqüestro pode ser aplicado para ajustar o cálculo original.

Tais cálculos serão geralmente de utilidade menor e também menos precisos do que determinações empíricas de capacidade tamponadora da proteína, de acordo com os métodos descritos alhures aqui. Mas eles podem ser úteis para proporcionar estimativas máximas brutas da capacidade tamponadora de proteínas em solução.

3. Proteínas

A invenção aqui divulgada pode ser praticada com qualquer proteína que proporciona suficiente capacidade tamponadora numa desejada faixa de pH dentro dos parâmetros de concentração de proteína e análogos requeridos para uma desejada formulação. Entre as proteínas preferidas com relação a isto estão proteínas farmacêuticas para uso terapêutico veterinário e/ou humano, particularmente proteínas para uso terapêutico humano. Também conta-se entre as proteínas preferidas, proteínas que são solúveis em soluções aquosas, particularmente aquelas que são solúveis em concentrações relativamente elevadas e aquelas que são estáveis durante períodos prolongados. Adicionalmente, entre proteínas preferidas encontram-se aquelas que apresentam um número relativamente alto de aminoácidos acessíveis por solvente com constantes de ionização de hidrogênio de cadeia lateral próximas do pH da ação de tamponamento desejada.

Adicionalmente, entre proteínas preferidas da invenção encontram-se proteínas para formulações farmacêuticas que não induzem uma resposta antigênica altamente prejudicial após administração a um indivíduo.

Com relação a isto prefere-se proteínas para uso veterinário e/ou médico humano, particularmente com relação a este último, proteínas humanizadas e humanas.

Outras proteínas preferidas adicionais da invenção são

5 proteínas que se ligam seletivamente a alvos específicos, incluindo proteínas de ligação de ligantes e ligantes de proteína. Proteínas de ligação de antígeno, proteínas derivadas dos mesmos, e proteínas relacionadas com os mesmos estão entre as concretizações particularmente preferidas da invenção com

10 relação a isto. Proteínas altamente preferidas da invenção, com relação a isto, são anticorpos e proteínas derivadas de anticorpos ou incorporando anticorpos, ao todo ou em parte, incluindo, apenas para nomear algumas entidades: anticorpos monoclonais, anticorpos policlonais, anticorpos manipulados geneticamente, anticorpos híbridos, anticorpos bi-específicos, anticorpos de cadeia simples, anticorpos geneticamente alterados, incluindo

15 anticorpos com uma ou mais substituições, adições, e/ou deleções de aminoácidos (muteínas de anticorpos), anticorpos quiméricos, derivados de anticorpos, fragmentos de anticorpos, que podem se de qualquer um dos precedentes e também podem ser manipulados de maneira similar ou derivados modificados dos mesmos, proteínas de fusão compreendendo um

20 anticorpo ou uma porção derivada de um anticorpo ou de um fragmento de anticorpo, que pode ser qualquer um dos precedentes ou uma modificação ou derivado dos mesmos, conjugados compreendendo um anticorpo ou uma porção derivada de um anticorpo, incluindo qualquer um dos precedentes, ou modificações ou derivados dos mesmos, e anticorpos quimicamente

25 modificados, fragmentos de anticorpos, proteínas de fusão de anticorpo, e análogos, incluindo todos os precedentes.

a. Anticorpos, proteínas derivadas de anticorpo, e proteínas relacionadas com anticorpo e análogos

Entre proteínas particularmente preferidas de acordo com a

invenção estão polipeptídeos de anticorpos, como polipeptídeos de cadeia pesada e de cadeia leve que apresentam a mesma seqüência de aminoácidos que aqueles que ocorrem em, e que compõem anticorpos naturalmente ocorrentes, como aqueles que ocorre em soros e antissoros, incluindo

5 polipeptídeos e proteínas isoladas de fontes naturais, e também aqueles que são constituídos por meio de tecnologias de hibridoma, por meio de ativação de um gene endógeno (por meio de recombinação homóloga ou não-homóloga, por exemplo), por meio de expressão de um gene exógeno sob o controle de uma região de controle de transcrição exógena, por meio de

10 expressão de uma construção de expressão exógena, por meio de semi-síntese e por meio de síntese *de novo*, para nomear algumas técnicas comumente empregadas na preparação de anticorpos e polipeptídeos relacionados com anticorpos e proteínas que podem ser usadas para produzir polipeptídeos de anticorpos e proteínas de acordo com a invenção.

15 Inclui-se entre estas proteínas e polipeptídeos relacionados com anticorpos aquelas que apresentam, integralmente ou em parte, uma seqüência de aminoácidos *de novo*, aquelas que compreendem todo um anticorpo ou uma ou mais partes de um anticorpo (ou seja: uma cadeia contínua de aminoácidos apresentando a mesma seqüência que quaisquer

20 quatro ou mais radicais na seqüência de aminoácidos de um polipeptídeo de anticorpo naturalmente ocorrente), aquelas apresentando uma seqüência de aminoácidos que se equipara de alguma forma aquela de um anticorpo naturalmente ocorrente, mas que difere da mesma de outras formas, aquelas que apresentam as mesmas seqüências de aminoácidos, porém diferentes de

25 uma contra-parte naturalmente ocorrente ou seqüência relacionada com as mesmas, mas que diferem da contraparte em uma ou mais modificações pós-tradução, e aquelas constituídas em parte de qualquer um dos precedentes (em parte ou no todo) fundidas a uma ou mais regiões de polipeptídeos que podem ser de, ou derivadas de, ou relacionadas com, um segundo polipeptídeo de

anticorpo diferente, e podem ser de, ou derivadas de, qualquer outro polipeptídeo ou proteína, quer naturalmente ocorrente, assemelhando-se à mesma, mas diferindo da mesma, apresentando uma seqüência de aminoácidos semi-de novo e/ou uma seqüência de novo, entre outros.

- 5 Referidos híbridos são geralmente referidos aqui como polipeptídeos de fusão e/ou proteínas de fusão.

Adicionalmente, entre proteínas preferidas de acordo com a invenção aqui descritas encontram-se proteínas modificadas de acordo com todas as precedentes. Inclui-se entre referidas proteínas modificadas, proteínas quimicamente modificadas por uma ligação não-covalente, ligação covalente, 10 ou ambas, uma ligação covalente e ligação não-covalente. Também inclui-se todas as precedentes compreendendo adicionalmente uma ou mais modificações pós-tradução que podem ser realizadas por meio de sistemas de modificação celular ou modificações introduzidas *ex vivo* por meio de 15 métodos enzimáticos e/ou métodos químicos, ou introduzidas de outras formas.

Entre proteínas preferidas da invenção com relação a isto encontram-se fragmento(s) Fab, como aqueles produzidos por meio de clivagem de um anticorpo dimérico típico (LH)₂ com determinada protease 20 que deixa a cadeia leve intacta enquanto cliva as cadeias pesadas entre a região variável e a região constante adjacente, "acima" das ligações dissulfeto que conservam as cadeias pesadas juntas. Referida clivagem libera um fragmento Fc compreendendo as porções remanescentes das cadeias pesadas ligadas entre si, e dois fragmentos Fab diméricos, sendo que cada um 25 compreende uma cadeia leve intacta e a região variável da cadeia pesada. Fragmentos Fab também podem ser produzidos por meio de outras técnicas que não requerem isolamento de um anticorpo naturalmente ocorrente e/ou clivagem com uma protease.

Prefere-se também fragmento(s) Fab₂, como aqueles

produzidos de maneira similar a fragmentos Fab usando-se uma protease que cliva "entre ou abaixo" as ligações dissulfeto. Como um resultado, os dois fragmentos Fab são mantidos juntos por ligações dissulfeto e liberados como um único fragmento Fab₂. Fragmentos Fab₂ podem ser produzidos por meio de muitas outras técnicas incluindo aquelas que não requerem isolamento de um anticorpo intacto ou clivagem com uma protease apresentando a especificidade requerida. Adicionalmente, ambos os fragmentos Fab₂ mono- e bi-específicos podem ser preparados agora por meio de várias técnicas de rotina. Também entre proteínas preferidas com relação a isto encontram-se fragmentos Fab₃, que são fragmentos de anticorpos manipulados em que três fragmentos Fab são ligados entre si. Fragmentos Fab₃ podem ser mono-, bi-, ou tri-específicos. Eles podem ser preparados de diversas maneiras bem conhecidas por aqueles com prática nas técnicas perinentes.

Entre outras proteínas preferidas com relação a isto encontram-se fragmento(s) Fc, como aqueles produzidos por meio de clivagem com uma protease da mesma maneira usada para a produção de fragmentos Fab ou fragmentos Fab₂. No entanto, para a produção de fragmentos Fc, os fragmentos diméricos contendo cadeia pesada são isolados ao invés dos fragmentos contendo cadeia leve. Fragmentos Fc que não apresentam sítios de combinação de antígeno, mas que compreendem regiões efetoras que desempenham um papel em processos fisiológicos envolvendo anticorpos. Fragmentos Fc podem ser realizados por meio de várias técnicas que são bem conhecidas e rotineiramente empregadas por aqueles com prática na técnica para tal fim.

Entre outras proteínas preferidas com relação a isto encontram-se fragmentos variáveis de cadeia simples ("scFv(s)"). scFv(s) são proteínas de fusão preparadas conjugando-se as regiões variáveis das cadeias pesada e leve de uma imunoglobulina. As cadeias pesada e leve em um scFv são ligadas tipicamente por um ligante curto de serina, glicina. scFv(s) têm a

mesma especificidade que os anticorpos dos quais foram derivados. Produzidos originalmente através de apresentação de fago, scFv(s) podem ser preparados agora por meio de vários métodos bem conhecidos.

Prefere-se também Bis-scFv(s) que são fusões de dois scFv(s).

- 5 Bis-scFv(s) podem ser mono- ou bi-específicos. Diversos métodos são bem conhecidos e podem ser aplicados na preparação de Bis-scFv(s) de acordo com a invenção.

- 10 Com relação a isto, também se prefere, de acordo com a invenção, minicorpos; diacorpos mono- e bi-específicos; triacorpos mono-, bi-, e tri-específicos; tetracorpos mono-, bi-, tri-, e tetra-específicos; domínios V_HH; domínios V-NAR; domínios V_H; domínios V_L; Igs de camelo; Igs de NARs; e outros.

- 15 Também entre concretizações preferidas de acordo com vários aspectos e concretizações preferidas da invenção com relação a isto e outros aspectos estão proteínas compreendendo uma ou mais regiões de CDR e/ou derivadas de CDR e/ou regiões derivadas de CDR de um anticorpo ou uma ou mais regiões de FR e/ou derivadas de FR e/ou regiões relacionadas com FR de um anticorpo. Com relação a isto CDR significa região determinadora de complementaridade; ou seja, uma região hiper-variável de uma cadeia leve ou
- 20 pesada de um anticorpo, tipicamente com um comprimento de cerca de 9 a 12 aminoácidos que usualmente é uma parte importante de uma porção de ligação específica para antígeno de um anticorpo. Com relação a isto FR significa uma região de estrutura de um anticorpo; ou seja, é uma região com cerca de 15 a 20 aminoácidos que separa CDRs na porção de ligação
- 25 específica para antígeno de um anticorpo. O termos derivado de CDR e relacionado com CDR, e os termos derivado de FR e relacionado com FR têm os mesmos significados que CDR e FR, respectivamente, conforme apresentado no Glossário acima para os termos derivado de anticorpo e relacionado com anticorpo que o termo anticorpo.

Com relação a anticorpos, proteínas derivadas de anticorpo, e proteínas relacionadas com anticorpo de acordo com o precedente e com outros aspectos da invenção aqui descrita, ver, por exemplo, *Protein Engineering: Principles and Practice*, Jeffrey L. Cleland e Chares S. Craik, eds. Wiley-Liss, Inc., New York (1996), particularmente em Kelley, Robert F., "Engineering Therapeutic Antibodies", capítulo 15, pp. de 399 a 434 e Hollinger, P. & Hudson, P., "Engineered antibody fragments and the rise of single domains", *Nature Biotechnology*, setembro de 2005, 1126-1136, cada uma incorporada aqui integralmente por referência particularmente em partes pertinentes à estrutura e manipulação de anticorpos, particularmente anticorpos biofarmacêuticos, e proteínas derivadas de anticorpo e proteínas relacionadas com anticorpo, particularmente proteínas farmacêuticas derivadas de anticorpo e proteínas relacionadas com anticorpo de acordo com a invenção aqui descrita.

No que se refere a tudo que foi exposto previamente, prefere-se particularmente na invenção proteínas humanas, humanizadas, e outras proteínas que não geram uma resposta imunológica significativamente prejudicial quando administradas a um humano. Também se prefere na invenção proteínas de acordo com todas as indicadas previamente que, de maneira análoga, não causam respostas imunológicas significativamente prejudiciais quando administradas a não-humanos.

Entre proteínas mui particularmente preferidas de acordo com a invenção, com relação a isto, estão proteínas de fusão compreendendo anticorpos e/ou proteínas derivadas de anticorpo, polipeptídeos, ou fragmentos ou análogos, incluindo todas aquelas descritas acima. Entre proteínas de fusão da invenção mui particularmente preferidas com relação a isto estão proteínas de fusão compreendendo um anticorpo ou proteína ou fragmento derivado de anticorpo, como aqueles descritos acima e uma porção de ligação de ligante, como aquelas descritas ilustrativamente aqui.

b. Proteínas de ligação de alvo

Também entre proteínas preferidas da invenção, com relação a isto, encontram-se anticorpos e outros tipos de proteínas de ligação de alvo, e proteínas relacionadas com os mesmos ou derivadas dos mesmos, e ligantes de proteína, e proteínas derivadas dos mesmos ou relacionadas com os mesmos. Entre proteínas de ligação de ligante particularmente preferidas, com relação a isto, encontram-se proteínas que ligam proteínas-sinal e proteínas efectoras, e proteínas relacionadas com as mesmas ou derivadas das mesmas.

Entre referidas proteínas de ligação, incluindo anticorpos, incluindo proteínas derivadas dos mesmos e proteínas relacionadas com os mesmos, encontram-se aquelas que se ligam a um ou mais dos seguintes, sozinhos ou em qualquer combinação:

(i) proteínas CD incluindo embora sem limitação CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, e CD34;

(ii) proteínas da família de receptor HER, incluindo, por exemplo, HER2, HER3, HER4, e o receptor de EGF;

(iii) moléculas de adesão de células, por exemplo, LFA-1, MoI, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, e alfa v/beta 3 integrina;

(iv) fatores de crescimento, incluindo embora sem limitação, por exemplo, fator de crescimento endotelial vascular ("VEGF"); hormônio do crescimento, hormônio estimulador da tireóide, hormônio estimulador de folículo, hormônio luteinizador, fator liberador do hormônio do crescimento, hormônio da para-tireóide, substância inibidora de mullerian, proteína inflamatória de macrófagos humanos (MIP-1-alfa), eritopoietina (EPO), fator de crescimento de nervos, como NGF-beta, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fatores de crescimento de fibroblastos, incluindo, por exemplo, aFGF e bFGF, fator de crescimento epidérmico (EGF), fatores de crescimento de transformação (TGF), incluindo, entre outros, TGF-alfa e TGF-beta, incluindo TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, ou

TGF-beta5, fatores de crescimento similares a insulina-I e -II (IGF-I e IGF-II), des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cérebro), e fatores osteoindutivos;

(v) insulinas e proteínas relacionadas com insulina, incluindo embora sem limitação insulina, cadeia A de insulina, cadeia B de insulina, proinsulina, e proteínas de ligação de fator de crescimento similar a insulina;

(vi) proteínas de coagulação e relacionadas com coagulação, como, entre outros, fator VIII, fator de tecido, fator de von Willebrands, proteína C, alfa-1-antitripsina, ativadores de plasminogênio, como uroquinase e ativador de plasminogênio de tecido ("t-PA"), bombazina, trombina, e trombopoietina;

(vii) fatores estimuladores de colônias (CSFs), incluindo os seguintes, entre outros, M-CSF, GM-CSF, e G-CSF;

(viii) outras proteínas do sangue e do soro, incluindo embora sem limitação albumina, IgE, e antígenos de grupo sanguíneo;

(ix) receptores e proteínas associadas com receptores, incluindo, por exemplo, receptor de flk2/fit3, receptor de obesidade (OB), receptores de hormônio do crescimento, e receptores de células T;

(x) fatores neurotróficos, incluindo embora sem limitação, fator neurotrófico derivado de ossos (BDNF) e neurotrofina-3, -4, -5, ou -6 (NT-3, NT-4, KT-S, ou NT-6);

(xi) cadeia A de relaxina, cadeia B de relaxina, e pro-relaxina;

(xii) interferons, incluindo por exemplo, interferon-alfa, -beta, e - gama;

(xiii) interleucinas (ILs), p. ex., de IL-1 a IL-10;

(xiv) antígenos virais, incluindo embora sem limitação, antígeno viral de envelope da AIDS;

(xv) lipoproteínas, calcitonina, glucagon, fator natriurético atrial, tensoativo pulmonar, fator de necrose de tumor-alfa e -beta, encefalinase, RANTES (regulado quando da ativação de células T expressas e

secretadas normalmente), peptídeo associado com gonadotropina de camundongo, Dnase, inibina, e activina;

(xvi) integrina, proteína A ou D, fatores reumatóides, imunotoxinas, proteína morfogenética dos ossos(BMP), superóxido
5 dismutase, proteínas de membrana de superfície, fator acelerador de
degradação (DAF), envelope de AIDS, proteínas de transporte, receptores de
direcionamento (*homing*), adressinas, proteínas reguladoras, imunoadesinas,
anticorpos; e

(xvii) fragmentos biologicamente ativos ou variantes de
10 qualquer um dos precedentes.

No que se refere a tudo que foi exposto previamente, prefere-
se particularmente aqueles que são agentes terapêuticos efetivos,
particularmente aqueles que exercem um efeito terapêutico por meio de
ligação a um alvo, particularmente um alvo entre aqueles listados acima,
15 incluindo alvos derivados dos mesmos, alvos relacionados com os mesmos, e
modificações dos mesmos.

c. Proteínas particulares ilustrativas

Entre proteínas particulares ilustrativas encontram-se
determinadas proteínas de anticorpo e proteínas relacionadas com anticorpos,
20 incluindo peptícorpos, como, por exemplo, aquelas listadas imediatamente
abaixo e alhures aqui:

Anticorpos específicos para OPGL e peptícorpos e análogos
(também referidos como anticorpos específicos para RANKL, peptícorpos e
análogos), incluindo anticorpos específicos para OPGL humanos e totalmente
25 humanizados, particularmente anticorpos monoclonais totalmente
humanizados, incluindo embora sem limitação, os anticorpos descritas na
Publicação Internacional nº WO 03/002713, que é incorporada aqui
integralmente no que se refere a anticorpos específicos para OPGL e proteínas
relacionadas com anticorpo, particularmente aqueles apresentando as
30 seqüências aqui apresentadas, particularmente, embora sem limitação, aquelas

ali indicadas: 9H7; 18B2; 2D8; 2E11; 16E1; e 22B3, incluindo os anticorpos específicos para OPGL apresentando, ou a cadeia leve da SEQ ID NO: 2 como apresentado ali na Figura 2 e/ou a cadeia pesada da SEQ ID NO:4, como apresentado ali na Figura 4, sendo que cada uma é incorporada individualmente e especificamente por referência, integralmente, como divulgado na publicação precedente. Titulações de ácido e base de um anticorpo específico para OPGL ("Ab-hOPGL") nas faixas de pH de 4,5 a 5,0 e de 5,0 a 5,5 encontram-se descritas nos Exemplos abaixo. O cálculo da capacidade tamponadora de Ab-hOPGL nestas faixas de pH também encontra-se descrito nos Exemplos abaixo.

Agentes de ligação de miostatina ou peptícorpos, incluindo peptícorpos específicos para miostatina, particularmente aqueles descritos na Publicação do Pedido dos E.U.A. com número 2004/0181033, que é incorporada aqui integralmente por referência, particularmente em partes pertinentes a peptícorpos específicos para miostatina, incluindo embora sem limitação peptícorpos da família mTN8-19, incluindo aqueles das SEQ ID NOS: 305-351, incluindo TN8-19-1 até TN8-19-40, TN8-19 con1 e TN8-19 con2; peptícorpos da família mL2 das SEQ ID NOS: 357-383; a família mL15 das SEQ ID NOS: 384- 409; a família mL17 das SEQ ID NOS: 410-438; a família mL20 das SEQ ID NOS: 439-446; a família mL21 das SEQ ID NOS: 447-452; a família mL24 das SEQ ID NOS: 453-454; e aquelas das SEQ ID NOS: 615-631, sendo que cada uma é incorporada aqui individualmente e especificamente, por referência, integralmente e totalmente como divulgada na publicação precedente.

Anticorpos específicos para receptor de IL-4, particularmente aqueles que inibem atividades mediadas por meio de ligação de IL-4 e/ou IL-13 ao receptor, incluindo aqueles descritos na Publicação Internacional nº WO 2005/047331 do Pedido Internacional nº PCT/US2004/03742, que é incorporado aqui integralmente por referência particularmente em partes

pertinentes a anticorpos específicos para receptor de IL-4, sendo que, particularmente, referidos anticorpos são como descritos ali, particularmente, e sem limitação, aqueles denominados ali: L1H1; L1H2; L1H3; L1H4; L1H5; L1H6; L1H7; L1H8; L1H9; L1H10; L1H11; L2H1; L2H2; L2H3; L2H4; L2H5; L2H6; L2H7; L2H8; L2H9; L2H10; L2H11; L2H12; L2H13; L2H14; L3H1; L4H1; L5H1; L6H1, sendo que cada uma é incorporada aqui individualmente e especificamente, por referência, integralmente e totalmente como divulgada na publicação precedente. Titulações de ácido e base nas faixas de pH de 4,5 a 5,0 e de 5,0 a 5,5, e o cálculo da capacidade tamponadora nesta faixa de um anticorpo específico para receptor de IL-4 ("Ab-hIL4R") encontram-se descritos nos Exemplos abaixo.

Anticorpos específicos para receptor 1 de interleucina 1 ("IL1-R1"), peptícorpos e proteínas relacionadas e análogos, incluindo, embora sem limitação, aqueles descritos na Publicação de Pedido dos E.U.A. nº US2004/097712A1 que é incorporado aqui integralmente por referência em partes pertinentes a proteínas de ligação específicas para IL1-R1, anticorpos monoclonais em particular, particularmente, sem limitação, aqueles denominados aqui: 15CA, 26F5, 27F2, 24E12, e 10H7, sendo que cada uma é incorporada aqui individualmente e especificamente, por referência, integralmente e totalmente como divulgado na Publicação de Pedido dos E.U.A. previamente indicada.

Anticorpos específicos para Ang2 e peptícorpos e proteínas relacionadas e análogos, incluindo embora sem limitação aqueles descritos na Publicação Internacional nº WO 03/057134 e Publicação de Pedido dos E.U.A. nº US2003/0229023, cada um incorporado aqui integralmente por referência particularmente em partes pertinentes a anticorpos específicos para Ang2 e peptícorpos e análogos, particularmente aqueles de seqüências descritas ali e incluindo embora sem limitação: L1(N); L1(N) WT; L1(N) 1K WT; 2xL1(N); 2xL1(N) WT; Con4 (N), Con4 (N) 1K WT, 2xCon4 (N) 1K;

L1(C); L1(C) 1K; 2xL1 (C); Con4 (C); Con4 (C) 1K; 2xCon4 (C) 1K; Con4-L1 (N); Con4-L1 (C); TN-12-9 (N); C17 (N); TN8-8(N); TN8-14 (N); Con 1 (N), também incluindo anticorpos anti-Ang 2 e formulações, como aqueles descritos na Publicação Internacional nº WO 2003/030833 que é incorporada aqui integralmente por referência com relação aos mesmos, particularmente

5 Ab526; Ab528; Ab531; Ab533; Ab535; Ab536; Ab537; Ab540; Ab543; Ab544; Ab545; Ab546; A551; Ab553; Ab555; Ab558; Ab559; Ab565; AbF1AbFD; AbFE; AbFJ; AbFK; AbG1D4; AbGC1 E8; AbH1 C12; Ab1A1; Ab1F; Ab1KAb1P; e Ab1P, em suas diversas permutações como descrito

10 aqui, sendo que cada uma é incorporada aqui individualmente e especificamente, por referência, integralmente e totalmente como divulgada na publicação precedente.

Anticorpos específicos para NGF, incluindo, em particular, embora sem limitação, aqueles descritos na Publicação de Pedido dos E.U.A. nº US2005/0074821, que é incorporada aqui integralmente por referência particularmente no que se refere a anticorpos específicos para NGF e proteínas relacionadas, com respeito a isto, incluindo em particular, embora sem limitação, os anticorpos específicos para NGF ali designados como 4D4, 4G6, 6H9, 7H2, 14D10 e 14D11, sendo que cada um é incorporado aqui

15 individualmente e especificamente, por referência, integralmente e totalmente como divulgado na publicação precedente.

Anticorpos específicos para CD22 e proteínas relacionadas, como aqueles descritos na US 5.789.554 que é incorporada aqui integralmente por referência quanto aos anticorpos específicos para CD22 e proteínas relacionadas, particularmente anticorpos específicos para CD22 humanos, como embora sem limitação, anticorpos humanizados e totalmente humanos, incluindo embora sem limitação, anticorpos humanizados e totalmente humanos monoclonais, particularmente incluindo embora sem limitação anticorpos de IgG específicos para CD22 humanos, como, por exemplo, um

25

dímero de uma cadeia dissulfeto de hLL2 gama monoclonal de camundongo humano ligada a uma cadeia capa (κ) de hLL2 monoclonal de camundongo humano, incluindo, embora sem limitação, por exemplo, o anticorpo totalmente humanizado específico para CD22 humano em Epratuzumab, número de registro no CAS 501423-23-0. Como ilustrações da invenção, titulações de ácido e base de um anticorpo específico para CD22 ("Ab-hCD22") nas faixas de pH de 4,5 a 5,0 e de 5,0 a 5,5 encontram-se descritas nos Exemplos abaixo. O cálculo da capacidade tamponadora de Ab-hCD22 nestas faixas de pH também é descrita nos Exemplos abaixo.

Anticorpos específicos para receptor de IGF-1 e proteínas relacionadas, como aqueles descritos no Pedido de Patente Internacional nº PCT/US2005/046493, que é incorporado aqui integralmente por referência quanto aos anticorpos específicos para receptor de IGF-1 e proteínas relacionadas, incluindo, embora sem limitação, os anticorpos específicos para IGF-1 ali denominados L1H1, L2H2, L3H3, L4H4, L5H5, L6H6, L7H7, L8H8, L9H9, L10H10, L11H11, L12H12, L13H13, L14H14, L15H15, L16H16, L17H17, L18H18, L19H19, L20H20, L21H21, L22H22, L23H23, L24H24, L25H25, L26H26, L27H27, L28H28, L29H29, L30H30, L31H31, L32H32, L33H33, L34H34, L35H35, L36H36, L37H37, L38H38, L39H39, L40H40, L41H41, L42H42, L43H43, L44H44, L45H45, L46H46, L47H47, L48H48, L49H49, L50H50, L51H51, e L52H52, sendo que cada um é incorporado aqui individualmente e especificamente, por referência, integralmente e totalmente como divulgado no Pedido Internacional precedente.

Anticorpos específicos para proteína 1 relacionada com B-7 ("B 7RP-1"), (B7RP-1 também é referido na literatura como B7H2, ICOSL, B7h, e CD275) particularmente anticorpos de IgG2 monoclonais totalmente humanos específicos para B7RP, particularmente anticorpo monoclonal de IgG2 totalmente humano que se liga a um epítipo no primeiro domínio de

B7RP-1 semelhante a imunoglobulina que se liga a um epítipo no primeiro domínio de B7RP-1 semelhante a imunoglobulina, particularmente aqueles que inibem a interação de B7RP-1 com seu receptor natural, ICOS, em células T ativadas em particular, especialmente com relação ao precedente, aqueles divulgados no Pedido de Patente Provisional dos E.U.A. nº 60/700.265, depositado em 18 de julho de 2005, que é incorporada aqui integralmente por referência quanto a referidos anticorpos e proteínas relacionadas, incluindo, embora sem limitação, anticorpos denominados ali como a seguir: 16H (apresentando seqüências variáveis de cadeia leve e variáveis de cadeia pesada SEQ ID NO: 1 e SEQ ID NO:7 respectivamente ali); 5D (apresentando seqüências variáveis de cadeia leve e variáveis de cadeia pesada SEQ ID NO:2 e SEQ ID NO:9 respectivamente ali); 2H (apresentando seqüências variáveis de cadeia leve e variáveis de cadeia pesada SEQ ID NO:3 e SEQ ID NO: 10 respectivamente ali); 43H (apresentando seqüências variáveis de cadeia leve e variáveis de cadeia pesada SEQ ID NO:6 e SEQ ID NO: 14 respectivamente ali); 41 H (apresentando seqüências variáveis de cadeia leve e variáveis de cadeia pesada SEQ ID NO:5 e SEQ ID NO: 13 respectivamente ali); e 15H (apresentando seqüências variáveis de cadeia leve e variáveis de cadeia pesada SEQ ID NO:4 e SEQ ID NO: 12 respectivamente ali), sendo que cada uma é incorporada aqui individualmente e especificamente, por referência, integralmente e totalmente como divulgado no Pedido Provisional dos E.U.A. precedente. Titulações de ácido e base e determinação da capacidade tamponadora de um anticorpo específico para B7RP-1 ("Ab-hB7RP1") são ilustrados nos Exemplos abaixo.

Anticorpos específicos para IL-15, peptícorpos e proteínas relacionadas, como, em particular, anticorpos monoclonais humanizados, particularmente anticorpos, como aqueles divulgados nas Publicações de Pedidos dos E.U.A. nums.: US2003/0138421; US2003/023586; US2004/0071702, sendo que cada uma das quais é incorporada aqui

integralmente por referência quanto a anticorpos específicos para IL-15 e proteínas relacionadas, incluindo peptícorpos, incluindo particularmente, por exemplo, embora sem limitação, HuMax IL- 15 anticorpos e proteínas relacionadas, como, por exemplo, 146B7.

5 Anticorpos específicos para IFN gama, particularmente anticorpos específicos para IFN gama humano, particularmente anticorpos anti-IFN gama totalmente humanos, como, por exemplo, aqueles descritos na Publicação de Pedido dos E.U.A. nº US2005/0004353, que é incorporada aqui integralmente por referência quanto a anticorpos específicos para IFN gama,
10 particularmente, por exemplo, os anticorpos ali indicados como 1118; 1118*; 1119; 1121; e 1121* sendo que cada um é incorporado aqui individualmente e especificamente, por referência, integralmente e totalmente como divulgado na Publicação de Pedido dos E.U.A. precedente.

 Anticorpos específicos para TALL-1 e outras proteínas de
15 ligação específicas para TALL, como aquelas descritas na Publicação de Pedido dos E.U.A. nº 2003/0195156 que é incorporada aqui integralmente por referência quanto a proteínas de ligação de TALL-1, particularmente as moléculas das Tabelas 4 e 5B, sendo que cada uma é incorporada aqui individualmente e especificamente, por referência, integralmente e totalmente
20 como divulgado na Publicação de Pedido dos E.U.A. precedente.

 Fator de células-tronco (s) ("SCF") e proteínas relacionadas, como aquelas descritas nas Patentes dos E.U.A. com nums. 6.204.363 e 6.207.802, sendo que cada uma é incorporada aqui integralmente por referência no que se refere a fatores de células-tronco e proteínas
25 relacionadas, particularmente, por exemplo, o fator de células-tronco "STEMGEN™".

 Ligantes de Flt3, ("Flt3L") e proteínas relacionadas, como aquelas descritas na Patente dos Estados Unidos nº 6.632.424 que é incorporada aqui por referência no que se refere aos ligantes de Flt3 e

proteínas relacionadas, com respeito a isto.

Receptores de IL-17 e proteínas relacionadas ("IL-17R"), como aquelas descritas na Patente dos Estados Unidos nº 6.072.033 que é incorporada aqui por referência no que se refere a ligantes de Flt3 e proteínas relacionadas, com respeito a isto.

Etanercept, também referido como Embrel, e proteínas relacionadas.

Actimune (Interferon-gama-1b), Activase (Alteplase), Aldurazme (Laronidase), Amevive (Alefacept), Avonex (Interferon beta-1a), BeneFIX (Nonacog alfa), Beromun (Tasonermin), Beatseron (Interferon-beta-1b), BEXXAR (Tositumomab), Tev-Tropin (Somatropin), Bioclote ou RECOMBINATE (Recombinant), CEREZME (Imiglucerase), ENBREL (Etanercept), Eprex (epoetina alfa), EPOGEN/Procit (Epoetin alfa), FABRAZYME (Agalsidase beta), Fasturtec/Elitek ELITEK (Rasburicase), FORTEO (Teriparatide), GENOTROPIN (Somatropin), GlucaGen (Glucagon), Glucagon (Glucagon, de origem de rDNA), GONAL-F (follitropina alfa), KOGENATE FS (Octocog alfa), HERCEPTIN (Trastuzumab), HUMATROPE (SOMATROPIN), HUMIRA (Adalimumab), Insulina em solução, INFERGEN® (Interferon alfacon-1), KINERET® (anakinra), Kogenate FS (fator anti-hemofílico), LEUKIN (SARGRAMOSTIM fator estimulador de colônias de macrófagos-granulócitos humanos recombinantes (rhuGM-CSF)), CAMPATH (Alemtuzumab), RITUXAN® (Rituximab), TNKase (Tenecteplase), MYLOTARG (gemtuzumab ozogamicin), NATRECOR (nesiritida), ARANESP (darbepoetina alfa), NEULASTA (pegfilgrastima), NEUMEGA (oprelvecina), NEUPOGEN (Filgrastima), NORDITROPIN CARTRIDGES (Somatropina), NOVOSEVEN (Eptacog alfa), NUTROPIN AQ (somatropina), Oncaspar (pegaspargase), ONTAK (denileucina difitox), ORTHOCLONE OKT (muromonab-CD3), OVIDREL (coriogonadotropina

alfa), PEGASYS (peginterferon alfa-2a), PROLEUKIN (Aldesleukin), PULMOZYME (dornase alfa), Retavase (Reteplase), REBETRON Terapia de combinação contendo REBETOL® (Ribavirina) e INTRON® A (Interferon alfa-2b), REBIF (interferon beta-1a), REFACTO (Fator anti-hemofílico),
 5 REFLUDAN (lepirudina), REMICADE (infliximab), REOPRO (abciximab), ROFERON®-A (Interferon alfa-2a), SIMULECT (baasiliximab), SOMAVERT (Pegivisomant), SYNAGIS® (palivizumab), Stembeno (Ancestima, Fator de células-tronco), THYROGEN, INTRON® A (Interferon alfa-2b), PEG- INTRON® (Peginterferon alfa-2b), XIGRIS® (Drotrecogina,
 10 alfa ativado), XOLAIR® (Omalizumab), ZENAP AX® (daclizumab), ZEVALIN® (Ibritumomab Tiuxetan).

d. Variação de seqüência

Proteínas particularmente preferias com relação a tudo o que foi indicado previamente e a seguir, incluem aqueles que compreendem uma
 15 região que é 70 % ou mais, particularmente 80 % ou mais, mais particularmente 90 % ou mais, ainda mais particularmente 95 % ou mais, particularmente 97 % ou mais, mais particularmente 98 % ou mais, ainda mais particularmente 99 % ou mais idêntica na seqüência de aminoácidos com relação a uma seqüência de aminoácidos de uma proteína de ligação,
 20 como ilustrado acima, particularmente uma proteína de ligação farmacêutica, como um GenBank ou outra seqüência de referência de uma proteína de referência.

A identidade com relação a isto pode ser determinada usando-se uma variedade de programas de análise de seqüências de aminoácidos bem
 25 conhecidas e facilmente obteníveis. Programas preferidos incluem aqueles que implementam os algoritmos de Smith-Waterman, considerados uma solução satisfatória para o problema de pesquisa e de alinhamento de seqüências. Também é possível empregar outros algoritmos, particularmente onde velocidade é uma consideração importante. Programas comumente

empregados para alinhamento e equiparação de homologia de DNAs, RNAs, e polipeptídeos que podem ser usados com relação a isto incluem FASTA, TFASTA, BLASTN, BLASTP, BLASTX, TBLASTN, PROSRCH, BLAZE, e MPSRCH, sendo que este último é uma implementação do algoritmo de Smith-Waterman para execução em processadores maciçamente paralelos preparados por meio de MasPar.

Os programas BLASTN, BLASTX, e BLASTP encontram-se entre os programas preferidos para referidas determinações, sendo que este último para comparações de seqüências de polinucleotídeos, e os dois últimos para comparações de seqüências de polinucleotídeos, e os dois últimos para comparações de seqüências de polipeptídeos: BLASTX para comparação das seqüências de polipeptídeos de todas as três matrizes de leitura de seqüência de polinucleotídeo e BLASTP para uma única seqüência de polipeptídeos.

BLAST proporciona uma variedade de parâmetros definíveis pelo usuário que são apresentado antes da implementação de uma comparação. Alguns destes são mais facilmente compreensíveis do que outros em interfaces gráficas, como aquelas proporcionadas por NCBI BLAST e outros programas de alinhamento de seqüências que podem ser acessados na internet [n.t.: rede mundial de computadores]. Os ajustes e seus valores são apresentados e explicados nos sítios de serviços da rede mundial de computadores e são explicados e apresentados em detalhes particulares numa variedade de textos facilmente obteníveis incluindo, embora sem limitação, BIOINFORMATICS: SEQUENCE AND GENOME ANALYSIS, 2ª ed., David W. Mount, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (2004), particularmente os capítulos 3, 4, 5, e 6 no que se refere a comparação de seqüências de ácido nucleico e proteínas de uma maneira geral, e quanto a comparações BLAST e pesquisas em particular; SEQUENCE ANALYSIS IN A NUTSHELL: A GUIDE TO COMMON TOOLS AND DATABASES, Scott Markel e Darrila Leon, O'Reilly &

Associates, Sebastopol, Califórnia (2003), particularmente o capítulo 7 no que se refere a BLAST em particular, cada uma incorporada aqui integralmente por referência particularmente em partes pertinentes à comparação de seqüências de polipeptídeos e nucleotídeos e com relação à determinação de seu grau de identidade, similaridade, homologia e/ou análogos, particularmente no que se refere à comparação de uma seqüência de teste e uma seqüência de referência para calcular um grau (percentual) de identidade entre as mesmas.

Em concretizações preferidas da invenção com relação a isto, a afinidade de seqüências é definida como a classificação de identidade em por cento proporcionada por qualquer uma ou outra das buscas de comparação BLAST previamente mencionadas com $e = 10$ e todos os outros parâmetros ajustados em seus valores default no servidor NCBI da rede mundial de computadores como apresentado em SEQUENCE ANALYSIS IN A NUTSHELL: A GUIDE TO COMMON TOOLS AND DATABASES, Scott Markel e Darrila Leon, O'Reilly & Associates, Sebastopol, Califórnia (2003), páginas de 47 a 51 que são incorporados aqui integralmente por referência e em todos os particulares dos ajustes preferidos para parâmetros da presente invenção para comparação de seqüências usando-se BLAST, como aqueles em NCBI BLAST.

As referências a seguir proporcionam informação adicional em comparações de seqüências com relação a isto, e em outras. GUIDE TO HUMAN GENOME COMPUTING, Ed. Martin J. Bishop, Academic Press, Harcourt Brace & Company Publishers, New York (1994), que é incorporada aqui integralmente por referência com relação ao precedente, particularmente em partes pertinentes para determinar a identidade e ou a homologia de seqüências de aminoácidos ou polinucleotídeos, particularmente capítulo 7. Os programas BLAST são descritos em Altschul *et al.*, "Basic Local Alignment Research Tool", JMo/ Biol 215: 403-410 (1990), que é

incorporada aqui integralmente por referência. Informação adicional relativamente a análise de seqüências e determinação de identidade de homologia é proporcionada, entre muitas outras referências bem conhecidas e facilmente obteníveis para aqueles versados na técnica, em: NUCLEIC ACID AND PROTEIN SEQUENCE ANALYSIS: A PRACTICAL APPROACH, Eds. M. J. Bishop e C. J. Rawings, IRL Press, Oxford, UK (1987); PROTEIN STRUCTURE: A PRACTICAL APPROACH, Ed. T. E. Creighton, IRL Press, Oxford, UK (1989); Doolittle, R. F.: "Searching through sequence databases", *MetEnz.* 183: 99-110 (1990); Meyers e Miller: "Optimal alignments in linear space" *Comput. Applica. in Biosci* 4: 11-17 (1988); Needleman e Wunsch: "A general method applicable to the search for similarities in amino acid sequence of two proteins", *J Mol Biol* 48: 443-453 (1970) e Smith e Waterman "Identification of common molecular subsequences", *J Mol Biol* 147: 1950 *et seq.* (1981), sendo que cada uma destas é incorporada aqui integralmente por referência com relação ao precedente, particularmente em partes pertinentes à comparação de seqüências e determinações de identidade e homologia.

Concretizações particularmente preferidas com relação a isto apresentam de 50 % a 150 % da atividade da proteína de referência previamente indicada, concretizações particularmente altas preferidas com relação a isto apresentam de 60 % a 125 % da atividade da proteína de referência, concretizações ainda mais altamente preferidas apresentam de 75 % a 110 % da atividade da proteína de referência, concretizações ainda mais altamente preferidas apresentam de 85 % a 125 % da atividade da referência, concretizações ainda mais altamente preferidas apresentam de 90 % a 110 % da atividade da referência.

4. Formulações

Muitos reagentes e métodos convencionalmente empregados para a formulação de farmacêuticos de proteínas podem ser usados para a

formulação de composições de proteína auto-tamponadoras de acordo com vários aspectos e concretizações preferidas da invenção. No entanto, em formulações de proteína auto-tamponadoras de acordo com a invenção, o tamponamento é proporcionado de forma substancialmente integral pela própria proteína, não por meio de um agente de tamponamento, como é o caso com formulações convencionais. Além disso, formulações de proteína de auto-tamponamento de acordo com vários aspectos e concretizações preferidas da invenção são substancialmente isentas de referidos agentes tamponadores.

No entanto, em muitos outros aspectos, composições de proteína auto-tamponadoras de acordo com vários aspectos e concretizações da invenção podem ser formuladas usando-se reagentes e métodos convencionalmente empregados para a formulação de proteínas, em particular, reagentes e métodos empregados para a formulação de farmacêuticos, incluindo farmacêuticos para uso veterinário e humano, particularmente aqueles reagentes e métodos vantajosos para a formulação de farmacêuticos de proteínas para uso veterinário e particularmente para uso humano.

De acordo com isto, muitos métodos e ingredientes para a formulação e o uso de farmacêuticos que são bem conhecidos e rotineiros nas técnicas pertinentes podem ser usados no projeto, na preparação, e no uso de formulações de proteína auto-tamponadoras de acordo com vários aspectos e concretizações preferidas da invenção relativas a isso. Referidos métodos e ingredientes encontram-se descritos em, para nomear apenas algumas poucas referências facilmente obteníveis com relação a isto, REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 21^a Ed.; Beringer *et al.* editores, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2005); ANSEL'S PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS e DRUG DELIVERY SYSTEMS, 8^a Ed., Allen *et al.*, Editors, Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, PA

(2005); e PHARMACEUTICAL FORMULATION OF PEPTIDES AND PROTEINS, Sven Frokjaer e Lars Hovgaard, Editors, CRC Press, Boca Raton, Florida (2000), sendo que cada uma delas é incorporada integralmente e particularmente em partes pertinentes a ingredientes e métodos convencionais que podem ser usados em formulações auto-tamponadoras de proteínas de acordo com vários aspectos e concretizações preferidas da invenção relativas a isto.

Métodos e ingredientes adicionais que podem ser úteis, com relação a isto, encontram-se divulgados, entre outros, nas US 6.171.586; WO 2005/044854; US 6.288.030; US 6.267.958; WO 2004/055164; US 4.597.966; US 2003/0138417; US 6.252.055; US 5.608.038; US 6.875.432; US 2004/0197324; WO 02/096457; US 5.945.098; US 5.237.054; US 6.485.932; US 6.821.515; US 5.792.838; US 5.654.403; US 5.908.826; EP 0 804 163; e WO 2005/063291, sendo que cada uma destas é incorporada aqui integralmente por referência, particularmente em partes pertinentes a formulações farmacologicamente aceitáveis de proteína de auto-tamponamento de acordo com a invenção.

Vários aspectos específicos dos ingredientes e tipos específicos de formulações encontram-se descritos adicionalmente abaixo, a título de ilustração. A descrição assim proporcionada não é exaustiva com relação aos métodos e composições possíveis para formulações de proteína auto-tamponadoras de acordo com os vários aspectos e concretizações da invenção, tampouco é exclusiva de qualquer forma.

Em concretizações preferidas de uma variedade de aspectos da invenção, formulações de proteínas de auto-tamponamento compreendem uma proteína e um veículo, que também podem ser referidas aqui de maneira variada, conforme o caso, como um ou mais dentre: um veículo, um veículo primário, um diluente, um diluente primário, um veículo primário, um solvente e/ou um solvente primário.

No sentido mais amplo, o veículo pode ser um gás, um líquido, ou um sólido, conforme for vantajoso para a fase da composição e/ou seu(s) uso(s). Em algumas concretizações da invenção com relação a isto, o veículo é um sólido, como um pó em que uma proteína pode ser dispersada. Em
5 concretizações preferidas com relação a isto, o veículo é um líquido, particularmente um líquido em que a proteína de auto-tamponamento é altamente solúvel, particularmente a concentrações que proporcionam a desejada capacidade tamponadora. Veículos líquidos podem ser orgânicos ou não-orgânicos. De preferência, eles são aquosos, da forma mais preferível eles
10 se constituem amplamente ou inteiramente de água pura.

Deve-se considerar que formulações para uso farmacêutico de acordo com vários aspectos e concretizações da invenção precisam ser compatíveis com os processos e condições a que serão submetidas, como, por exemplo, procedimentos de esterilização (geralmente aplicado antes da
15 mistura com um agente ativo), e condições durante o armazenamento.

Quase invariavelmente, formulações de acordo com numerosos aspectos e concretizações da invenção conterão ingredientes adicionais incluindo, embora sem limitação, de qualquer forma, excipientes e outros agentes farmacêuticos. No entanto, deve-se compreender que
20 formulações de acordo com a invenção são formulações auto-tamponadoras em que a capacidade tamponadora é proporcionada substancialmente ou inteiramente pela própria proteína, como descrito alhures aqui.

Formulações de acordo com vários aspectos e concretizações da invenção podem conter, entre outros, excipientes, como descrito abaixo, incluindo, embora sem limitação, ingredientes para modificação, manutenção, ou conservação, por exemplo, osmolalidade, osmolaridade, viscosidade, transparência, cor, tonicidade, odor, esterilidade, estabilidade, taxa de dissolução ou liberação, adsorção ou penetração das formulações e/ou
25 proteína e/ou polipeptídeo primário.

Formulações dependerão evidentemente, por exemplo, da proteína particular que está sendo formulada, dos outros agentes ativos, como outros farmacêuticos, que serão compreendidos na formulação, da via de administração, do método de administração a ser empregado, da dosagem, da frequência de dosagem, e do formato de fornecimento, entre outros.

Formulações de acordo com determinadas concretizações preferidas em vários aspectos da invenção proporcionam composições compreendendo uma proteína, de preferência uma proteína farmacêutica e um solvente, sendo que a proteína apresenta uma capacidade tamponadora por volume unitário de pelo menos aproximadamente 2,0 ou 3,0 ou 4,0 ou 5,0 ou 6,50 ou 8,00 ou 10,0 ou 15,0 ou 20,0 ou 30,0 ou 40,0 ou 50,0 ou 75,0 ou 100 ou 125 ou 150 ou 200 ou 250 ou 300 ou 350 ou 400 ou 500 ou 700 ou 1.000 ou 1.500 ou 2.000 ou 2.500 ou 3.000 ou 4.000 ou 5.000 mM de tampão de acetato de sódio como determinado na faixa de pH 5,0 a 4,0 pH ou 5,0 a 5,5 como descrito no Exemplo 1 ou 2 e alhures aqui.

Formulações de acordo com determinadas concretizações preferidas em vários aspectos da invenção proporcionam composições de proteína auto-tamponadoras, particularmente composições de proteínas farmacêuticas, sendo que, exclusivamente a capacidade da proteína, a capacidade tamponadora por volume unitário da composição é igual ou inferior a 1,0 ou 1,5 ou 2,0 ou 3,0 ou 4,0 ou 5,0 mM de tampão de acetato de sódio como determinado na faixa de pH 5,0 a 4,0 ou pH 5,0 a 5,5 como descrito no Exemplo 1 ou 2 e alhures aqui.

Formulações de acordo com determinadas concretizações preferidas em vários aspectos da invenção proporcionam composições de proteína auto-tamponadoras, particularmente composições de proteínas farmacêuticas, compreendendo uma proteína e um solvente, sendo que no pH da composição a capacidade tamponadora da proteína é de pelo menos aproximadamente: 1,00 ou 1,50 ou 1,63 ou 2,00 ou 3,00 ou 4,00 ou 5,00 ou

6,50 ou 8,00 ou 10,0 ou 15,0 ou 20,0 ou 30,0 ou 40,0 ou 50,0 ou 75,0 ou 100 ou 125 ou 150 ou 200 ou 250 ou 300 ou 350 ou 400 ou 500 ou 700 ou 1.000 ou 1.500 ou 2.000 ou 2.500 ou 3.000 ou 4.000 ou 5.000 mEq por litro e por alteração do pH em uma unidade de pH.

5 Formulações de acordo com determinadas concretizações preferidas em vários aspectos da invenção proporcionam composições de proteína auto-tamponadoras, particularmente composições de proteínas farmacêuticas, compreendendo uma proteína e um solvente, sendo que no pH da composição, exclusive o da proteína, a capacidade tamponadora por
10 volume unitário da composição é igual ou inferior a 0,50 ou 1,00 ou 1,50 ou 2,00 ou 3,00 ou 4,00 ou 5,00 ou 6,50 ou 8,00 ou 10,0 ou 20,0 ou 25,0 mM de tampão de acetato como determinado na faixa de pH de 5,0 a 4,0 ou de pH de 5,0 a 5,5 como descrito no Exemplo 1 ou 2 e alhures aqui.

 Formulações de acordo com determinadas concretizações
15 preferidas em vários aspectos da invenção proporcionam composições de proteína auto-tamponadoras, particularmente composições de proteínas farmacêuticas, compreendendo uma proteína e um solvente, sendo que no pH desejado, a proteína proporciona pelo menos aproximadamente 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, ou 99,5 % da
20 capacidade tamponadora da composição.

 Formulações de acordo com determinadas concretizações preferidas em vários aspectos da invenção proporcionam composições de proteína auto-tamponadoras, particularmente composições de proteínas farmacêuticas, compreendendo uma proteína e um solvente, A, sendo que a
25 concentração da proteína é entre aproximadamente: 20 e 400, ou 20 e 300, ou 20 e 250, ou 20 e 200, ou 20 e 150 mg/ml.

 Formulações de acordo com determinadas concretizações preferidas em vários aspectos da invenção proporcionam composições de proteína auto-tamponadoras, particularmente composições de proteínas

farmacêuticas, compreendendo uma proteína e um solvente, sendo que o pH mantido pela ação tamponadora da proteína é a pH entre aproximadamente: 3,5 e 8,0, ou 4,0 e 6,0, ou 4,0 e 5,5, ou 4,5 e 5,5.

Formulações de acordo com determinadas concretizações preferidas em vários aspectos da invenção proporcionam composições de proteína auto-tamponadoras, particularmente composições de proteínas farmacêuticas, compreendendo uma proteína e um solvente, sendo que a concentração de sal é inferior a: 150 mM ou 125 mM ou 100 mM ou 75 mM ou 50 mM ou 25 mM.

Formulações de acordo com determinadas concretizações preferidas em vários aspectos da invenção proporcionam composições de proteína auto-tamponadoras, particularmente composições de proteínas farmacêuticas, compreendendo uma proteína e um solvente, e compreendendo adicionalmente um ou mais sais farmaceuticamente aceitáveis; agentes de balanço osmótico (agentes de tonicidade); antioxidantes; antibióticos; antimicóticos; agentes volumétricos; lio-protetores; agentes anti-espumantes; agentes quelantes; conservantes; colorantes; analgésicos; ou agentes farmacêuticos adicionais.

Formulações de acordo com determinadas concretizações preferidas em vários aspectos da invenção proporcionam composições de proteína auto-tamponadoras, particularmente composições de proteínas farmacêuticas, compreendendo uma proteína e um solvente, e compreendendo adicionalmente um ou mais polióis farmaceuticamente aceitáveis numa quantidade que é hipotônica, isotônica, ou hipertônica, de preferência, aproximadamente isotônica, de forma particularmente preferível isotônica, de forma particularmente preferível qualquer um ou mais dentre sorbitol, manitol, sucrose, trealose, ou glicerol, de forma particularmente preferível, aproximadamente 5 % de sorbitol, 5 % de manitol, 9 % de sucrose, 9 % de trealose, ou 2,5 % de glicerol, de forma mui particularmente relacionada 5 %

de sorbitol, 5 % de manitol, 9 % de sucrose, 9 % de trealose, ou 2,5 % de glicerol.

5 Formulações de acordo com determinadas concretizações preferidas em vários aspectos da invenção proporcionam composições de proteína auto-tamponadoras, particularmente composições de proteínas farmacêuticas, compreendendo uma proteína e um solvente, e compreendendo adicionalmente um ou mais tensoativos farmaceuticamente aceitáveis, de preferência, um ou mais dentre polissorbato 20, polissorbato 80, outros ésteres de ácido graxo de sorbitano, polietoxilados, e poloxâmero 188, de 10 forma particularmente preferível, polissorbato 20 ou polissorbato 80, de preferência, aproximadamente de 0,001 a 0,1 % de polissorbato 20 ou polissorbato 80, mui preferivelmente de aproximadamente de 0,002 a 0,02 % de polissorbato 20 ou polissorbato 80, particularmente de 0,002 a 0,02 % de polissorbato 20 ou polissorbato 80.

15 Formulações de acordo com determinadas concretizações preferidas em vários aspectos da invenção proporcionam composições de proteína auto-tamponadoras, particularmente composições de proteínas farmacêuticas, compreendendo uma proteína e um solvente, sendo que a proteína é um agente farmacêutico e a composição é uma formulação estéril 20 da mesma vantajosa para tratamento de um indivíduo veterinário ou um indivíduo médico humano.

 Também entre formulações de acordo com vários aspectos e concretizações da invenção aqui descritas encontram-se composições liofilizadas de acordo com o precedente, particularmente composições 25 liofilizadas que, quando reconstituídas, proporcionam uma formulação como descrito acima e alhures aqui.

a. Excipientes e outros ingredientes adicionais

Como discutido acima, determinadas concretizações de acordo com aspectos da invenção proporcionam composições de proteína auto-

tamponadoras, particularmente composições de proteínas farmacêuticas, que compreendem, adicionalmente à proteína, particularmente uma proteína farmacêutica, um ou mais excipientes, como aqueles descritos ilustrativamente nesta seção e alhures aqui. Excipientes podem ser usados na invenção, com relação a isto, numa ampla variedade de fins, como ajuste de propriedades físicas, químicas ou biológicas de formulações, como ajuste de viscosidade, e ou processos da invenção para melhorar a efetividade e ou para estabilizar referidas formulações e processos contra degradação e desperdício devido a, por exemplo, estresses que ocorrem durante a fabricação, transporte, armazenamento, preparação de pré-uso, administração, e em seguida.

Uma variedade de exposições encontra-se disponível em materiais de formulação e estabilização de proteínas, e métodos úteis com relação a isto, como Arakawa *et al.*, "Solvent interactions in pharmaceutical formulations", *Pharm Res.* 8(3): 285-91 (1991); Kendrick *et al.*, "Physical stabilization of proteins in aqueous solution", em: RATIONAL DESIGN OF STABLE PROTEIN FORMULATIONS: THEORY AND PRACTICE, Carpenter e Manning, eds. *Pharmaceutical Biotechnology.* 13: 61-84 (2002), e Randolph *et al.*, "Surfactant-protein interactions", *Pharm Biotechnol.* 13: 159-75 (2002), cada uma incorporada aqui integralmente por referência, particularmente em partes pertinentes a excipientes e processos dos mesmos para formulações de proteína auto-tamponadoras de acordo com a corrente invenção, particularmente no que se refere a produtos e processos farmacêuticos de proteínas e processos para usos médicos humanos e/ou veterinários.

Diversos excipientes úteis na invenção encontram-se listados na Tabela 1 e encontram-se descritos adicionalmente abaixo.

Tabela 1: Tipos de excipientes e suas funções

tipo	Função	
	Líquidos	Liofilizados
Agentes de	Proporciona isotonicidade à formulação	Estabilizantes incluem crio- e lio-

tonicidade Agentes / Estabilizantes	de tal forma que é vantajosa para injeção • Exemplos incluem polióis, sais, e aminoácidos • Auxiliam a manter a proteína em um estado mais compacto (polióis) • Minimizam interações proteína-proteína em solução, eletrostáticas (sais)	protetores • Exemplos incluem polióis, açúcares e polímeros • Crioprotetores protegem proteínas contra estresses de congelamento • Lio-protetores estabilizam proteínas em estado seco com congelamento
Agentes volumétricos	• Não aplicável	• Usados para incrementar a elegância do produto e para prevenir extravasamento • Proporcionam resistência estrutural para a torta de liofilização • Exemplos incluem manitol e glicina
Tensoativos	• Previnem/controlam agregação, formação de partículas e adsorção superficial de droga • Exemplos incluem polissorbato 20 e 80	• Empregados se a agregação durante o processo de liofilização for um problema • Podem servir para reduzir tempos de reconstituição • Exemplos incluem polissorbato 20 e 80
Antioxidantes	• Oxidação de proteína de controle	• Usualmente não são empregados, reações moleculares na torta liofilizada são muito retardadas
Íons metálicos / Agentes quelatinizadores	• Um íon metálico específico é incluído em uma formulação líquida apenas como um co-fator • Cátions divalentes, como zinco e magnésio são usados em formulações de suspensão • Usa-se agentes quelantes para inibir reações catalisadas com íon metálico pesado	• Podem ser incluídos se um íon metálico específico for incluído apenas como um co-fator • Agentes quelantes geralmente não são necessários em formulações liofilizadas
Conservantes	• Particularmente importante para formulações de doses múltiplas • Protege contra crescimento bacteriano, • Exemplo: álcool de benzila	• Apenas para formulações de doses múltiplas • Proporcionam proteção contra crescimento bacteriano na formulação • São incluídos usualmente no diluente de reconstituição (p. ex., bWFI)

i. Sais

É possível usar sais de acordo com determinadas concretizações preferidas da invenção para, por exemplo, ajustar a intensidade iônica e/ou a isotonicidade de uma formulação de auto-tamponamento e/ou para aperfeiçoar a solubilidade e/ou estabilidade física de uma proteína de auto-tamponamento proteína ou outro ingrediente de uma composição de proteína de auto-tamponamento de acordo com a invenção.

Como é de conhecimento geral, íons podem estabilizar o estado nativo de proteínas por meio de ligação a radicais carregados na

superfície da proteína e por meio de blindagem de grupos carregados e polares na proteína e reduzir a intensidade de suas interações eletrostáticas, interações atrativas, e repulsivas. íons também podem estabilizar o estado desnaturado de uma proteína por meio de ligação a, em particular, as ligações peptídicas desnaturadas (-CONH) da proteína. Adicionalmente, a interação iônica com grupos carregados e polares em uma proteína também pode reduzir interações eletrostáticas intermoleculares e, com isso, prevenir ou reduzir agregação de proteínas e a insolubilidade.

Espécies iônicas diferem significativamente quanto a seus efeitos sobre proteínas. Desenvolveu-se uma quantidade de classificações categóricas de íons e seus efeitos sobre proteínas que podem ser usadas na formulação de composições de proteína auto-tamponadoras de acordo com a invenção. Um exemplo é a série Hofmeister, que classifica solutos iônicos e não-iônicos polares de acordo com seu efeito sobre a estabilidade conformacional de proteínas em solução. Solutos estabilizantes são referidos como "cosmotrópicos". Solutos desestabilizantes são referidos como caotrópicos. Cosmotropos são usados comumente em concentrações elevadas (p. ex., sulfato de amônio >1 molar) para precipitar proteínas de solução ("dessalinização"). Caotrópicos são usados comumente para desnaturar e/ou solubilizar proteínas ("salinização"). A efetividade relativa de íons para "salinizar" e "dessalinizar" define sua posição na série Hofmeister.

Adicionalmente a suas utilidades e suas desvantagens (como discutido acima) sais também são efetivos para reduzir a viscosidade de formulações de proteína e podem ser usadas na invenção para aquele objetivo.

Para manter a isotonicidade numa formulação parenteral de acordo com concretizações preferidas da invenção, aperfeiçoar a solubilidade e/ou estabilidade de proteína, aperfeiçoar as características de viscosidade, evitar efeitos de sal prejudiciais sobre a estabilidade e agregação da proteína, e prevenir degradação de proteína mediada com sal, a concentração de sal em

formulações auto-tamponadoras de acordo com várias concretizações preferidas da invenção são inferiores a 150 mM (no que se refere a íons monovalentes) e 150 mEq/litro para íons multivalentes. Com relação a isto, em determinadas concretizações particularmente preferidas da invenção, a

5 concentração de sal total é de cerca de 75 mEq/l a cerca de 140 mEq/l.

ii. Aminoácidos

Aminoácidos livres podem ser usados em formulações de proteína de acordo com várias concretizações preferidas da invenção como, apenas para nomear alguns, agentes volumétricos, estabilizantes e

10 antioxidantes. No entanto, aminoácidos compreendidos em formulações de proteínas auto-tamponadoras de acordo com a invenção não proporcionam ação de tamponamento. Por esta razão, aqueles com significativa capacidade tamponadora, ou não são empregados, não são empregados em qualquer pH em torno do qual eles apresentam significativa atividade de tamponamento,

15 ou são usados a baixa concentração de forma que, como um resultado, sua capacidade tamponadora na formulação não é significativa. Isto é particularmente o caso para histidina e outros aminoácidos que são usados comumente como tamponadores em formulações farmacêuticas.

Indivíduos à consideração precedente, também é possível usar

20 lisina, prolina, serina, e alanina para estabilizar proteínas em uma formulação. Glicina é útil na liofilização para assegurar a correta estrutura de torta e propriedades. Como um resultado, é um ingrediente comum em formulações liofilizadas e liofilizados reconstituídos, como Neumega®, Genotropin®, e Humatrope®. Arginina pode ser útil para inibir a agregação de proteínas,

25 tanto em formulações líquidas e liofilizadas, como líquido Activase®, Avonex®, e Enbrel®. Metionina é útil como um antioxidante.

iii. Polióis

Polióis incluem açúcares, p. ex., manitol, sacarose, e sorbitol e alcoóis poliídricos, como, por exemplo, glicerol e propileno glicol, e, para fins

de discussão aqui, polietileno glicol (PEG) e substâncias relacionadas. Polióis são cosmotrópicos. Eles são agentes estabilizadores úteis tanto em formulações líquidas e liofilizadas para proteger proteínas contra processo de degradação físicos e químicos. Polióis também são úteis para ajustar a tonicidade de formulações.

Entre polióis úteis na invenção com relação a isto encontra-se o manitol, comumente usado para assegurar a estabilidade estrutural da torta em formulações liofilizadas, como, por exemplo, Leukine®, Enbrel® - Lyo, e Betaseron®. Isto assegura estabilidade estrutural à torta. Ele é usado geralmente com um lioprotetor, p. ex., sacarose. Sorbitol e sacarose encontram-se entre agentes preferidos para ajuste da tonicidade e como estabilizantes para proteger contra estresses de congelamento-descongelamento durante o transporte ou a preparação de volumes durante o processo de fabricação. Açúcares de redução (que contêm grupos cetona ou aldeído livres), como glucose e lactose, podem glicar radicais lisina e arginina de superfície.

Portanto, eles geralmente não se encontram polióis preferidos para uso de acordo com a invenção. Adicionalmente, açúcares que formam referidas espécies reativas, como sacarose, que é hidrolisada a frutose e glucose em condições ácidas, e conseqüentemente gera glicação, também não se encontram entre aminoácidos preferidos da invenção com relação a isto. PEG é útil para estabilizar proteínas e como um crioprotetor e pode ser usado na invenção com relação a isto, como é em Recombinate®.

iv. Tensoativos

Moléculas de proteína são suscetíveis a adsorção sobre superfícies e a desnaturação e conseqüente agregação a interfaces ar-líquido, sólido-líquido, e líquido-líquido. Estes efeitos ampliam-se geralmente inversamente com a concentração de proteína. Estas interações prejudiciais geralmente ampliam-se inversamente com a concentração de proteína e são

tipicamente exacerbadas por meio de agitação física, como aquele gerado durante o transporte e manuseio de um produto.

Tensoativos são usados rotineiramente para prevenir, minimizar, ou reduzir adsorção superficial. Tensoativos úteis na invenção com relação a isto incluem polissorbato 20, polissorbato 80, outros ésteres de ácido graxo de polietoxilatos de sorbitano, e poloxâmero 188.

Tensoativos também são usados comumente para controlar estabilidade conformacional da proteína. O uso de tensoativos com relação a isto é específico para proteína porque qualquer dado tensoativo estabilizará tipicamente algumas proteínas e desestabilizará outras.

Polissorbatos são suscetíveis a degradação oxidativa e, como fornecidos, freqüentemente contêm suficientes quantidades de peróxidos para causar oxidação de cadeias laterais do radical de proteína, particularmente metionina. Conseqüentemente, polissorbatos deveriam ser usados com cuidado e, quando usados, deveriam ser empregados em sua menor concentração efetiva. Com relação a isto, polissorbatos exemplificam a regra geral de que se deveria usar excipientes em suas menores concentrações efetivas.

v. Antioxidantes

Diversos processo podem resultar em oxidação prejudicial de proteínas em formulações farmacêuticas. Até certo ponto é possível prevenir a oxidação prejudicial de proteínas em formulações farmacêuticas mediante manutenção de níveis apropriados de oxigênio ambiente e temperatura ambiente e mediante evitação da exposição à luz. Excipientes antioxidantes também podem ser usado para prevenir degradação oxidativa de proteínas. Entre antioxidantes úteis, com relação a isto, encontram-se agentes de redução, aglutinadores de radical livre/oxigênio, e agentes quelantes. Antioxidantes para uso em formulações terapêuticas de proteína de acordo com a invenção são, de preferência, solúveis em água e conservam sua

atividade durante a vida-de-prateleira de um produto. EDTA é um antioxidante preferido de acordo com a invenção com relação a isto e pode ser usado na invenção de maneira parecida à que foi usada em formulações de fator de fibroblastos ácido e em produtos, como Kineret® e Ontak®.

5 Antioxidantes podem danificar proteínas. Por exemplo, agentes de redução, como glutathione em particular, podem disromper ligações dissulfeto intramoleculares. Assim, antioxidantes para uso na invenção são selecionados de forma a, entre outras coisas, eliminar ou reduzir suficientemente a possibilidade de, eles próprios, danificarem proteínas na
10 formulação.

vi. Íons metálicos

Formulações de acordo com a invenção podem incluir íons metálicos que são co-fatores de proteína e que são necessários para formar complexos de coordenação de proteína, como zinco necessário para formar
15 determinadas suspensões de insulina. Íons metálicos também podem inibir alguns processos que degradam proteínas. No entanto, íons metálicos também catalisam processos físicos e químicos que degradam proteínas.

É possível usar íons magnésio (10-120 mM) para inibir a isomerização de ácido aspártico a ácido isoaspártico. Íons Ca^{+2} (até 100 mM)
20 podem incrementar a estabilidade da desoxirribonuclease humana (rhDNase, Pulmozyme®). Mg^{+2} , Mn^{+2} , e Zn^{+2} , contudo, podem desestabilizar rhDNase. De maneira análoga, Ca^{+2} e Sr^{+2} podem estabilizar Fator VIII, pode ser desestabilizado por Mg^{+2} , Mn^{+2} e Zn^{+2} , Cu^{+2} e Fe^{+2} , e sua agregação pode ser incrementada com íons Al^{+3} .

vii. Conservantes

25 Conservantes são necessários quando se desenvolve formulações parenterais de doses múltiplas que envolvem mais do que uma extração do mesmo recipiente. Sua função primária consiste em inibir o crescimento bacteriano e assegurar esterilidade do produto ao longo da vida-

de-prateleira ou termo de uso do produto de droga. Conservantes comumente usados incluem álcool de benzila, fenol e m-cresol. Embora conservantes possuam uma longa história de uso com parenterais de moléculas pequenas, o desenvolvimento de formulações de proteína que incluem conservantes pode

5 constituir um desafio. Quase sempre conservantes apresentam um efeito desestabilizador (agregação) sobre proteínas, e isto tornou-se um fator importante na limitação de seu uso em formulações de doses múltiplas de proteína. Até aqui, a maior parte das drogas de proteína tem sido formuladas apenas para uso simples. No entanto, quando são possíveis formulações de

10 doses múltiplas, elas apresentam a vantagem adicional de permitir conveniência do paciente e maior comerciabilidade. Um bom exemplo é o do hormônio do crescimento humano (hGH) em que o desenvolvimento de formulações conservadas levou à comercialização de apresentações mais convenientes, de caneta de injeção de uso múltiplo. Pelo menos quatro

15 dispositivos de caneta do tipo referido contendo formulações conservadas de hGH encontram-se disponíveis correntemente no mercado. Norditropin® (líquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ® (líquido, Genentech) & Genotropin (liofilizado - cartucho de câmara dupla, Pharmacia & Upjohn) contêm fenol, enquanto que Somatropo® (Eli Lilly) é formulado com m-cresol.

20 Vários aspectos precisam ser considerados durante a formulação e o desenvolvimento de formas de dosagem conservadas. A concentração conservativa efetiva no produto de droga precisa ser otimizada. Isto requer testar um dado conservante na forma de dosagem com faixas de

25 estabilidade da proteína. Por exemplo, três conservantes foram selecionados com êxito no desenvolvimento de uma formulação líquida para receptor de interleucina-1 (tipo I) usando-se calorimetria de varredura diferencial (DSC). Os conservantes foram ordenados com base em seu impacto sobre a estabilidade em concentrações comumente usadas em produtos

comercializados. Como se pode esperar, o desenvolvimento de formulações líquidas contendo conservantes é mais desafiador do que formulações liofilizadas. Produtos secados por congelamento podem ser liofilizados sem o conservante e reconstituídos com um conservante contendo diluente no momento do uso. Isto encurta o tempo durante o qual um conservante está em contato com a proteína, minimizando significativamente os riscos de estabilidade associada. Com formulações líquidas, é preciso manter a efetividade conservativa e a estabilidade durante toda a vida-de-prateleira do produto (de ~ 18 a 24 meses). Um ponto importante de se observar é que a efetividade conservativa precisa ser demonstrada na formulação final contendo a droga ativa e todos os componentes excipientes.

Formulações de proteínas auto-tamponadoras de acordo com a invenção, particularmente formulações de proteínas biofarmacêuticas de auto-tamponamento, serão geralmente projetadas para vias e métodos de administração específicos, para dosagens de administração específicas e frequências de administração, para tratamentos específicos de doenças específicas, com faixas de bio-disponibilidade e persistência, entre outras coisas. Assim, formulações podem ser projetadas de acordo com a invenção para fornecimento por meio de qualquer via, incluindo, embora sem limitação, oralmente, auralmente, oftalmicamente, retalmente, e vaginalmente, e por vias parenterais, incluindo injeção intravenosa e intraarterial, injeção intramuscular, e injeção subcutânea.

b. Formulações para administração parenteral

Formulações para administração parenteral podem ser em forma de suspensões ou soluções para injeção estéreis isotônicas aquosas ou não-aquosas. Estas soluções e suspensões podem ser preparadas a partir de pós ou grânulos estéreis usando-se um ou mais dos veículos ou diluentes indicados para uso nas formulações para administração oral ou por meio do uso de outros agentes umectantes ou dispersantes vantajosos e agentes de

suspensão.

Quando se considera a administração parenteral, as composições terapêuticas para uso nesta invenção podem ser em forma de uma solução aquosa parenteralmente aceitável isenta de pirógeno compreendendo a proteína desejada em um veículo farmacologicamente aceitável. Um veículo particularmente vantajoso para injeção parenteral é água pura estéril em que a proteína é formulada como uma solução de auto-tamponamento isotônica estéril.

Referidas preparações também podem envolver a formulação da proteína desejada em forma de, entre outras coisas, microesferas injetáveis, partículas bio-erodíveis, compostos poliméricos (ácido polilático, ácido poliglicólico), pérolas, ou liposomas, incluindo aqueles que proporcionam liberação controlada ou sustentada. Referidas formulações podem ser introduzidas por meio de dispositivos de fornecimento de droga implantáveis, entre outros.

Formulações para administração parenteral também podem conter substâncias que ajustam a viscosidade, como carboximetil celulose, sorbitol, e dextrano. Formulações também podem conter ingredientes que incrementam a solubilidade da proteína desejada ou outros ingredientes e aquelas que estabilizam um ou mais ingredientes do tipo referido, incluindo, em alguns casos, a proteína de auto-tamponamento.

c. Formulações para administração pulmonar

Uma composição farmacêutica de acordo com determinadas concretizações da invenção pode ser vantajosa para inalação. Durante administração pulmonar, a composição farmacêutica pode ser administrada em forma de um aerossol ou com um inalador incluindo aerossol em pó seco. Por exemplo, um agente de ligação pode ser formulado como um pó seco para inalação. Soluções de inalação também podem ser formuladas com um propelente para fornecimento de aerossol. Em outra concretização adicional,

soluções podem ser nebulizadas. A administração pulmonar é descrita adicionalmente no Pedido PCT nº PCT/US 94/001875 que descreve fornecimento pulmonar de proteínas modificadas quimicamente.

d. Formulações para administração oral

- 5 Para administração oral, a composição farmacêutica pode ser em forma de, por exemplo, um tablete, cápsula, suspensão, ou líquido. A composição farmacêutica é preparada, de preferência, em forma de uma unidade de dosagem contendo uma quantidade particular do ingrediente ativo. Exemplos de referidas unidades de dosagem são tabletes ou cápsulas.
- 10 Formulações para administração oral de acordo com a invenção com relação a isto podem ser preparadas convencionalmente, sendo que o tamponamento na formulação é proporcionado pela proteína de auto-tamponamento como descrito alhures aqui.

e. Formulações de liberação controlada

- 15 Entre formulações adicionais que podem ser úteis na invenção como descrito aqui são formulações de fornecimento sustentado e controlado. Técnicas para preparação de referidas formulações de fornecimento sustentado e controlado que podem ser usadas de acordo com vários aspectos e concretizações preferidas da invenção são bem conhecidas por aqueles
- 20 versados na técnica. Entre estes métodos de fornecimento que usam veículos de liposomas, micropartículas bio-erodíveis, pérolas porosas, e matrizes de polímero semi-permeáveis, como aqueles descritos na PCT/US93/00829; U.S. 3.773.919; EP 58.481; Sidman *et al*, *Biopolymers*, 22:547-556 (1983); Langer *et al.*, *J. Biomed. Mater. Res.*, 15:167-277, (1981); Langer *et al.*, *Chem. Tech.*,
- 25 12:98-105(1982); EP 133.988; Eppstein *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sc. (USA)*, 82:3688-3692 (1985); EP 36.676; EP 88.046; e EP 143.949, sendo que cada uma destas é incorporada aqui integralmente por referência, particularmente em partes pertinentes a formulações de fornecimento sustentado e controlado de proteínas farmacêuticas de auto-tamponamento de acordo com a invenção

aqui descrita.

f. Esterilização

5 A composição farmacêutica a ser usada para administração *in vivo* precisa ser tipicamente estéril. Isto pode ser realizado por meio de filtração através de membranas de filtração estéreis. Onde uma composição é liofilizada, esterilização usando este método pode ser conduzida antes ou após a liofilização e reconstituição. A composição para administração parenteral pode ser armazenada em forma liofilizada ou em solução. Adicionalmente, geralmente composições parenterais são colocadas em um recipiente
10 apresentando uma porta de acesso estéril, por exemplo, um frasco ou bolsa de solução intravenosa possuindo uma tampa que é perfurável com uma agulha de injeção hipodérmica.

g. Armazenamento

15 Uma vez formulada uma composição farmacêutica, ela pode ser armazenada em frascos estéreis como uma solução, suspensão, gel, emulsão, sólido, ou um pó desidratado ou liofilizado. Referidas formulações podem ser armazenadas em uma forma para pronto-emprego ou em uma forma (p. ex., liofilizada) exigindo reconstituição antes da administração.

h. Agentes farmacêuticos adicionais

20 Composições de proteína auto-tamponadoras de acordo com a invenção, particularmente composições de proteínas farmacêuticas de auto-tamponamento, podem compreender, adicionalmente à proteína de auto-tamponamento da composição, um ou mais agentes farmacêuticos adicionais. Referidos agentes também podem ser proteínas, ou podem ser outros tipos de
25 agentes. Inclui-se entre referidos agentes são aqueles para prevenção ou tratamento de qualquer distúrbio ou doença. Referidos agentes incluem, por exemplo, antibióticos e antimicóticos. Eles também incluem agentes para tratar distúrbios humanos, incluindo embora sem limitação, agentes para tratar doenças inflamatórias, cânceres, distúrbios metabólicos, distúrbios

neuroológicos e renais, apenas para nomear alguns poucos. Agentes que podem ser usados na invenção com relação a isto também incluem agentes úteis para aumentar a ação de uma composição de auto-tamponamento e ou prevenir, melhorar, ou tratar quaisquer efeitos colaterais indesejáveis da administração dos mesmos.

i. Métodos para a preparação formulações de proteína auto-tamponadoras

Composições de acordo com a invenção podem ser produzidos usando-se métodos rotineiros bem conhecidos para a preparação, formulação, e uso de proteínas, particularmente proteínas farmacêuticas. Em determinadas das concretizações preferidas de vários aspectos da invenção com relação a isto, métodos para a preparação das composições compreendem o uso de contra-íons para remover agentes tamponadores residuais. Com relação a isto o termo contra-íon é qualquer constituinte polar ou carregado que atua deslocando tamponador da composição durante sua preparação. Contra-íons úteis com relação a isto incluem, por exemplo, glicina, cloreto, sulfato, e fosfato. O termo contra-íon com relação a isto é usado significando o mesmo que íon de deslocamento.

Agentes tamponadores residuais podem ser removidos usando-se os contra-íons com relação a isto, com o emprego de uma variedade de métodos bem conhecidos, incluindo embora sem limitação, métodos convencionais de diálise e métodos baseados em difusão de membrana de alto desempenho, como diafiltração de fluxo tangencial. Métodos para remoção de tampão residual empregando um contra-íon com relação a isto também podem ser realizados, em alguns casos, com o emprego de cromatografia de exclusão de tamanho.

Em determinadas concretizações relacionadas preferidas com relação a isto, composições de acordo com a invenção são preparadas por meio de um processo que envolve diálise contra uma solução isenta de tampão a um pH abaixo daquele da preparação contendo a proteína de auto-

tamponamento. Em concretizações particularmente preferidas da invenção com relação a isto, a solução isenta de tampão compreende contra-íons, particularmente aqueles que facilitam a remoção do tampão residual e que não afetam adversamente a proteína de auto-tamponamento ou sua formulação.

5 Em concretizações particularmente preferidas adicionais da invenção com relação a isto, após a diálise o pH da preparação é ajustado ao pH desejado usando-se ácido diluído ou base diluída.

Em determinadas concretizações relacionadas particularmente preferidas com relação a isto, composições de acordo com a invenção são preparadas por meio de um processo que envolve diafiltração de fluxo tangencial contra uma solução isenta de tampão a um pH abaixo daquele da preparação contendo a proteína de auto-tamponamento. Em concretizações particularmente preferidas da invenção com relação a isto, a solução isenta de tampão compreende contra-íons, particularmente aqueles que facilitam a remoção de tampão residual e que não afetam adversamente a proteína de auto-tamponamento ou sua formulação. Em concretizações particularmente preferidas adicionais da invenção com relação a isto, após diafiltração o pH da preparação é ajustado ao pH desejado usando-se ácido diluído ou base diluída.

20 5. Vias de administração

Formulações de acordo com a invenção, em várias concretizações, podem ser administradas por meio de diversas vias vantajosas, bem conhecidas por aqueles com prática na técnica da administração de terapêuticos a um indivíduo. Em concretizações da invenção com relação a isto, administra-se uma ou mais formulações, como descrito alhures aqui via o canal alimentar. Em outras concretizações, uma ou mais formulações como descrito alhures aqui são administradas parenteralmente. Em várias concretizações, uma ou mais formulações podem ser administradas via o canal alimentar em conjunto com uma ou mais outras formulações

administradas parenteralmente.

Referidas vias numa variedade de concretizações incluem, embora sem limitação, a administração das composições oralmente, ocularmente, mucosalmente, topicamente, por via retal, pulmonar, como por spray de inalação, e epicutaneamente. As vias parenterais de administração a
5 seguir também são úteis em várias concretizações da invenção:

Administração por meio de injeção intravenosa, intraarterial, intracardíaca, intraespinal, intratecal, intraóssea, intraarticular, intrasinovial, intracutânea, intradérmica, subcutânea, peritoneal, e/ou intramuscular. Em
10 algumas concretizações usa-se injeção intravenosa, intraarterial, intracutânea, intradérmica, subcutânea e/ou intramuscular. Em algumas concretizações usa-se injeção intravenosa, intraarterial, intracutânea, subcutânea, e/ou intramuscular.

Em determinadas concretizações da invenção as composições
15 são administradas localmente, por exemplo, por meio de injeção intraocular para tratar neovascularização ocular, retinopatia, ou degeneração macular relacionada com a idade.

6. Doses

A quantidade de uma proteína de auto-tamponamento
20 formulação administrada e o regime de dosagem para tratar uma condição de doença com a formulação depende de uma variedade de fatores, incluindo a idade, peso, sexo, e condição clínica do indivíduo, o tipo de doença, a gravidade da doença, a via e a frequência de administração, e a formulação particular empregada. Em particular, a quantidade dependerá do terapêutico
25 de proteína que está sendo administrado e de quaisquer outros agentes terapêuticos que estão sendo administrados em conjunto com o mesmo. Dosagens podem ser determinadas para formulações de acordo com a invenção usando-se procedimentos farmacêuticos de rotina bem estabelecidos para este fim.

7. Regimes de dosagem

Formulações da invenção podem ser administradas em dosagens e por meio de técnicas bem conhecidas por aqueles com prática nas técnicas médicas e veterinárias considerando fatores, como a idade, sexo, peso, e condição do paciente particular, e da formulação que será administrada (p. ex., sólido vs. líquido). Doses para humanos ou outros mamíferos podem ser determinadas sem experimentação desnecessária pela pessoa versada na técnica, a partir desta revelação, dos documentos aqui indicados, e do conhecimento na técnica.

De acordo com várias concretizações, dosagens apropriadas e planos de dosagem dependerão de numerosos fatores, e podem variar em diferentes circunstâncias. Os parâmetros que determinarão os planos de dosagem ótimos a serem administrados incluirão tipicamente alguns ou todos os seguintes: a doença que está sendo tratada e seu estágio; a espécie do indivíduo, sua saúde, gênero, idade, peso, e taxa metabólica; outras terapias que estão sendo administradas; e complicações potenciais esperadas considerando a história ou genótipo do indivíduo.

O plano de dosagem ótima em uma dada situação também considerará a natureza da formulação, a via por que é administrada, a via de distribuição após a administração, e a taxa à qual será eliminada dos sítios de ação e do corpo do indivíduo. Finalmente, a determinação de dosagem ótima proporcionará, de preferência, uma dose efetiva que nem se encontrará abaixo do limiar de efeito benéfico máximo, nem acima do limiar em que os efeitos prejudiciais associados com a dose dos agentes ativos /superam as vantagens da dose incrementada.

Deve-se considerar que uma "dose" pode ser fornecida de uma só vez, fracionadamente, ou continuamente durante um determinado período. A dose inteira também pode ser fornecida em um único local, ou espalhada fracionadamente em vários locais. Adicionalmente, doses podem permanecer

iguais ao longo do tratamento, ou elas podem variar.

Em várias concretizações, formulações de acordo com a invenção são administradas em uma dose inicial, e, em seguida, mantidas com administrações adicionais. Em algumas concretizações, uma formulação da invenção é administrada por meio de um método inicialmente, e administrado em seguida por meio do mesmo método ou por meio de um ou mais métodos diferentes. As dosagens de administrações em andamento podem ser ajustadas para se manter os níveis dos agentes ativos em determinados valores no indivíduo. Em algumas concretizações as composições são administradas inicialmente, e/ou para manter seu nível no indivíduo, por meio de injeção intravenosa. Em várias concretizações usa-se outras formas de administração.

Formulações da invenção podem ser administradas em muitas frequências numa ampla faixa de períodos, incluindo qualquer frequência e faixa de períodos vantajosa que fornece uma dose efetiva para tratamento. Doses podem ser fornecidas continuamente, administradas a cada poucas horas, uma ou duas vezes por dia, todo dia, em dias alternados ou várias vezes por semana, ou menos freqüentemente. Em algumas concretizações elas são administradas durante períodos de um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, treze, quatorze, ou mais dias. Em algumas concretizações elas são administradas durante períodos de um, dois, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, onze, doze, ou mais meses. Numa variedade de concretizações elas são administradas durante um período de um, duas, três, quatro, cinco, seis, sete, oito, nove, dez, ou mais anos. Regimes vantajosos para administração inicial e doses adicionais para administrações seqüenciais podem ser todos iguais ou podem ser variáveis. Regimes apropriados podem ser determinados pela pessoa versada na técnica, a partir desta revelação, dos documentos aqui indicados, e do conhecimento na técnica. De uma maneira geral, as durações de tratamento serão proporcionais à duração do processo de doença, à efetividade das terapias

sendo aplicadas, e à condição e resposta do indivíduo que está sendo tratado.

8. Doenças e tratamentos

Composições de proteínas farmacêuticas de auto-tamponamento de acordo com a invenção, em concretizações preferidas, são
5 úteis para tratar indivíduos que sofrem de uma ampla variedade de distúrbios e doenças. Como observado alhures aqui, a invenção proporciona, entre outros, composições de auto-tamponamento de anticorpos farmacêuticos, proteínas farmacêuticas derivadas de anticorpos, e proteínas farmacêuticas relacionadas com anticorpo, que podem compreender funções efetoras de Fc e
10 domínios de ligação específicos durante uma ampla variedade de alvos relacionados com doença e que são úteis para tratar doença. Estas proteínas e composições de auto-tamponamento das mesmas são descritas detalhadamente acima, e também seu uso no tratamento de vários distúrbios e doenças associadas com seus alvos. Métodos para usar as composições,
15 incluindo métodos de formulação, métodos de administração, doses, e métodos de dosagem são, todos, descritos ilustrativamente acima. A formulação e administração de qualquer composição particular da invenção pode ser ajustada ao tratamento de uma doença particular, usando-se técnicas bem conhecidas e rotineiras nas técnicas relacionadas, considerando a
20 orientação proporcionada pela presente descrição da invenção. Entre doenças tratadas de maneira útil com o uso de formulações de proteína farmacêuticas auto-tamponadoras de acordo com vários aspectos e concretizações preferidas da invenção compreende-se doenças inflamatórias, cânceres, distúrbios metabólicos, distúrbios neurológicos e renais, apenas para nomear alguns.

9. Embalagem e kits

A invenção também proporciona kits compreendendo formulações de proteína auto-tamponadoras, particularmente kits compreendendo em um ou mais recipientes, uma formulação de proteína farmacêutica de auto-tamponamento e instruções relativas a seu uso,

particularmente kits em que a formulação é uma formulação farmacêuticamente aceitável para uso humano. Entre kits preferidos encontram-se aqueles compreendendo um ou mais recipientes de uma formulação de proteína de auto-tamponamento da invenção e um ou mais documentos separados, informação relativa ao conteúdo do kit, e/ou o uso de seu conteúdo, particularmente aqueles em que a proteína é uma proteína biofarmacêutica, particularmente aqueles em que a proteína é uma proteína biofarmacêutica formulada para o tratamento de uma doença em humanos.

Em determinados aspectos da invenção com relação a isto, kits preferidos incluem kits como acima compreendendo adicionalmente uma ou mais seringas de câmara única ou de câmaras múltiplas (p. ex., seringas líquidas e liosseringas) durante administrar uma ou mais formulações de proteína auto-tamponadoras da invenção. Em determinados aspectos da invenção com relação a isto, determinados dos kits particularmente preferidos compreendem adicionalmente seringas previamente carregadas. Em concretizações particularmente preferidas adicionais com relação a isto, os kits compreendem uma composição farmacêutica de auto-tamponamento para administração parenteral, fechados hermeticamente em um frasco sob vácuo parcial numa forma pronta para carregamento em uma seringa e administração a um indivíduo. Em concretizações particularmente preferidas com relação a isto, a composição é disposta aqui sob vácuo parcial. Levando em conta estas e outras considerações, em determinadas concretizações particularmente preferidas, kits adicionais contém um ou mais frascos de acordo com qualquer um dos precedentes, sendo que cada frasco contém uma única dose unitária para administração a um indivíduo. Em todos estes aspectos e em outros, a invenção refere-se adicionalmente a kits compreendendo liofilizados, dispostos como acima, que, após reconstituição proporcionam composições de acordo com isso. Com relação a isto, a invenção proporciona adicionalmente, em determinadas de suas

concretizações preferidas, kits que contêm um liofilizado de acordo com a invenção e um diluente estéril para reconstituição do liofilizado.

Exemplos

A presente invenção é descrita adicionalmente com os

5 Exemplos ilustrativos e não-limitantes a seguir.

Exemplo 1: Titulações de ácido e capacidades tamponadoras de tamponadores de acetato de sódio na faixa de pH de 5,0 a 4,0

Preparou-se uma solução de consumo com uma concentração conhecida de ácido acético por meio de diluição de ácido acético glacial ultra-puro em água própria para HPLC e, depois, titulando-se o pH até o valor desejado com NaOH. Consumos foram equilibrados ao ar e a 21°C. Padrões volumétricos foram preparados a uma concentração 1 N e diluídos conforme necessário com água para HPLC.

Tamponadores de acetato de sódio 1 mM, 2,5 mM, 5 mM, 7,5 mM, 10 mM, e 15 mM foram preparados diluindo-se o estoque em água para HPLC. As soluções foram tituladas com HCl. Usou-se HCl 0,2 N para as soluções 1, 2,5, e 5 mM, usou-se HCl 0,4 N para a solução 7,5 mM, e usou-se HCl 0,8 N para as soluções 10 e 15 mM. As titulações foram realizadas usando-se técnicas analíticas padrão de laboratório.

Figura 1. Quadro A mostra os dados de titulação e as linhas de tendência de menos quadrados calculados a partir dos dados para cada solução. A inclinação da linha de tendência calculada de cada conjunto de dados foi considerada como a capacidade tamponadora do tampão de acetato correspondente. A dependência linear da capacidade tamponadora no tampão de acetato concentração é mostrada na Figura 1, Quadro B.

EXEMPLO 2: Titulações de base e capacidades tamponadoras de tamponadores de acetato de sódio na faixa de pH 5,0 a 5,5

Estoques de tampão de acetato e soluções para titulação foram preparados como descrito no Exemplo 1. As soluções foram tituladas como

descrito no Exemplo 1, exceto que as soluções foram tituladas de pH 5,0 a 5,5 e as titulações foram realizadas usando NaOH em lugar de HCl. Usou-se NaOH 0,2 N para titular as soluções 1, 2,5, e 5 mM e usou-se NaOH 0,4 N para as soluções 7,5, 10, e 15 mM. Os resultados das titulações são mostrados na Figura 2 A. A dependência linear da capacidade tamponadora sobre a concentração de tampão de acetato é apresentada na Figura 2B.

EXEMPLO 3: Determinação do acetato por meio de HPLC

O acetato foi determinado em amostras de tampão de acetato usando-se SE-HPLC analítica. Uma curva padrão para áreas de pico como uma função da concentração do acetato foi estabelecida por meio de análise de acetato em tamponadores com uma concentração de acetato conhecida. A quantidade de acetato em amostras de teste foi interpolada a partir da curva padrão. Uma curva padrão é mostrada na Figura 3. Quantidade nominal e medida de acetato em tamponadores de ensaio encontram-se tabuladas abaixo da curva padrão na figura.

EXEMPLO 4: Titulações de ácido de formulações de Ab-hOPGL na faixa de pH 5,0 a pH 4,0

Ab-hOPGL volumétrico em 10 mM de acetato (valor nominal), 5 % sw sorbitol, pH 5,0 foi diafiltrado contra 5,25 % de sorbitol, pH 3,2 (ajustado com HCl) em um sistema LABSCALE TFF® (Millipore) com uma cassete de coletor múltiplo, usando-se 3 membranas de ultrafiltração de celulose regeneradas Millipore Pellicon XL 50. A solução de diafiltração foi trocada de 8 a 10 vezes ao longo da diafiltração para cada formulação.

Após a diafiltração, o pH da solução isenta de tampão resultante foi medido e ajustado em pH 5,0, usando-se HCl 0,05 N ou NaOH 0,05 N.

Soluções a 1, 10, 30, 60, 90, e 110 mg/ml foram preparadas para titulação por meio de diluição. O pH de cada diluição foi ajustado em pH 5,0 com NaOH ou HCl conforme necessário. Titulações foram realizadas

como descrito nos Exemplos precedentes. Usou-se HCl 0,2 N para titular as soluções a 1, 10, e 30 mg/ml. Usou-se HCl 0,4 N para titular a solução a 60 mg/ml. Usou-se HCl 0,8 N para titular as soluções.

Os resultados das titulações encontram-se ilustrados na Figura 4. A linha de regressão de menos quadrados é mostrada para o conjunto de dados em cada concentração. A capacidade tamponadora foi considerada como sendo a inclinação da linha de regressão para cada concentração.

EXEMPLO 5: Titulações de base de formulações de Ab-hOPGL na faixa de pH 5,0 a 6,0

Soluções a 1, 10, 30, 60, 90, e 110 mg/ml de Ab-hOPGL foram preparadas para titulação como descrito no Exemplo 4. Titulações de base foram realizadas usando NaOH como descrito nos Exemplos precedentes. Usou-se NaOH 0,2 N para as soluções a 1, 10, 30, e 60 mg/ml e usou-se NaOH 0,4 N para as soluções a 90 e 110 mg/ml. Resultados das titulações encontram-se ilustrados no gráfico na Figura 5. Linhas de regressão linear são mostradas para os dados de cada concentração. A capacidade tamponadora foi considerada como a inclinação da linha de regressão para cada concentração.

EXEMPLO 6: Níveis de acetato residuais em formulações de Ab-hOPGL de auto-tamponamento

A quantidade de acetato residual foi determinada em formulações de Ab-hOPGL usando-se os métodos descritos no Exemplo 3. Os resultados encontram-se ilustrados graficamente na Figura 6, que mostra uma curva padrão relativa a medições de HPLC para concentrações de acetato e, abaixo do gráfico, uma tabulação dos resultados de determinações feitas em formulações de Ab-hOPGL em diferentes concentrações. Concentrações de Ab-hOPGL são indicadas à esquerda ("Nominal") e a concentração medida de acetato em cada uma das concentrações de Ab-hOPGL é indicada à direita.

EXEMPLO 7: Capacidade tamponadora de formulações de Ab-hOPGL mais

ou menos acetato residual na faixa de pH 5,0 a 4,0

Formulações de Ab-hOPGL auto-tamponada foram preparadas e tituladas com HCl como descrito nos Exemplos precedentes. Adicionalmente, dados foram ajustados subtraindo-se a contribuição de tampão de acetato residual com base na determinação do teor de acetato por meio de SE-HPLC como descrito, por exemplo, no Exemplo 3. As capacidades tamponadoras foram determinadas como descrito acima. Realizou-se a mesma análise em ambos os conjuntos de dados. Os resultados, ilustrados na Figura 7, mostram o efeito do acetato residual sobre a capacidade tamponadora das preparações de Ab-hOPGL. Os resultados tornam claro que a capacidade tamponadora do acetato residual é um fator menor na capacidade tamponadora de formulações de Ab-hOPGL de auto-tamponamento que foram analisadas.

EXEMPLO 8: Capacidade tamponadora de Ab-hOPGL mais ou menos acetato residual na faixa de pH 5,0 a 6,0

Formulações de Ab-hOPGL auto-tamponadas foram preparadas e tituladas com NaOH como descrito nos Exemplos precedentes. Adicionalmente, dados foram ajustados subtraindo-se a contribuição de tampão de acetato residual com base na determinação do teor de acetato por meio de SE-HPLC como descrito, por exemplo, no Exemplo 3. As capacidades tamponadoras foram determinadas como descrito acima. Realizou-se a mesma análise em ambos os conjuntos de dados. Os resultados, ilustrados na Figura 8, mostram o efeito do acetato residual sobre a capacidade tamponadora das preparações de Ab-hOPGL. Os resultados tornam claro que a capacidade tamponadora do acetato residual é um fator menor na capacidade tamponadora das formulações de Ab-hOPGL de auto-tamponamento que foram analisadas.

EXEMPLO 9: pH e estabilidade de Ab-hOPGL em formulações auto-tamponadas e tamponadas convencionalmente

Formulações auto-tamponadoras de Ab-hOPGL foram preparadas como descrito nos Exemplos precedentes. Adicionalmente, realizou-se formulações contendo um agente de tamponamento convencional, quer acetato ou glutamato. Todas as formulações continham 60 mg/ml de Ab-hOPGL. A estabilidade do pH e Ab-hOPGL nas formulações foi monitorada durante seis meses de armazenamento a 4°C. A estabilidade foi monitorada determinando-se Ab-hOPGL monomérico nas formulações durante o tempo do armazenamento. A determinação foi realizada usando SE-HPLC como descrito acima. Os resultados para todas as três formulações são mostrados na Figura 9. Quadro A mostra a estabilidade do Ab-hOPGL nas três formulações. A estabilidade na formulação auto-tamponada é tão boa quanto nas formulações tamponadas convencionalmente. Quadro B mostra a estabilidade do pH das três formulações. Novamente, a estabilidade do pH na formulação auto-tamponada é tão boa quanto em formulações tamponadas convencionalmente.

EXEMPLO 10: Titulação e capacidades tamponadoras de Ab-hB7RP1 - pH de 5,0 a 4,0

Formulações auto-tamponadoras de Ab-hB7RP1 foram preparadas em concentrações de 1, 10, 30, e 60 mg/ml, como descrito para Ab-hOPGL nos Exemplos precedentes. Titulações foram realizadas usando HCl como descrito acima. Adicionalmente, dados foram ajustados subtraindo-se a contribuição do tampão de acetato residual com base na determinação do teor de acetato por meio de SE-HPLC como descrito, por exemplo, no Exemplo 3. Figura 10, Quadro A mostra os resultados de titulação. Figura 10, Quadro B mostra a dependência da capacidade tamponadora relativamente à concentração de formulações de Ab-hB7RP1 antes e após se subtrair a contribuição do tampão de acetato residual. Os resultados mostram claramente a capacidade de auto-tamponamento de Ab-hB7RP1 nesta faixa de pH. A 40 mg/ml isto proporciona aproximadamente tanta capacidade

tamponadora nesta faixa de pH quanto 10 mM de tampão de acetato de sódio. A 60 mg/ml isto proporciona aproximadamente tanta capacidade tamponadora quanto 15 mM de tampão de acetato de sódio.

EXEMPLO 11: Titulação e capacidades tamponadoras para Ab-hB7RP1 - pH

5 5,0 a 6,0

 Formulações auto-tamponadoras de Ab-hB7RP1 foram preparadas em concentrações de 1, 10, 30, e 60 mg/ml, como descrito para Ab-hOPGL nos Exemplos precedentes. Titulações foram realizadas usando-se NaOH como descrito acima. Adicionalmente, dados foram ajustados

10 subtraindo-se a contribuição do tampão de acetato residual com base na determinação do teor de acetato por meio de SE-HPLC como descrito, por exemplo, no Exemplo 3. Figura 11, Quadro A mostra os resultados de titulação. Figura 11, Quadro B mostra a dependência da capacidade tamponadora relativamente à concentração de formulações de Ab-hB7RP1

15 antes e após subtrair a contribuição do tampão de acetato residual. Os resultados mostram claramente a capacidade de auto-tamponamento de Ab-hB7RP1 nesta faixa de pH. A 60 mg/ml isto proporciona aproximadamente tanta capacidade tamponadora nesta faixa de pH quanto 10 mM de tampão de acetato de sódio.

20 EXEMPLO 12: Estabilidade de Ab-hB7RP1 em formulações auto-tamponadoras e tamponadas convencionalmente a 4°C e 29°C

 Ab-hB7RP1 foi preparado como descrito nos Exemplos precedentes e formulado como descrito acima, em formulações auto-tamponadoras e em formulações usando um agente de tamponamento

25 convencional, seja acetato ou glutamato. Todas as formulações continham 60 mg/ml de Ab-hB7RP1. A estabilidade do pH da solução e de Ab-hB7RP1 na solução foi monitorada durante vinte e seis semanas de armazenamento a 4°C ou a 29°C. A estabilidade foi monitorada determinando-se o Ab-hB7RP1 monomérico nas formulações durante o período de armazenamento. A

determinação foi realizada usando SE-HPLC como descrito acima. Os resultados são mostrados na Figura 12. Quadro A mostra os resultados para armazenamento a 4°C. Quadro B mostra os resultados para armazenamento a 29°C. Ab-hB7RP1 foi pelo menos tão estável na formulação auto-tamponada a 4°C quanto as formulações tamponadas convencionalmente. A 29°C a formulação auto-tamponada foi pelo menos tão estável quanto as formulações tamponadas convencionalmente, e pode ter sido ligeiramente melhor de 10 semanas até o último momento.

EXEMPLO 13: Estabilidade do pH de Ab-hB7RP1 auto-tamponado a 4°C e 29°C

Ab-hB7RP1 auto-tamponador a 60 mg/ml foi preparado como descrito no Exemplo precedente. O pH foi monitorado durante todo o período e às mesmas temperaturas como descrito aqui. Os resultados são mostrados na Figura 13.

EXEMPLO 14: Capacidade tamponadora de formulações de Ab-hCD22 - pH de 4,0 a 6,0

Formulações auto-tamponadoras de Ab-hCD22 foram preparadas e tituladas na faixa de pH de 5,0 a 4,0 e na faixa de 5,0 a 6,0, como descrito para Ab-hOPGL e Ab-hB7RP1 nos Exemplos precedentes. Capacidades tamponadoras foram calculadas a partir dos dados de titulação, também como descrito acima. A capacidade tamponadora como uma função da concentração é mostrada na Figura 14 para ambas as faixas de pH. Quadro A mostra a capacidade tamponadora das formulações de Ab-hCD22 na faixa de pH 5,0 a 4,0. A capacidade tamponadora é linearmente dependente da concentração, e aproximadamente 21 mg/ml da formulação de Ab-hCD22 apresenta uma capacidade tamponadora igual àquela de 10 mM de tampão de acetato de sódio pH 5,0, medido da mesma maneira. Quadro B mostra a capacidade tamponadora como uma função da concentração na faixa de pH de 5,0 a 6,0. Nesta faixa de pH aproximadamente 30 mg/ml da formulação de

Ab-hCD22 tem uma capacidade tamponadora igual àquela de 10 mM de tampão de acetato de sódio pH 5,0, medido da mesma maneira. Quadro B mostra a capacidade tamponadora como uma função da concentração na faixa de pH de 5,0 a 6,0. Nesta faixa de pH aproximadamente 30 mg/ml da
5 formulação de Ab-hCD22 tem uma capacidade tamponadora igual àquela de 10 mM de tampão de acetato de sódio pH 5,0, medido da mesma maneira.

EXEMPLO 15: Titulações e Capacidades tamponadoras de formulações de Ab-hIL4R - pH 5,0 a 4,0

Formulações auto-tamponadoras de Ab-hIL4R foram
10 preparadas em concentrações de 1, 10, 25, e 90 mg/ml, como descrito para Ab-hOPGL nos Exemplos precedentes. Titulações foram realizadas usando HCl como descrito acima. Figura 15, Quadro A mostra os resultados de titulação. Figura 15, Quadro B mostra a dependência da capacidade tamponadora sobre a concentração de Ab-hIL4R. Os resultados mostram
15 claramente a capacidade de auto-tamponamento de Ab-hIL4R nesta faixa de pH. A aproximadamente 75 mg/ml isto proporciona tanta capacidade tamponadora nesta faixa de pH quanto 10 mM de acetato de sódio pH 5,0, medido da mesma maneira.

EXEMPLO 16: Titulações e capacidades tamponadoras de formulações de Ab-hIL4R - pH 5,0 a 6,0

Formulações auto-tamponadoras de Ab-hIL4R foram
20 preparadas em concentrações de 1, 10, 25, e 90 mg/ml, como descrito para Ab-hOPGL nos Exemplos precedentes. Titulações foram realizadas usando-se NaOH como descrito acima. Figura 16, Quadro A mostra os resultados de titulação. Figura 16, Quadro B mostra a dependência da capacidade tamponadora relativamente à concentração de Ab-hIL4R nesta faixa de pH. Os resultados mostram claramente a capacidade de auto-tamponamento
25 capacidade de Ab-hIL4R nesta faixa de pH. A aproximadamente 90 mg/ml isto proporciona tanta capacidade tamponadora nesta faixa de pH quanto 10

mM de acetato de sódio pH 5,0, medido da mesma maneira.

EXEMPLO 17: Estabilidade de Ab-hIL4R e do pH em acetato e formulações de Ab-hIL4R auto-tamponadas a 37°C

5 Formulações de Ab-/hIL4R auto-tamponadas e tamponadas com acetato pH 5,0 e 70 mg/ml foram preparadas como descrito acima. As estabilidades do Ab-hIL4R e pH foram monitoradas nas formulações durante 4 semanas a 37°C. A estabilidade do Ab-hIL4R foi monitorada por meio de SE-HPLC como descrito acima. Os resultados são mostrados na Figura 17. Quadro A mostra que Ab-hIL4R é pelo menos tão estável na formulação auto-
10 tamponada quanto na formulação de tampão de acetato de sódio. Quadro B mostra que o pH na formulação auto-tamponada é tão estável quanto na formulação de tampão de acetato de sódio.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende uma proteína farmacêutica, sendo que no pH da composição, 21°C, uma atmosfera, e equilíbrio com atmosfera ambiente, a proteína tem uma
5 capacidade tamponadora por volume unitário de pelo menos 1,50 mEq/litro-
unidade de pH, sendo que adicionalmente, exclusivamente com relação a isto, a capacidade tamponadora por volume unitário da composição é inferior a 0,5
mEq/litro-unidade de pH, sendo que a composição foi aprovada para uso
farmacêutico por uma autoridade legalmente autorizada para conceder
10 referida aprovação.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada
pelo fato de que no pH da composição, 21°C, uma atmosfera, e equilíbrio
com atmosfera ambiente, a proteína tem uma capacidade tamponadora por
volume unitário de pelo menos, aproximadamente, aquela do tampão acetato
15 de sódio 4,0 mM em água pura na faixa de pH 5,0 a 4,0 ou de pH 5,0 a 5,5,
nas mesmas condições, sendo que, adicionalmente, exclusivamente da
capacidade tamponadora da referida proteína, a capacidade tamponadora por
volume unitário da composição nas mesmas condições não é maior do que de
tampão acetato de sódio 2,0 mM em água pura na faixa de pH de 5,0 a 4,0 ou
20 pH 5,0 a 5,5 nas mesmas condições.

3. Composição de acordo com a reivindicação 2, caracterizada
pelo fato de que a proteína proporciona pelo menos 80 % da capacidade
tamponadora da composição.

4. Composição de acordo com a reivindicação 2 ou 3,
25 caracterizada pelo fato de que a concentração da proteína é entre
aproximadamente 20 e 400 mg/ml.

5. Composição de acordo com a reivindicação 2, 3 ou 4,
caracterizada pelo fato de que o pH mantido pela ação tamponadora da

proteína é entre aproximadamente 3,5 e 8,0.

6. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizado pelo fato de que o pH mantido pela ação tamponadora da proteína é entre aproximadamente 4 e 6.

5 7. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que compreende adicionalmente um ou mais sais farmacologicamente aceitáveis.

8. Composição de acordo com a reivindicação 7, caracterizada pelo fato de que a concentração de sal total é inferior a 150 mM.

10 9. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que a concentração de sal total é inferior a 100 mM.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 9, caracterizada pelo fato de que compreende, adicionalmente, um ou mais polióis farmacologicamente aceitáveis.

15 11. Composição de acordo com a reivindicação 10, caracterizada pelo fato de que o poliol é um ou mais dentre sorbitol, manitol, sacarose, trealose, ou glicerol.

12. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 11, caracterizada pelo fato de que compreende, 20 adicionalmente, um ou mais tensoativos farmacologicamente aceitáveis.

13. Composição de acordo com a reivindicação 12, caracterizada pelo fato de que o tensoativo é um ou mais dentre polissorbato 20, polissorbato 80, outros ésteres de ácido graxo de sorbitano, polietoxilados, e poloxâmero 188.

25 14. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 13, caracterizada pelo fato de que compreende, adicionalmente, um ou mais componentes farmacologicamente aceitáveis: agentes de balanço osmótico; antioxidantes; antibióticos; antimicrobianos;

agentes volumétricos; lio-protetores; agentes anti-espumantes; agentes quelantes; conservantes; colorantes; analgésicos; ou agentes farmacêuticos adicionais.

5 15. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 14, caracterizada pelo fato de que a proteína compreende uma primeira porção de ligação de um par de porções de ligação cognatas.

10 16. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 15, caracterizada pelo fato de que a proteína é ou compreende: um anticorpo, fragmento Fab, fragmento Fab2, fragmento Fab3, fragmento Fc, fragmento scFv, fragmento bis-scFv(s), minicorpo, diacorpo, triacorpo, tetracorpo, domínio V_HH, domínio V-NAR, domínio V_H, domínio V_L, Ig de camelo, Ig NAR, recepticorpo, pepticorpo, ou uma variante ou um derivado do mesmo ou uma proteína relacionada ao mesmo, ou uma
15 modificação do mesmo.

17. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 16, caracterizada pelo fato de que a proteína é selecionada do grupo que consiste em proteínas que se ligam especificamente a uma ou mais proteínas CD, proteínas da família de receptor HER, moléculas
20 de adesão de células, fatores de crescimento, fatores de crescimento de nervos, fatores de crescimento de fibroblastos, fatores de crescimento de transformação (TGF), fatores de crescimento similares a insulina, fatores osteoindutivos, insulinas e proteínas relacionadas com insulina, proteínas de coagulação e relacionadas com coagulação, fatores estimuladores de colônias
25 (CSFs), outras proteínas do sangue e do soro, antígenos de grupo sanguíneo; receptores, proteínas associadas a receptores, receptores de hormônio do crescimento, receptores de células T; fatores neurotróficos, neurotrofinas, relaxinas, interferons, interleucinas, antígenos virais, lipoproteínas, integrinas,

fatores reumatóides, imunotoxinas, proteínas de membrana de superfície, proteínas de transporte, receptores de direcionamento (*homing*), adressinas, proteínas reguladoras, e imunoadesinas,

5 18. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 16, caracterizada pelo fato de que a proteína é selecionada do grupo que consiste em: proteínas de ligação específicas para OPGL, proteínas de ligação específicas para miostatina, proteínas de ligação específicas para receptor de IL-4, proteínas de ligação específicas para IL1-R1, proteínas de ligação específicas para Ang2, proteínas de ligação específicas para NGF, proteínas de ligação específicas para CD22, proteínas de ligação específicas para receptor de IGF-1, proteínas de ligação específica para B7RP-1, proteínas de ligação específica para IFN gama, proteínas de ligação específicas para TALL-1, fatores de células-tronco, ligantes de Flt-3, e receptores de IL-17.

15 19. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 16, caracterizada pelo fato de que a proteína é selecionada do grupo que consiste em proteínas que se ligam especificamente a um ou mais de: CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD34; HER2, HER3, HER4, o receptor de EGF; LFA-1, Mol, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM, alfa v/beta 3 integrina; fator de crescimento endotelial vascular ("VEGF"); hormônio do crescimento, hormônio estimulador da tireóide, hormônio folículo estimulante, hormônio luteinizante, fator liberador do hormônio do crescimento, hormônio da para-tireóide, substância inibidora de mullerian, proteína inflamatória de macrófagos humanos (MIP-1-alfa), eritopoietina
20 (EPO), NGFbeta, fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), aFGF, bFGF, fator de crescimento epidérmico (EGF), TGF-alfa, TGF-beta1, TGF-beta2, TGF-beta3, TGF-beta4, TGF-beta5, IGF-I, IGF-II, des(1-3)-IGF-I (IGF-I de cérebro), insulina, cadeia A de insulina, cadeia B de insulina,

proinsulina, proteínas de ligação de fator de crescimento similar a insulina, como, entre outros, fator VIII, fator tecidual, fator de von Willebrands, proteína C, alfa-1-antitripsina, ativadores de plasminogênio, como uroquinase e ativador de plasminogênio tecidual ("t-PA"), bombazina, trombina, e trombopoietina; M-CSF, GM-CSF, G-CSF, albumina, IgE, receptor de flk2/flt3, receptor de obesidade (OB), fator neurotrófico derivado de ossos (BDNF), NT-3, NT4, NT-5, NT-6); cadeia A de relaxina, cadeia B de relaxina, pro-relaxina; interferon-alfa, -beta, e -gama; de IL-1 a IL-10; antígeno viral de envelope da AIDS; calcitonina, glucagon, fator natriurético atrial, tensoativo pulmonar, fator de necrose tumoral -alfa e -beta, encefalinase, RANTES, peptídeo associado a gonadotropina de camundongo, Dnase, inibina, e activina; proteína A ou D, proteína morfogenética dos ossos (BMP), superóxido dismutase, fator acelerador de degradação (DAF).

20. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 16, caracterizada pelo fato de que a proteína é selecionada do grupo que consiste em: Actimune (Interferon gama-1b), Activase (Alteplase), Aldurazme (Laronidase), Amevive (Alefacept), Avonex (Interferon beta-1a), BeneFIX (Nonacog alfa), Beromun (Tasonermina), Beatseron (Interferon-beta-1b), BEXXAR (Tositumomab), Tev-Tropina (Somatropina), Bioclone ou RECOMBINATE (Recombinante), CERZME (Imiglucerase), ENBREL (Etanercept), Eprex (epoetina alfa), EPOGEN/Procit (Epoetina alfa), FABRAZYME (Agalsidase beta), Fasturtec/Elitek ELITEK (Rasburicase), FORTEO (Teriparatide), GENOTROPIN (Somatropina), GlucaGen (Glucagon), Glucagon (Glucagon, de origem de rDNA), GONAL-F (follitropina alfa), KOGENATE FS (Octocog alfa), HERCEPTIN (Trastuzumab), HUMATROPE (SOMATROPINA), HUMIRA (Adalimumab), insulina em solução, INFERGEN® (Interferon alfacon-1), KINERET® (anakinra), Kogenate FS

(fator anti-hemofílico), LEUKIN (SARGRAMOSTIM fator estimulador de colônias de macrófagos/granulócitos humanos recombinantes (rhuGM-CSF)), CAMPATH (Alemtuzumab), RITUXAN® (Rituximab), TNKase (Tenecteplase), MYLOTARG (gemtuzumab ozogamicina), NATRECOR (nesiritida), ARANESP (darbepoetina alfa), NEULASTA (pegfilgrastima), NEUMEGA (oprelvecina), NEUPOGEN (Filgrastima), CARTUCHOS NORDITROPINA (Somatropina), NOVOSEVEN (Eptacog alfa), NUTROPINA AQ (somatropina), Oncaspar (pegaspargase), ONTAK (denileucina difitox), ORTHOCLONE OKT (muromonab-CD3), OVIDREL (coriogonadotropina alfa), PEGASYS (peginterferon alfa-2a), PROLEUKIN (Aldesleucina), PULMOZYME (dornase alfa), Retavase (Reteplase), REBETRON terapia de combinação contendo REBETOL® (Ribavirina) e INTRON® A (Interferon alfa-2b), REBIF (interferon beta-1a), REFACTO (fator anti-hemofílico), REFLUDAN (lepirudina), REMICADE (infliximab), REOPRO (abciximab) ROFERON®-A (Interferon alfa-2a), SIMULECT (baasiliximab), SOMAVERT (Pegivisomant), SYNAGIS® (palivizumab), Stemben (Ancestim, fator de células-tronco), THYROGEN, INTRON® A (Interferon alfa-2b), PEG-INTRON® (Peginterferon alfa-2b), XIGRIS® (Drotrecogina alfa ativada), XOLAIR® (Omalizumab), ZENAPAX® (daclizumab), e ZEVALIN® (Ibritumomab Tiuxetano).

21. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 20, caracterizada pelo fato de que a proteína é Ab-hOPGL ou um fragmento da mesma, ou uma variante ou derivado de Ab-hOPGL ou de um fragmento do mesmo, ou uma proteína relacionada com Ab-hOPGL ou fragmento da mesma, ou uma modificação de qualquer um dos mesmos.

22. Composição de acordo com a reivindicação 21, caracterizada pelo fato de que a proteína é Ab-hOPGL.

23. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 20, caracterizada pelo fato de que a proteína é Ab-hIL4R ou um fragmento da mesma, ou uma variante ou derivado de Ab-hIL4R ou de um fragmento do mesmo, ou uma proteína relacionada com Ab-hIL4R ou fragmento do mesmo, ou uma modificação de qualquer um dos mesmos.

24. Composição de acordo com qualquer a reivindicação 23, caracterizada pelo fato de que a proteína é Ab-hIL4R.

25. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 2 a 20, caracterizada pelo fato de que a proteína é Ab-hIL4R ou um fragmento da mesma, ou uma variante ou derivado de Ab-hB7RP1 ou de um fragmento do mesmo, ou uma proteína relacionada com Ab-hB7RP1 ou fragmento da mesma, ou uma modificação de qualquer um destes.

26. Composição de acordo com a reivindicação 25, caracterizada pelo fato de que a proteína é Ab-hB7RP1.

27. Liofilizado, caracterizado pelo fato de que, após reconstituição, proporciona uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações precedentes.

28. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende, em um ou mais recipientes, uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações de 1 a 27 e instruções relativas ao uso dos mesmos, ou um liofilizado como definido na reivindicação 27, e instruções relativas ao uso do mesmo.

29. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações de 1 a 27, caracterizada pelo fato de ser para uso em medicina.

30. Processo para preparar uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 27, caracterizado pelo fato de que

compreende remoção de tampão residual usando-se um contra-íon, ou por diafiltração contra uma solução isenta de tampão apresentando um pH abaixo do pH desejado.

5 31. Processo para preparar uma composição de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que compreende remoção de tampão residual usando-se qualquer um ou mais dos seguintes na presença de um contra-íon: cromatografia de exclusão de tamanho, diálise, e/ou filtração de fluxo tangencial, e ou cromatografia de troca iônica.

10 32. Processo para preparar uma composição de acordo com a reivindicação 30, caracterizado pelo fato de que, após diafiltração, o pH é ajustado a um pH desejado por meio de adição de ácido diluído e/ou base diluída.

Figura 1. Capacidade tamponadora do acetato na faixa de pH de 4,0 a 5,0

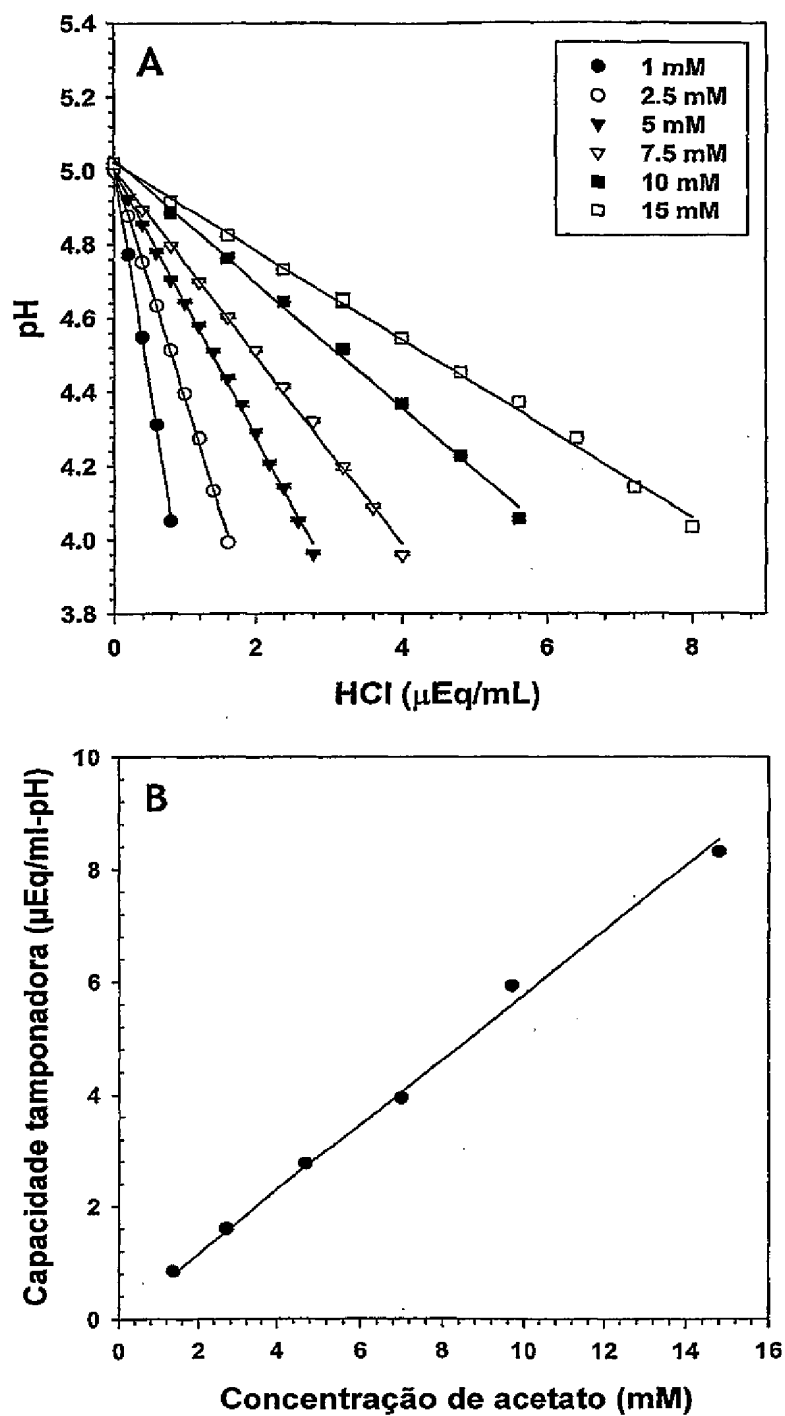


Figura 2. Capacidade tamponadora do acetato na faixa de pH de 5,0 a 5,5

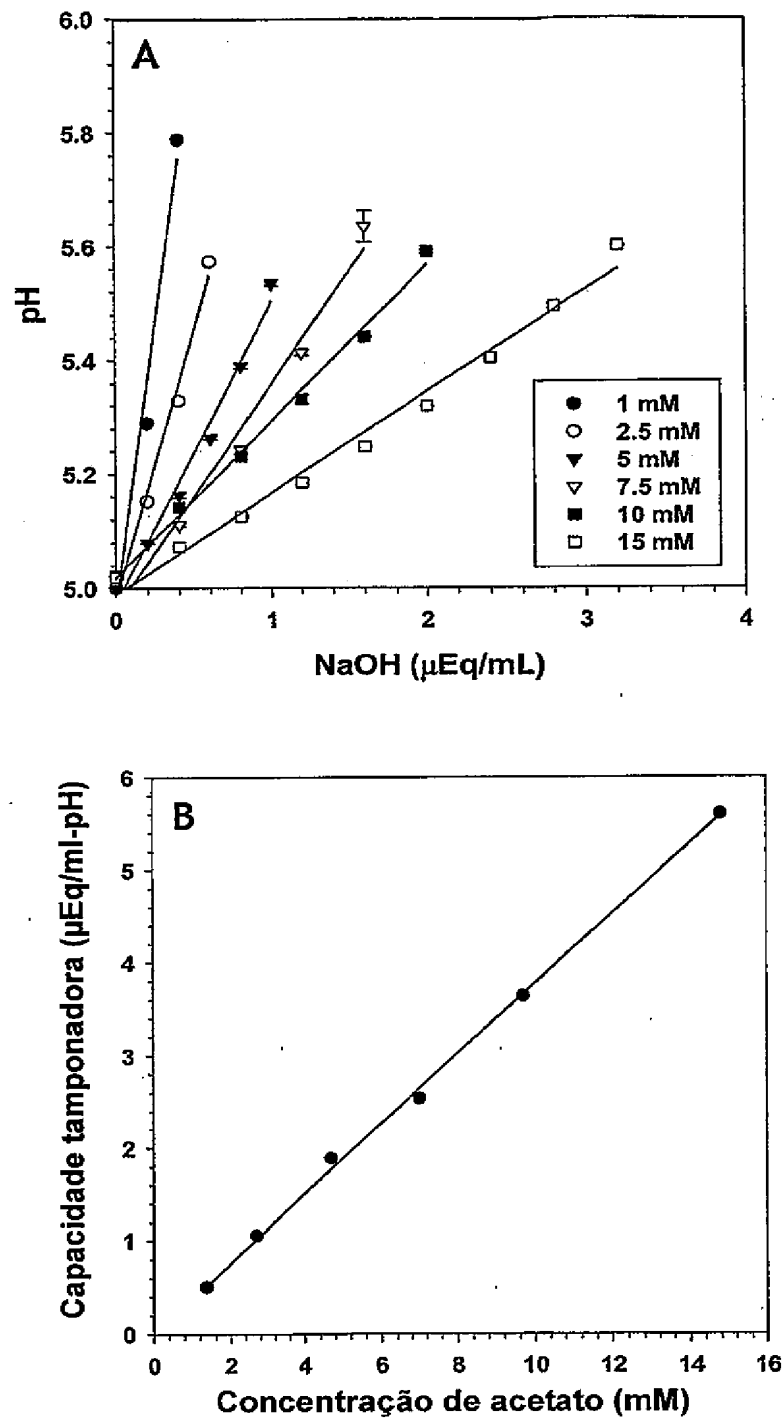
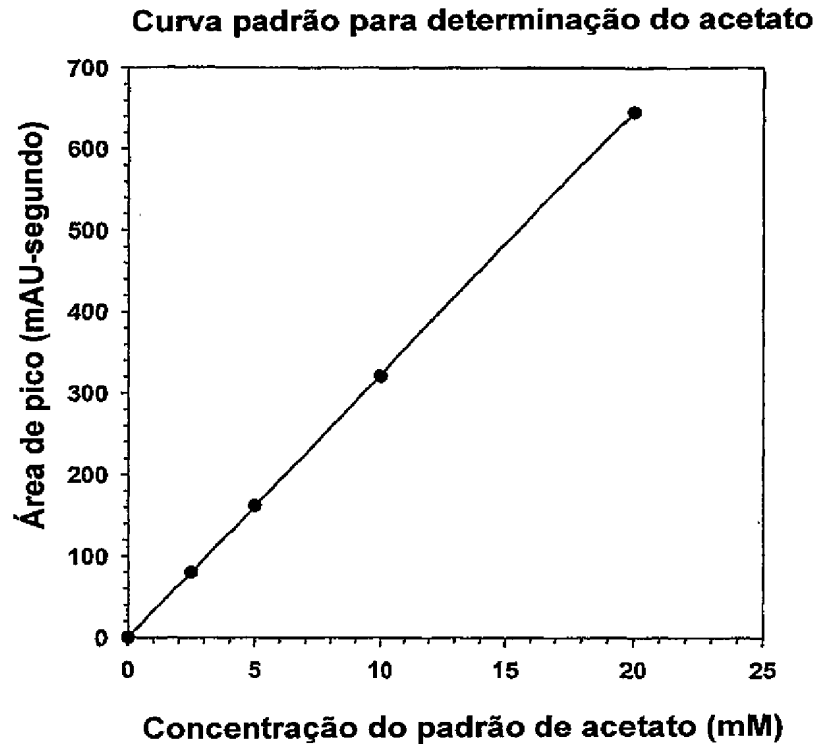


Figura 3. Determinação da concentração de acetato em padrões de acetato usados para medições da capacidade tamponadora



Valores de acetato determinados experimentalmente de soluções usadas para determinar a capacidade tamponadora do acetato

Concentração de acetato (mM)	
Nominal	Experimental
1	1.37
2.5	2.7
5	4.7
7.5	7.0
10	9.7
15	14.8

Figura 4. Titulação de ácido de soluções de Ab-hOPGL

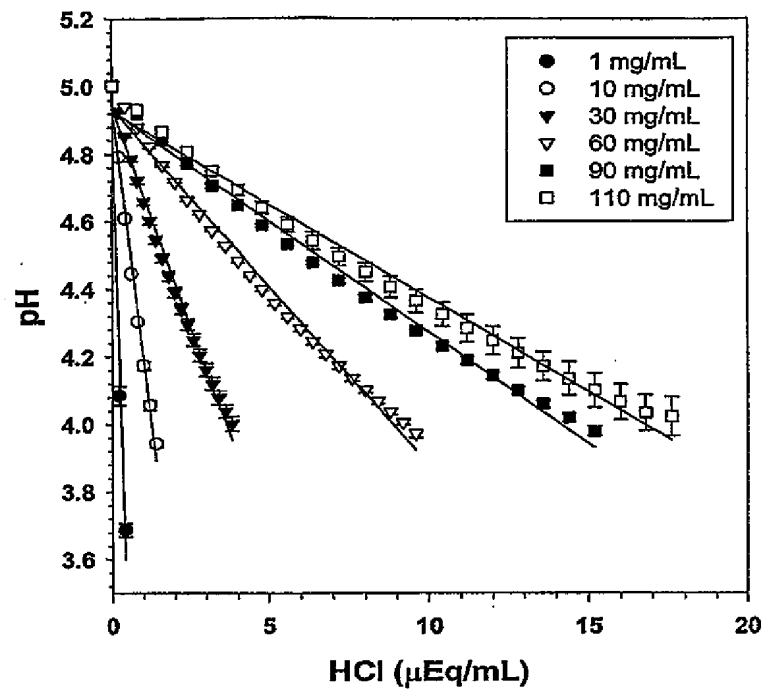


Figura 5. Titulação de base de soluções de Ab-hOPGL

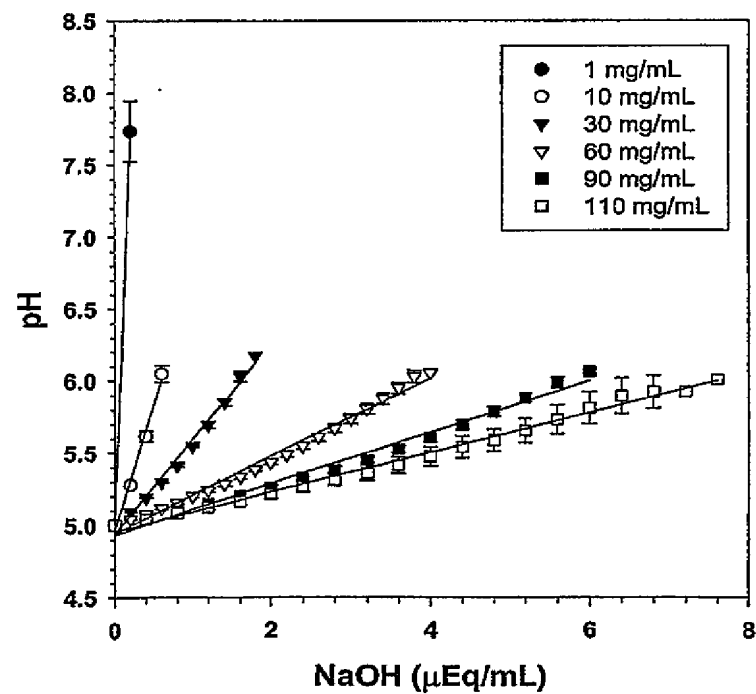
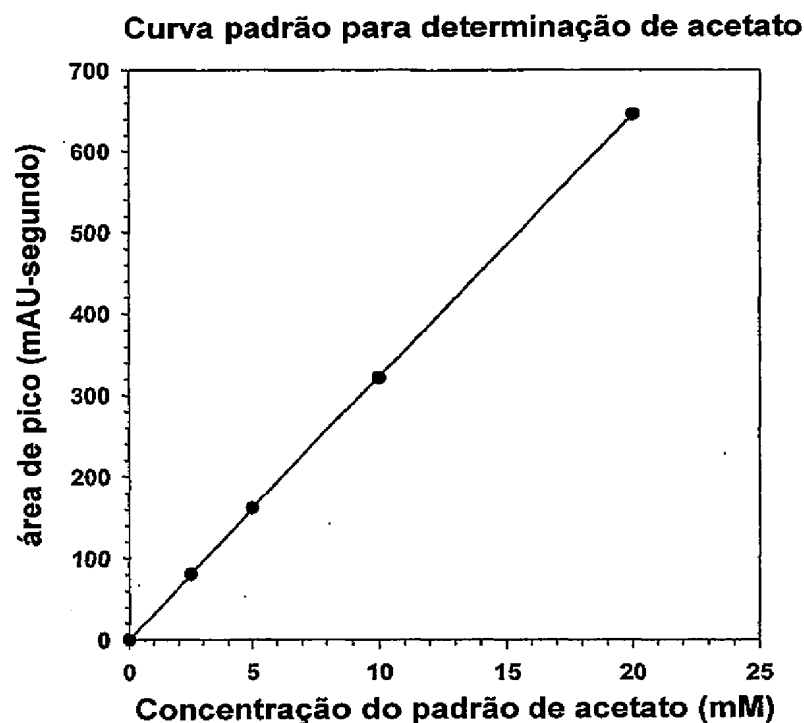


Figura 6. Determinação de níveis de acetato residuais em soluções de Ab-hOPGL para medições da capacidade tamponadora



Níveis de acetato residuais em soluções de Ab-hOPGL usadas para determinar a capacidade tamponadora

Concentração de acetato	
Nominal	Experimental
1	0.05
10	0.20
30	0.51
60	1.16
90	1.71
110	1.82

Figura 7. Capacidade tamponadora de Ab-hOPGL +/- acetato residual como uma função de sua concentração na faixa de pH de 4,0 a pH 5,0

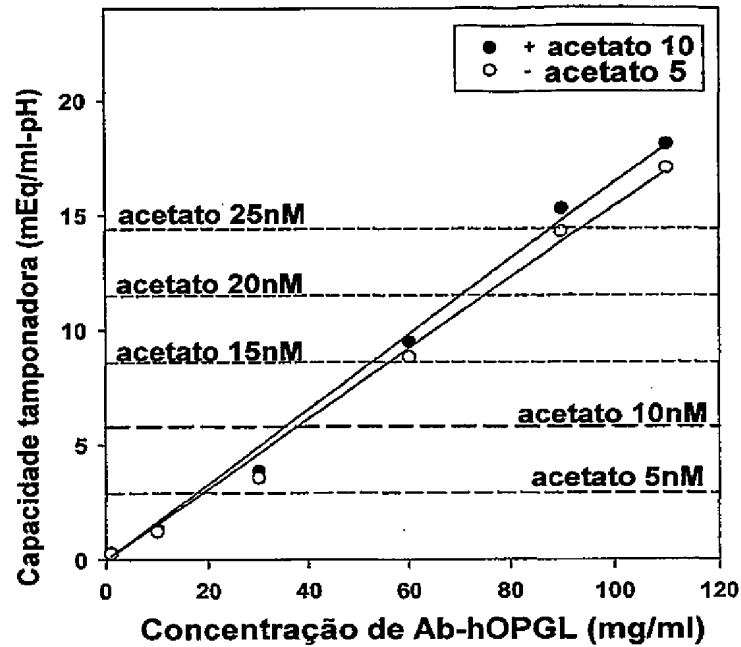


Figura 8. Capacidade tamponadora de Ab-hOPGL +/- acetato residual como uma função de sua concentração na faixa de pH de 5,0 a pH 6,0

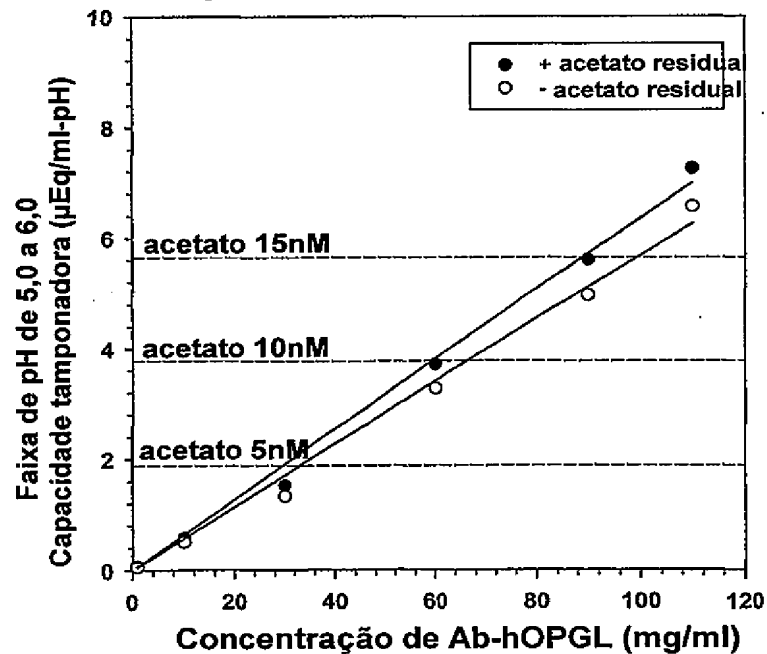


Figura 9. Estabilidade da formulação de Ab-hOPGL, 60 mg/ml, auto-tamponada, comparada com formulações tamponadas convencionalmente a 4°C

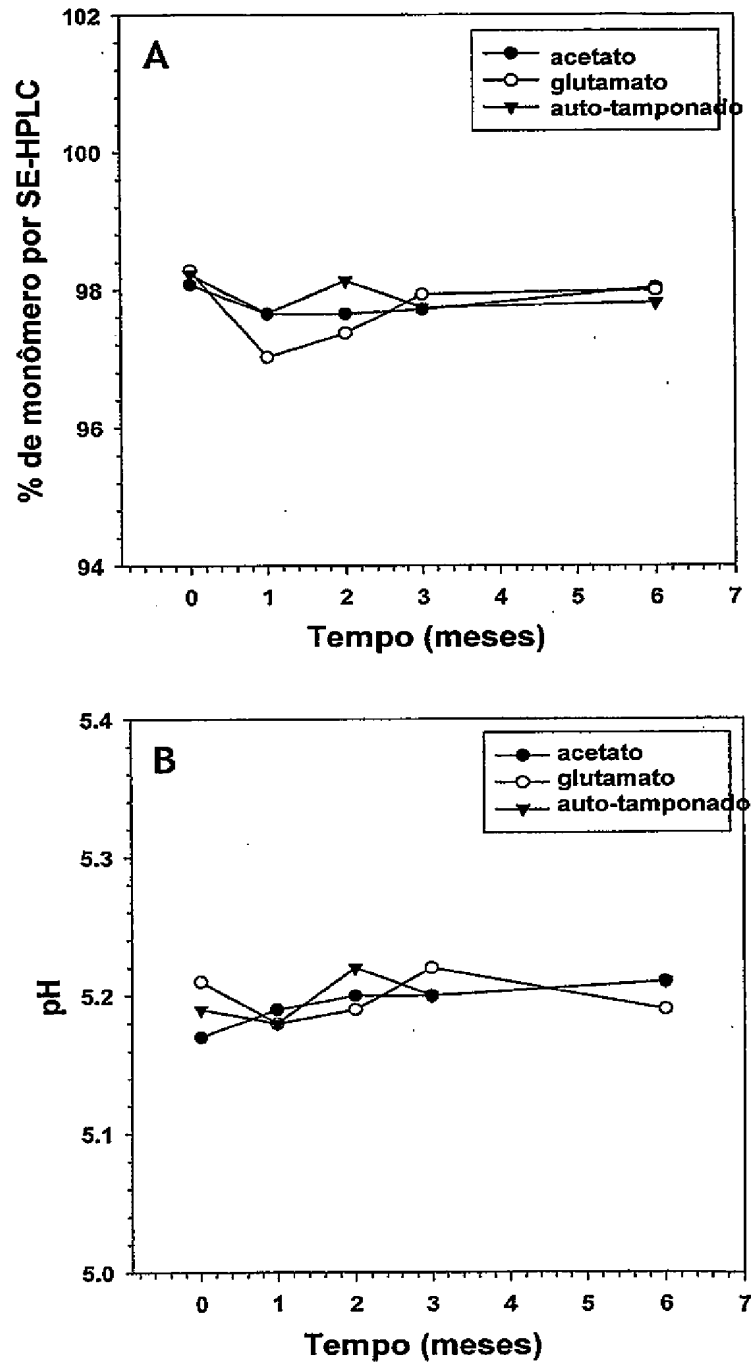


Figura 10. Capacidade tamponadora de soluções de Ab-hB7RP1 na faixa de pH 4,0 a 5,0

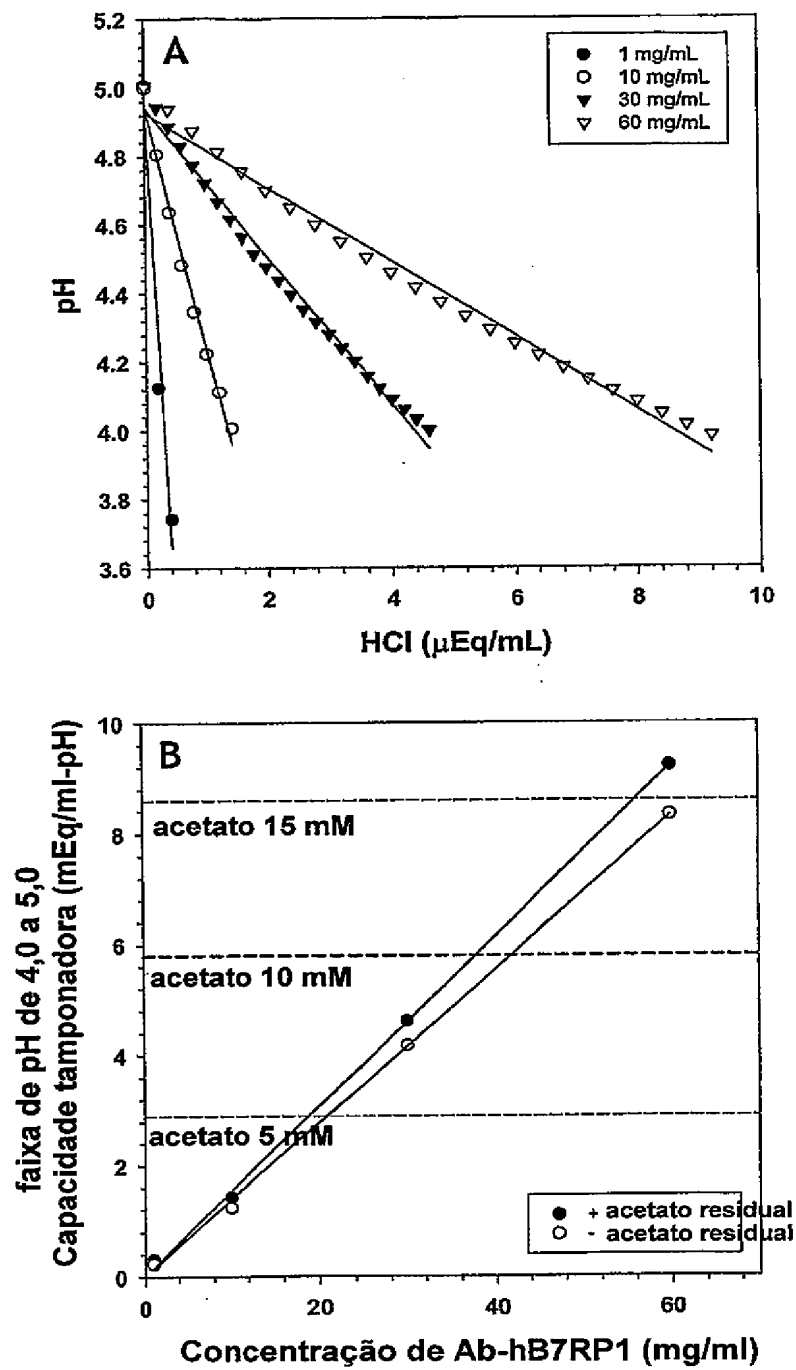


Figura 11. Capacidade tamponadora de soluções de Ab-hB7RP1 na faixa de pH de 5,0 a 6,0

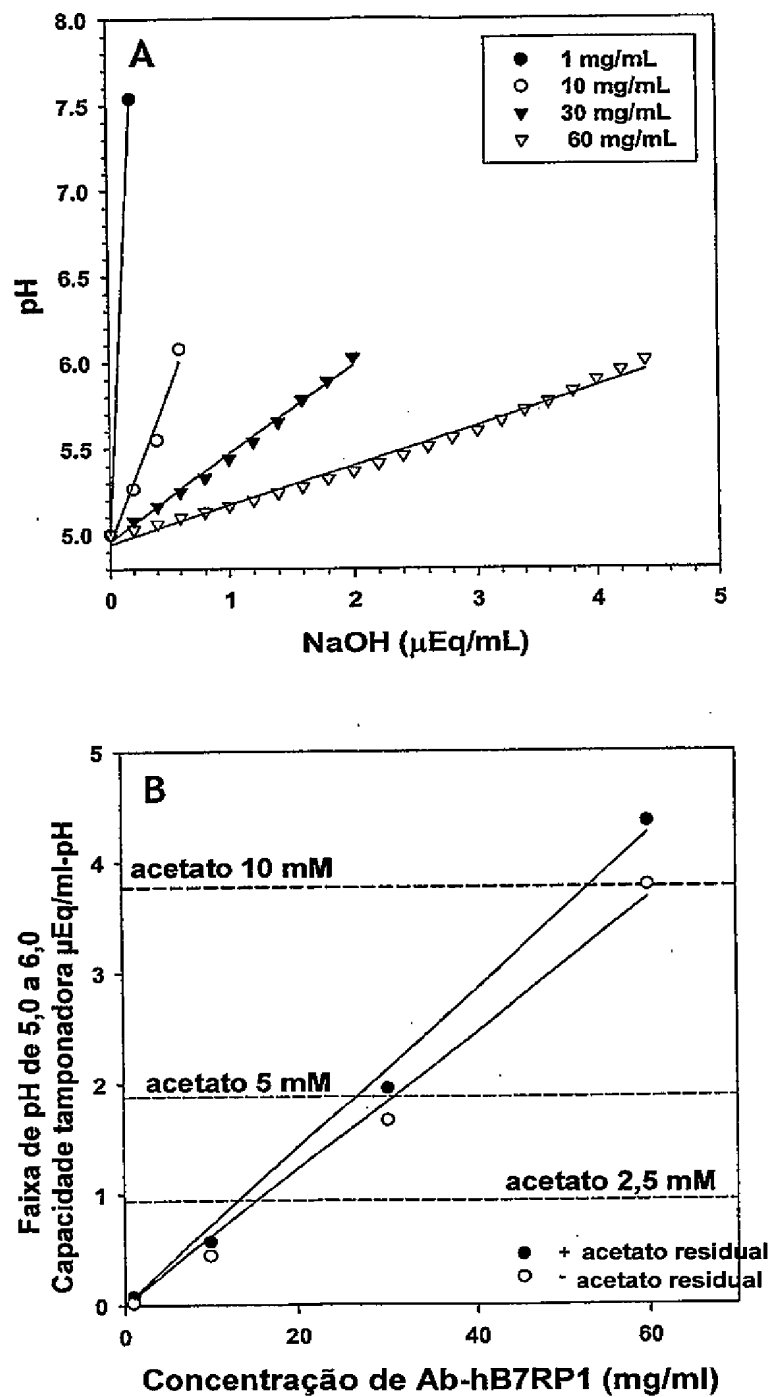


Figura 12. Estabilidade da formulação de Ab-hB7RP1, 60 mg/ml, auto-tamponada em comparação com formulações tamponadas convencionalmente

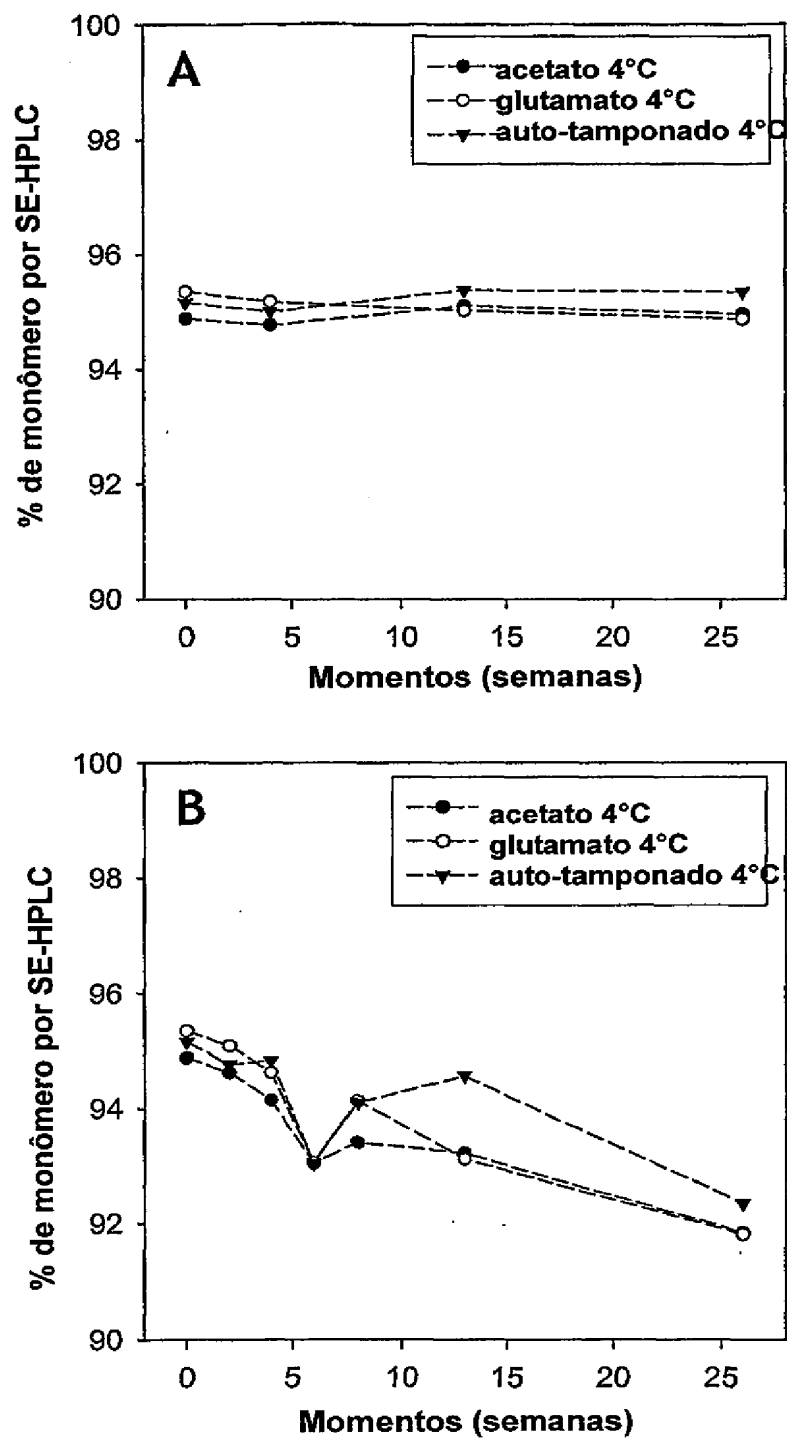


Figura 13. Controle do pH da formulação de Ab-hB7RP1, 60 mg/ml), auto-tamponada

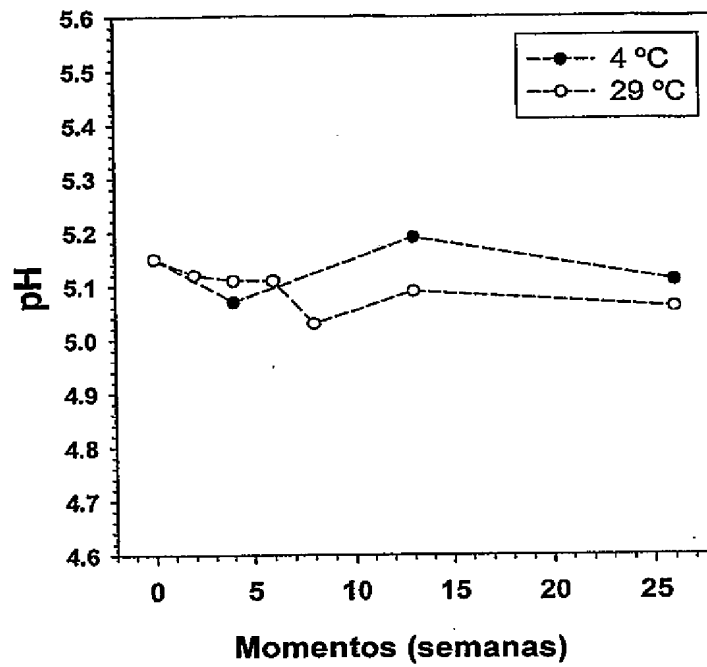


Figura 14. Capacidade tamponadora de soluções de Ab-hCD22 na faixa de pH de 4,0 a 6,0

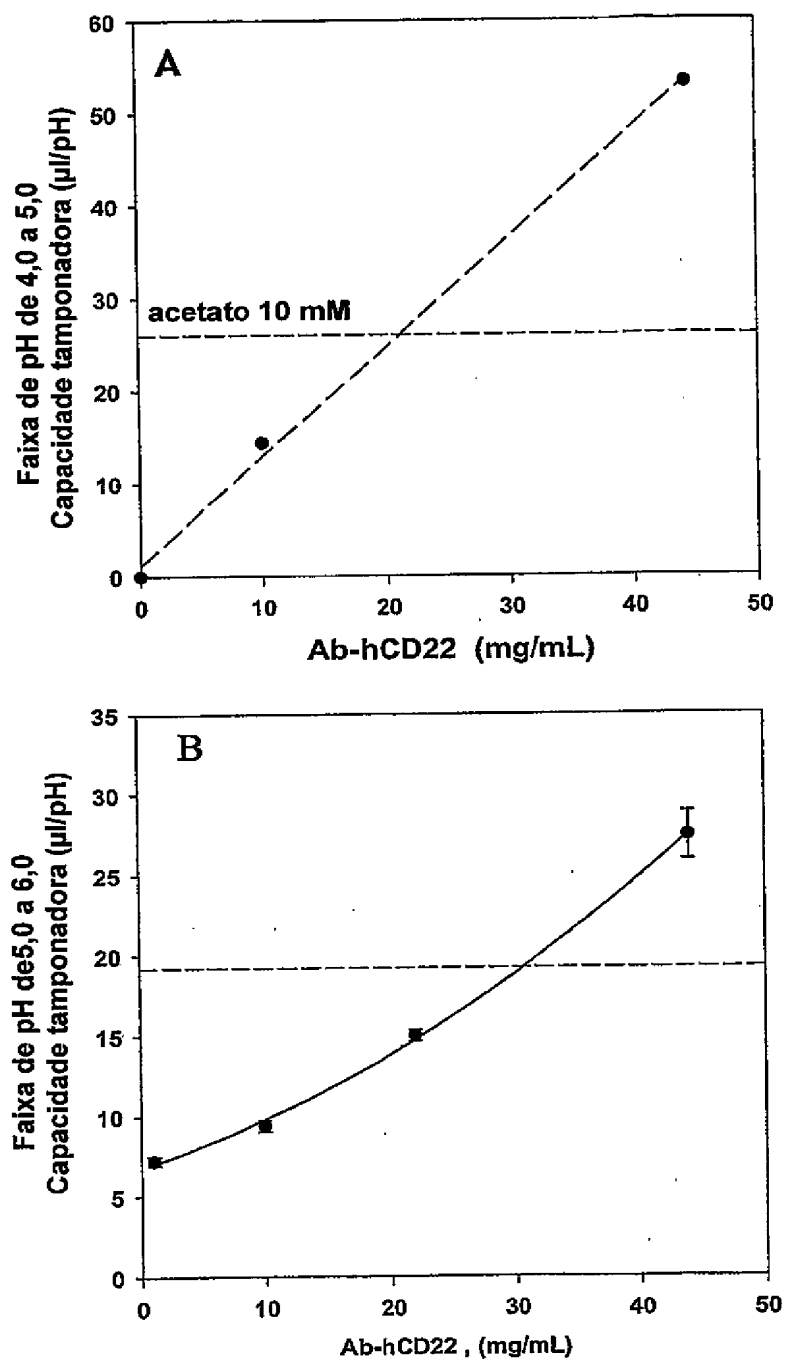


Figura 15. Capacidade tamponadora de soluções de AB-hIL4R na faixa de pH de 4,0 a 5,0

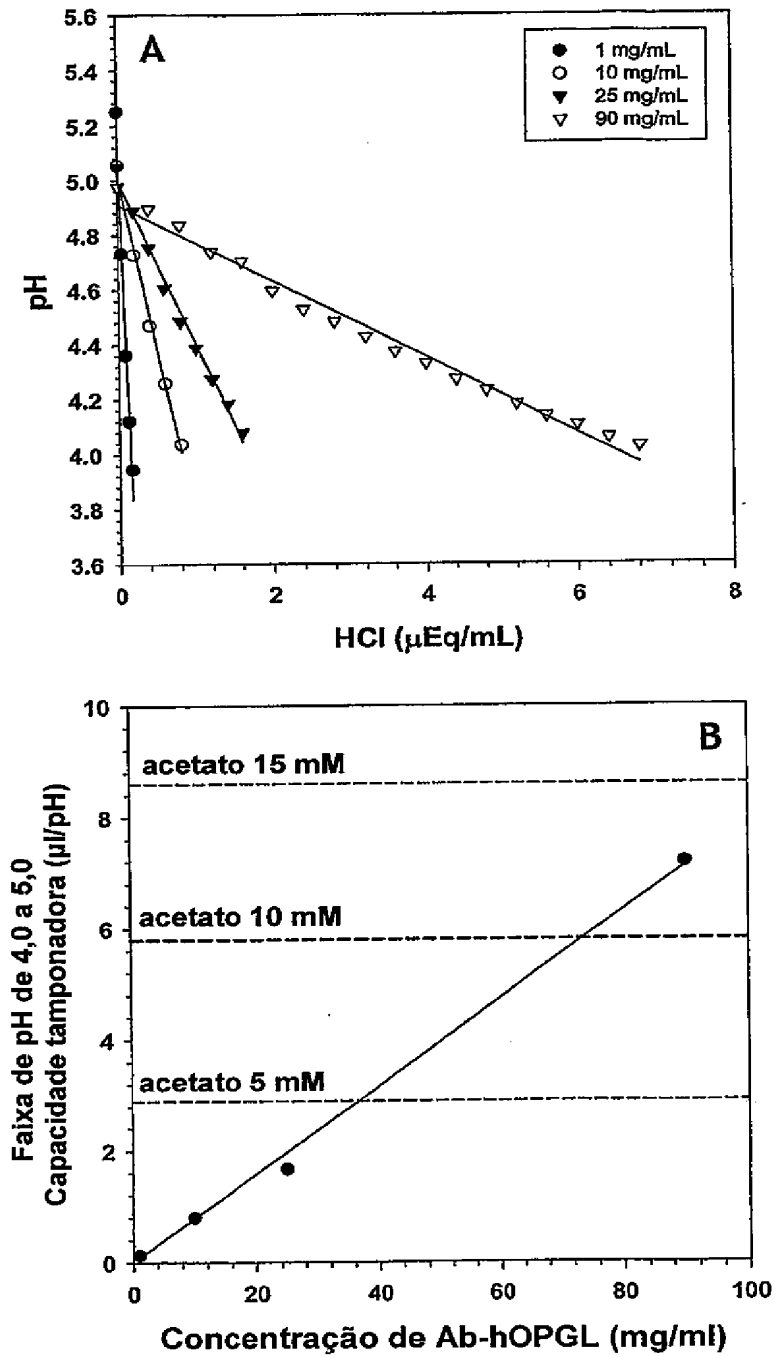


Figura 16. Capacidade tamponadora de soluções de Ab-hIL4R na faixa de 5,0 a 6,0

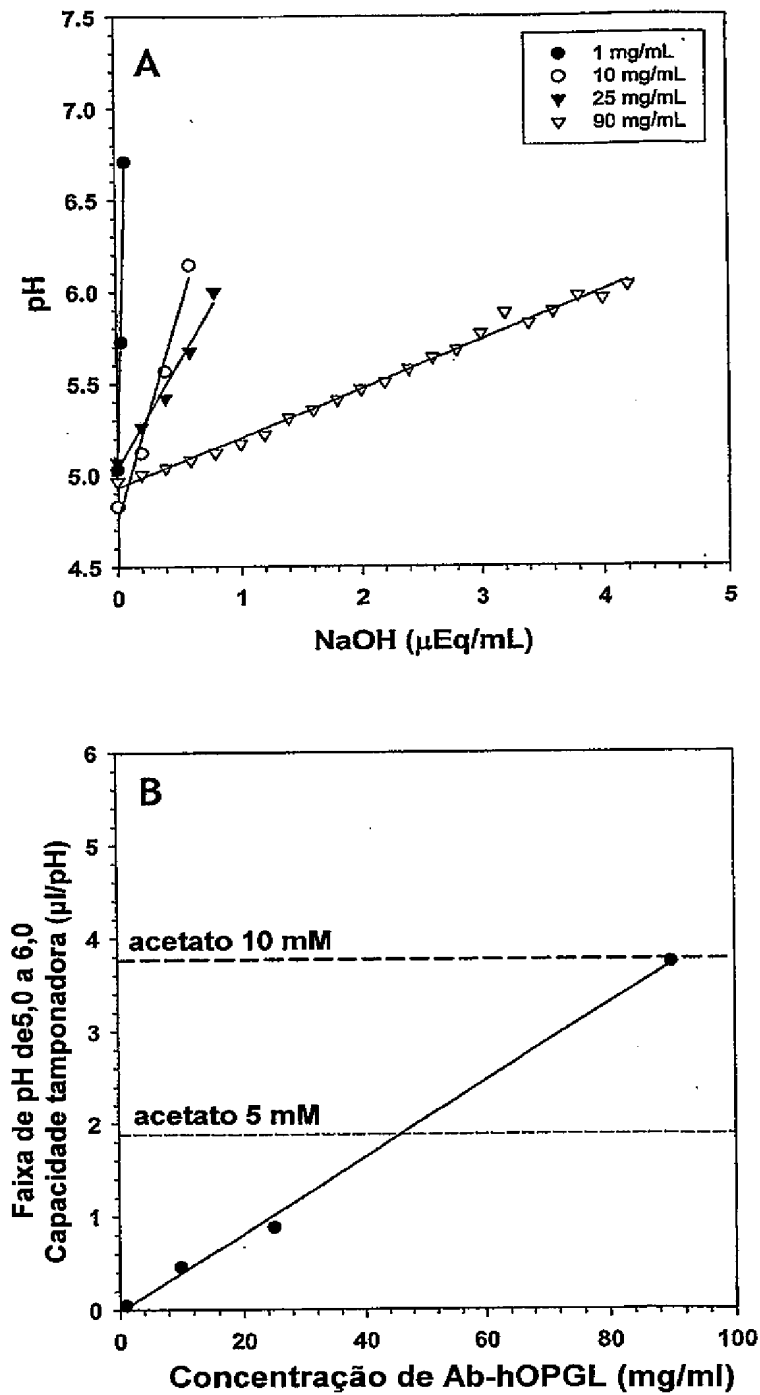
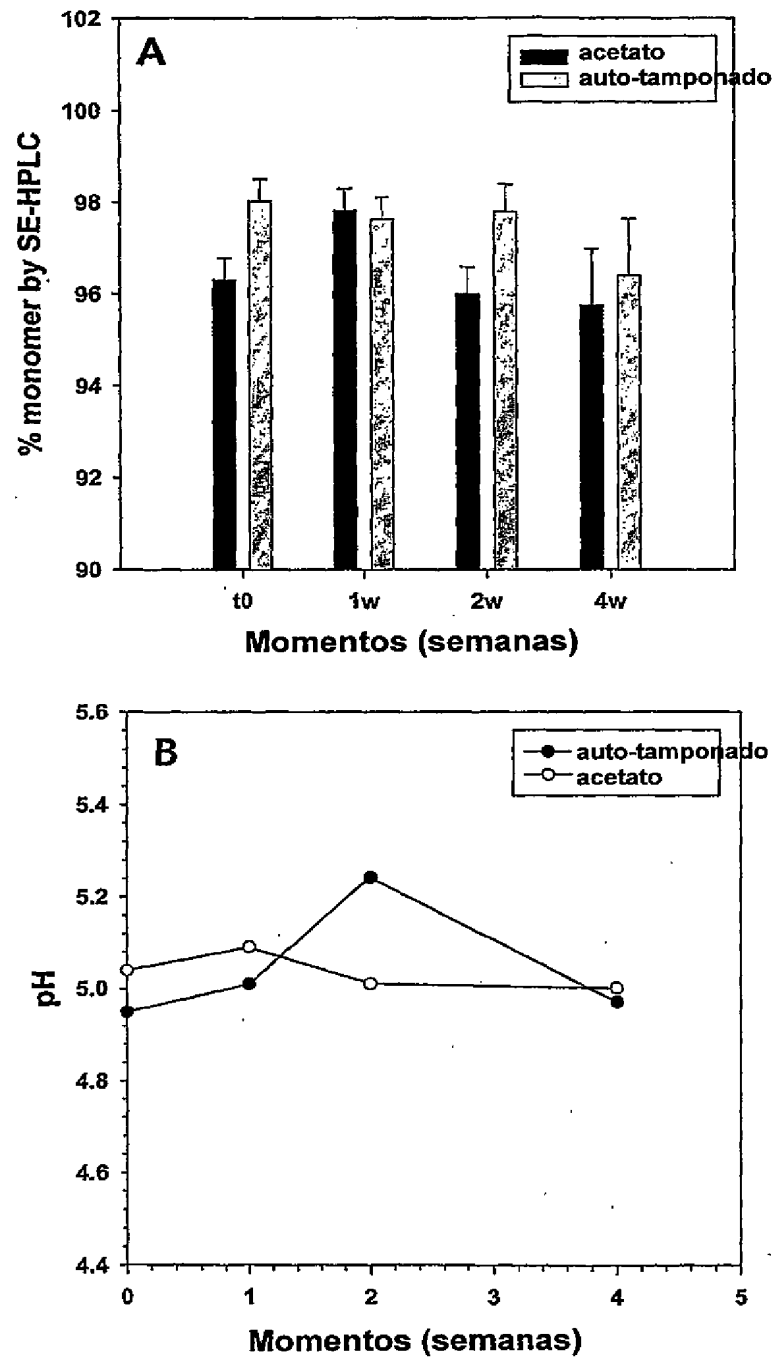


Figura 17. Controle de pH e estabilidade acelerada da formulação de Ab-hIL4R, 70 mg/ml, auto-tamponada, em comparação com a formulação tamponada com acetato a 37°C



RESUMO

“COMPOSIÇÃO, LIOFILIZADO, KIT, E PROCESSO PARA PREPARAR UMA COMPOSIÇÃO”

A invenção aqui descrita proporciona, entre outras coisas, 5 formulações de proteína auto-tamponadoras. Particularmente, a invenção proporciona formulações de proteína farmacêuticas auto-tamponadoras que são vantajosas para uso médico veterinário e humano. As formulações de proteína auto-tamponadoras são substancialmente isentas de agentes tamponadores diferentes, conservam de forma estável o pH durante os 10 períodos estendidos envolvidos na distribuição e no armazenamento de proteínas farmacêuticas para uso veterinário e médico humano. A invenção proporciona adicionalmente métodos para projetar, preparar, e usar a formulação. Adicionalmente a outras vantagens, as formulações evitam as desvantagens associadas com os agentes tamponadores usados 15 convencionalmente em formulações correntes de proteínas para uso farmacêutico. Nestes e outros aspectos a invenção pode ser aplicada produtivamente a uma ampla variedade de proteínas e é particularmente útil para se preparar e usar formulações auto-tamponadoras de proteínas farmacêuticas para uso veterinário e médico, particularmente para o 20 tratamento de doenças em indivíduos humanos.