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

(21) **PI0613653-2 A2**

BRPI0613653A2

(22) Data de Depósito: 24/07/2006
(43) Data da Publicação: 25/01/2011
(RPI 2090)

(51) Int.Cl.:
C07K 14/705
C07K 16/18

(54) Título: **COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DESAGREGAÇÃO DE PROTEÍNA**

(30) Prioridade Unionista: 25/07/2005 US 60/702.545

(73) Titular(es): TRUBION PHARMACEUTICALS, INC

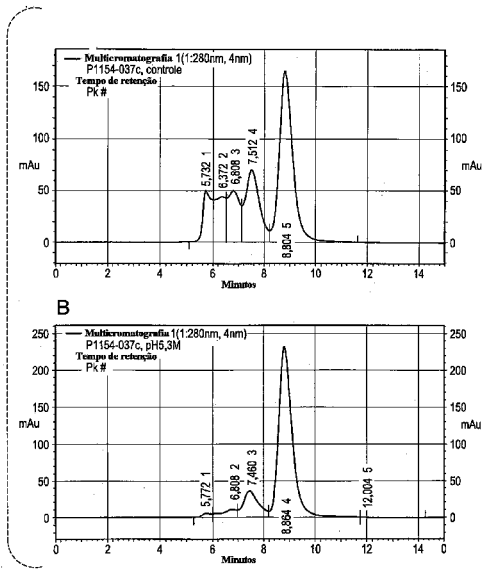
(72) Inventor(es): ARTHUR JAMES MOVIUS IV, RAJESH DUA

(74) Procurador(es): NELLIE ANNE DANIEL SHORES

(86) Pedido Internacional: PCT US2006028706 de 24/07/2006

(87) Publicação Internacional: WO 2007/014170de 01/02/2007

(57) Resumo: COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DESAGREGAÇÃO DE PROTEÍNA Composições e métodos são providos para obtenção da desagregação das proteínas de ligação incluindo, porém não limitado aos ligantes de proteína, receptores solúveis anticorpos, fragmentos de anticorpos, anticorpos de cadeia simples de fragmento variável (scFv), e produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos (produtos SMIPTM) As composições, que são apropriadas para a desagregação de soluções altamente concentradas de proteínas de ligação, contêm um ou mais caótropos, são tipícamente formuladas em um pH ácido e podem ser usadas para prover proteínas de ligação apropriadas para a preparação de composições farmacêuticas e administração in vivo a um paciente.



PI0613653-2

"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DESAGREGAÇÃO DE PROTEÍNA"

CAMPO TÉCNICO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere aos campos da química da proteína e tecnologia de DNA recombinante. Mais especificamente, a presente invenção provê composições e métodos para obtenção da desagregação das proteínas de ligação incluindo, porém não limitado aos ligantes de proteína, receptores solúveis, anticorpos, fragmentos de anticorpo, anticorpos de cadeia simples de fragmento variável (scFv) e produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos (produtos SMIP™).

HISTÓRICO DA INVENÇÃO

Metodologias de DNA recombinante permitem a produção em grande escala de proteínas construídas geneticamente. Tais metodologias para produção de proteínas recombinantes são bem conhecidas na arte. Tipicamente, um segmento de DNA codificando uma proteína específica é inserido no microorganismo hospedeiro e o microorganismo transformado cresce sob condições que induzem a expressão heteróloga da proteína.

De modo geral, contudo, as proteínas heterólogas expressas nas bactérias, tipicamente E.coli, não são biologicamente ativas porque elas não se multiplicam na estrutura terciária apropriada, ao invés disso, formam agregados grandes de proteína inativa referidos como corpos de inclusão. Os corpos de inclusão também podem ser causados pela formação de ligações de dissulfeto intermoleculares covalentes que ligam várias moléculas de proteína para formar complexos

insolúveis. As etapas devem ser realizadas para desnaturar e redobrar as proteínas para restaurar a atividade biológica.

Além da expressão nos microorganismos, existem também metodologias para expressão de proteínas recombinantes nas células eucarióticas, incluindo levedura, células de insetos e uma grande variedade de células de mamíferos. Independente das células usadas para expressão gênica, contudo, as proteínas recombinantes sintetizadas devem ser envolvidas e conjugar em uma estrutura terciária, a fim de possuir atividade biológica.

É bem entendido que uma família de proteínas referidas como proteínas auxiliares de dobramento moleculares são necessárias para mediar o processo de dobramento. Na ausência da proteína auxiliar de dobramento molecular apropriada, proteínas recombinantes expressas recentemente se agregam, pelo que, prevenindo a formação de proteínas funcionais. Goloubinoff e outros, Nature 342:884-889 (1989) e Welch, Scientific American 56-64 (Maio de 1993). A despeito da existência das proteínas auxiliares de dobramento, a agregação da proteína ainda ocorre in vivo e pode, de fato, contribuir para ou causar vários estados de doença, tais como, síndrome de Down, doença de Alzheimer, diabetes e cataratas. De Young e outros., Accounts of Chemical Research 26:614-620 (1993); Wetzel, TIBTECH 12:193-198 (1994); e Haass and Selkoe, Cell 75:1039-1042 (1993).

Uma ampla faixa de proteínas recombinantes incluindo enzimas e proteínas de ligação, tais como, anticorpos, fragmentos de anticorpos, scFv e produtos de SMIP™ são sus-

cetíveis a perda da atividade e/ou à formação de agregados solúveis ou insolúveis, tais como, trímeros e polímeros superiores, nas soluções aquosas, quando armazenados em temperaturas baixas (isto é, abaixo de 0°C), e quanto submetidos a ciclos repetidos de congelamento e descongelamento. A agregação da proteína é de importância maior para a indústria de biotecnologia, em razão da importância da produção in vitro de proteínas recombinantes. As proteínas na solução, mesmo as proteínas altamente purificadas, podem formar agregados no armazenamento, ou durante os processos de produção. A agregação in vitro limita a estabilidade da proteína, solubilidade e rendimento de produção das proteínas recombinantes. De Young e outros, Accounts of Chemical Research 26:614-620 (1993); Wetzel, TIBTECH 12: 193-198 (1994); e Vandenbroeck e outros, Eur. J. Biochem. 215:481-486 (1993).

Além de contribuir para a perda da atividade biológica, a agregação da proteína pode ser prejudicial aos usos terapêuticos. Em alguns casos, a formação de agregados conduz aos complexos possuindo imunogenicidade aumentada quando administrados in vivo. Assim, a fim de administrar uma solução de proteína recombinante a um paciente, é necessário primeiro remover esses agregados para evitar uma resposta tóxica ao paciente. Consequentemente, a formação de agregados de proteínas recombinantes é inaceitável para a preparação das composições farmacêuticas.

Várias metodologias e aditivos foram descritos na técnica para estabilização das soluções de proteína, pelo

que prevenindo e/ou minimizando a formação dos agregados de proteína. Processos de filtração convencional foram descritos, contudo, agregados, mesmo em concentrações tão baixas quanto 0,1-0,2% - rapidamente entupindo tais filtros e limitando sua utilidade para os processos de fabricação. As metodologias de cromatografia de filtração de gel e cromatografia de exclusão por tamanho são freqüentemente eficazes, porém muito caras e, portanto, impraticáveis.

A estabilização das proteínas por adição de proteínas de choque térmico, tal como, HSP25 é descrita na EP-A0599344. O uso de polímeros de bloco compostos de polióxi-propileno e polióxi-etileno e fosfolipídeos foram descritos para a estabilização de solução de anticorpo. EP-A0318081. A estabilização das imunoglobulinas por adição de um sal de uma substância básica contendo nitrogênio, tal como, arginina, guanina ou imidazol é descrita na EP-A0025275. Outros aditivos para estabilização foram descritos, incluindo poliéteres (EP-A0018609); glicerina, albumina, e sulfato de dextrano (Patente US número 4.808.705); detergentes, tais como, Tween(R)20 (DE 2652636 e GB 8514349); proteínas auxiliares do dobramento, tais como, GroEL (Mendoza, Biotechnol. Tech. 10:535-540- (1991)) e B23 (Patente US número 6.358.718); tampão de citrato (WO 93/22335); e agentes quelantes (WO 91/15509).

As metodologias existentes para obtenção da desagregação de proteína geralmente empregam a etapa de solubilização da proteína em concentrações altas de proteínas auxiliares de dobramento fortes, tais como, 8M cloridrato de

guanidina e/ou uréia, ou agente tensoativo, o que resulta em desdobramento de proteína quase completo. Mitraki e outros, Eur. J. Biochem. 163:29-34 (1987); Vandenbroeck e outros, Eur. J. Biochem. 215:481-486 (1993); DeLoskey e outros, Arch. Biochem. Biophys. 311:72-78 (1994); e Rudolph and Lilie, FASEB J. 10:49-56 (1996). Uma vez solúveis e não dobradas, as proteínas são diluídas em proteínas auxiliares do dobramento adicional e redobradas por remoção da proteína auxiliar do dobramento, por exemplo, por diálise. Tal redobramento das proteínas é imprevisível e dependente de condição. Valax and Georgiou, Biotech. Prog. 9:539-547 (1993). As condições redox, pH, taxas de diálise e concentrações de proteína devem ser empiricamente otimizadas em uma base de proteína-a-proteína. E, a reagregação é geralmente favorecida por redobramento apropriado. Como resultado, os rendimentos aceitáveis da proteína redobrada freqüentemente requerem que a proteína seja redobrada em concentrações muito baixas (por exemplo, 10-100 μg/mL). Rudolph, Modern Methods in Protein and Nucleic Acid Research 149-172 (Tschesche ed., 1990); Goldberg e outros, Biochem. 30:2790-2797 (1991); e Maachupalli-Reddy e outros, Biotech. Prog. 13:144-150 (1997). Uma vez redobrada, a proteína deve, portanto, ser concentrada em 100-1000 vezes para obter uma concentração apropriada para administração in vivo - a um processo que tipicamente resulta na perda substancial da proteína nativa. Adicionalmente, grandes volumes necessários para redrobramento da proteína resultam no desperdício de quantidades substanciais de reagentes caros, tais como, caótropos.

A Patente US número 5.077.392 revela um método para ativação das proteínas recombinantes produzidas nas células procarióticas, onde as proteínas agregadas são dissolvidas em 4-8M cloridrato de guanidina ou 6-10M uréia. As soluções de proteína resultantes são dializadas a um pH entre 1 e 4 antes de serem submetidas a um ambiente não desnaturante e oxidante para permitir redobramento da proteína.

A Patente US número 5.593.865 revela um método para ativar as proteínas eucarióticas contendo ligação de dissulfeto recombinante expressas nas células hospedeiras procarióticas. Os corpos de inclusão são dissolvidos em agentes de redução contendo cloridrato de 6M guanidina. Em uma etapa de redobramento, as proteínas são introduzidas em um ambiente de oxidação e não desnaturação.

A Patente US número 4.659.568 revela um método para solubilização, purificação e caracterizar a proteína dos agregados de proteína insolúveis ou complexos. Os agregados de proteína insolúveis são colocados em cada em um gradiente de etapa de uréia (3 M a 7 M uréia). Conforme as amostras são centrifugadas, os agregados passam através do gradiente até serem dissolvidos.

As Patente US número 5.728.804 revela um método onde proteínas desnaturadas ou agregadas estão suspensas em um meio aquoso isente de detergente contendo cloridrato de 5-7 M de guanidina e submetido a incubação por toda a noite. A amostra suspensa é contatada com ciclodextrina para promover dobramento da proteína.

A Patente US número 4.652.630 revela um método para produzir somatrotropina ativa por solubilização dos agregados ou corpos de inclusão em um caótropo (3 M a 5 M uréia). O pH é ajustado para obter solubilização completa seguido por modificação das condições para permitir oxidação, na presença das concentrações não desnaturantes do caótropo.

A Patente US número 5.064.943 revela um método para solubilização e renaturação sem o uso de um caótropo. Por esse método, o pH é ajustado entre 11,5 e 12,5 e mantido por 5 a 12 horas, pelo que, obtendo solubilização e renaturação de somatotropina.

A Patente US número 5.023.323 revela, um método para desagregação de agregados de somatotropina, onde os agregados são dissolvidos em um caótropo desnaturante (1M a 8M uréia). Seguindo-se a solubilização, a amostra é exposta a um ambiente não desnaturante, oxidante.

A Patente US número 5.109.117 revela um método para desagregação de agregados de somatotropina por dissolução na presença de um álcool orgânico e caótropo (1M a 8M uréia), seguido por renaturação da proteína solubilizada em um ambiente não desnaturante, oxidante.

A Patente US número 5.714.371 revela um método para redobramento dos agregados de vírus da hepatite C protease, por solubilização em cloridrato de 5M guanidina. Um agente de redução é adicionado à solução e o pH ajustado para um pH ácido. O agente desnaturante é removido por diálise e o pH elevado.

A Patente US número 4.923.967 revela um método para desagregação de interleucina-2 humana (IL-2) onde os agregados da proteína são dissolvidos em 4-8 M cloridrato de guanidina com um agente de sulfitolização. O agente de sulfitolização é subseqüentemente removido pela troca do solvente e a temperatura é elevada para precipitar IL-2 pura. A proteína é redobrada por dissolução do precipitado de cloridrato de guanidina mais um agente de redução, seguido por diluição para permitir redobramento da proteína.

Patente US número 5.410.026 revela um método para redobrar fator-1 de crescimento semelhante à insulina (IGF-1), não dobrado, insolúvel, em uma conformação ativa. A proteína isolada é incubada com 1-3 M uréia ou 1 M cloridrato de guanidina até os agregados serem solubilizados e redobrados.

Anticorpos de cadeia simples de fragmento variável (scFv) são proteínas propensas à agregação possuindo aplicações em diagnóstico de medicinas terapêuticas importantes incluindo imageamento de tumor e liberação de medicamento alvejado. Embora tais sistemas de expressão complexos tenham sido desenvolvidos os quais fornecem scFv solúvel e funcional, o rendimento e a concentração obtidos são freqüentemente inferiores aos desejados. A expressão bacteriana afunila grandes quantidades de scFv nos corpos de inclusão, prevenindo o scFv de dobrar na forma ativa. Métodos para recuperar scFv funcional dos corpos de inclusão sofrem de desvantagens, tais como, formação de agregado e necessidade de u-

tilização de grandes quantidades de desnaturantes, tais como, cloridrato de guanidina.

As similaridades estruturais do scFv com as proteínas implicadas nas doenças humanas acionadas por agregação e a necessidade de um método de recuperação isento de agregado, barato, rápido e altamente eficaz para scFv de sistemas bacterianos garantem pesquisa no comportamento de agregação dessas proteínas. A incapacidade das técnicas químicas correntes de impedir suficientemente a agregação focou atenção nos tratamentos físicos que apresentam uma promessa de reversão da agregação. Estudos anteriores mostraram que os agregados de proteínas multiméricas se rompem e subseqüentemente reconquistam atividade seguindo exposição à pressão alta. Tratamentos de alta pressão, em conjunto com métodos químicos atuais podem prover a solução para o problema de agregação na produção de scFv.

Produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos (produtos SMIP™) são uma classe de composto à base de anticorpo, altamente modular, possuindo propriedades de medicamento melhoradas em relação aos anticorpos monoclonais e recombinantes. Os produtos SMIP™ compreendem uma cadeia de polipeptídeo simples incluindo um domínio de ligação especifico para alvo, com base, por exemplo, em um domínio variável de anticorpo, em combinação com uma região FC variável, que permite recrutamento específico de uma classe desejada de células efetoras (tais como, por exemplo, macrófagos e células exterminadoras naturais (NK)) e/ou recrutamento de morte mediado por complemento. Dependendo da escolha das regiões

alvo e de impedimento, produtos SMIP™ podem sinalizar ou bloquear a sinalização através dos receptores de superfície da célula.

De modo semelhante ao scFv, produtos SMIP™ são altamente suscetíveis à formação de agregados de proteína mediante expressão in vitro em uma célula hospedeira heteróloga. Estudos preliminares com relação à desagregação dos produtos SMIP™ demonstraram que altas concentrações de uréia (por exemplo, 6M) em pH neutro (isto é, salmoura tamponada de fosfato, pH 7,0) são eficazes na desagregação de produtos SMIP™ nas soluções compreendendo concentrações baixas de proteína (isto é, inferior a 1 mg/mL). Infelizmente, contudo, as concentrações de proteína mais altas resultaram no acúmulo dos agregados de peso molecular muito alto e perda da proteína total. Adicionalmente, foi verificado que o período de tempo de incubação com 6M uréia foi limitado a 5 horas ou menos; tempos de incubação estendidos resultaram na formação de agregados de peso molecular muito altos (HMW).

Permanece uma necessidade não satisfeita na técnica para composições e métodos para obter a desagregação de proteínas de ligação em concentrações altas apropriadas para a preparação de composições farmacêuticas e para a administração in vivo aos pacientes.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A presente invenção se refere à essas e outras necessidades correlatas pela provisão, entre outros, das composições e métodos para recuperação das proteínas de ligação biologicamente ativas de misturas contendo agregados. Os mé-

todos apresentados aqui fornecem a desagregação dos agregados presentes nas misturas de proteína agregada e desagregada (isto é, nativa). As composições e métodos apresentados aqui são eficazes na obtenção da desagregação das proteínas de ligação incluindo porém não limitado aos ligantes de proteína, receptores solúveis, anticorpos, fragmentos de anticorpo, anticorpos de cadeias simples de fragmento variável (scFv) e produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos (produtos SMIP™).

As composições e métodos revelados aqui podem ser apropriadamente empregados com soluções de proteína de ligação na faixa entre cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 50 mg/mL, mais tipicamente entre cerca de 1 mg/mL e cerca de 50 mg/mL, ainda mais tipicamente entre 1 mg/mL e cerca de 50 mg/mL, ainda mais tipicamente entre cerca de 1 mg/mL e cerca de 25 mg/mL ou entre cerca de 1 mg/mL e cerca de 10 mg/mL. São exemplificadas aqui as composições e métodos para desagregação das proteínas de ligação nas soluções compreendendo cerca de 1 mg/mL, cerca de 2 mg/mL, cerca de 5 mg/mL, cerca de 8 mg/ml, ou cerca de 10 mg/mL de proteína de ligação total.

As composições e métodos revelados aqui compreendem, de modo geral, sistemas tampão que são compatíveis com processos de fabricação de GMP. Por exemplo, sistemas tampão apropriados podem incluir um ou mais sais incluindo, porém não limitado ao acetato de sódio (NaOAc) e/ou cloreto de sódio (NaCl). Faixas de concentração apropriadas para cada um desses sais são de cerca de 1 mM a cerca de 100 mM, mais tipicamente de cerca de 5 mM a cerca de 50 mM ou de cerca de

10 mM a cerca de 25 mM. É exemplificado aqui um sistema tampão compreendendo 25 mM NaOAc e 25 mM NaCl.

As composições e métodos para desagregação de proteínas de ligação apresentados aqui compreendem, adicionalmente, um ou mais agentes caotrópicos incluindo, porém não limitado a um ou mais dentre cloridrato de guanidina, arginina e uréia. Será entendido que a concentração precisa de agente caotrópico dependerá da natureza da proteína de ligação e sua sensibilidade em relação ao agente caotrópico, porém será limitada às concentrações que permitem retenção da atividade biológica da proteína em sua forma nativa. Tipicamente, cada um ou os agentes caotrópicos estão presentes nas composições em uma faixa de concentração de cerca de 0,1M a cerca de 8M. Mais tipicamente, cada um ou os agentes caotrópicos estão presentes em uma faixa de concentração de cerca de 0,5 M a cerca de 6 M, mesmo mais tipicamente de cerca de 1 M a cerca de 5 M ou de cerca de 3 M a cerca de 5 M. São exemplificadas aqui composições compreendendo um ou mais caótropo(s) em concentrações de cerca de 3 M, 3,5 M, 4 M, 4,5 M e 5 M.

Dentro dos aspectos correlatos, será apreciado que os efeitos sinergísticos entre combinações de dois ou mais caótropos podem ser vantajosamente obtidos. Por exemplo, a presente invenção contempla composições e métodos empregando uréia em combinação com cloridrato de guanidina, uréia em combinação com arginina e cloridrato de guanidina em combinação com arginina. Independente da combinação de caótropos empregada, cada um ou os agentes caotrópicos estão presentes

nas composições em uma faixa de concentração de cerca de 0,1 M a cerca de 8 M. Mais tipicamente, cada um ou os agentes caotrópicos estão presentes em uma faixa de concentração de cerca de 0,5 M a cerca de 6 M, mesmo mais tipicamente de cerca de 1 M a cerca de 5 M ou de cerca de 3 M a cerca de 5 M.

Independente da identidade precisa de sal e caótropo e concentração, as composições providas aqui são tipicamente ajustadas para um pH levemente ácido, tipicamente na faixa de cerca de pH 4 a cerca de pH 7, mais tipicamente na faixa de cerca de pH 5 a cerca de pH 6. São exemplificadas aqui composições tamponadas a cerca de pH 5, cerca de pH 5,5, e cerca de pH 6. Será entendido que, como uma regra geral, composições compreendendo concentrações maiores de agente(s) caotrópico(s) são tipicamente tamponadas a um pH maior, considerando-se que composições compreendendo concentrações menores de agente(s) caotrópico(s) são tipicamente tamponadas a um pH inferior. Assim, por exemplo, composições compreendendo um agente caotrópico a cerca de 3 M são tipicamente tamponadas a cerca de pH 5, considerando-se que composições compreendendo um agente caotrópico a cerca de 4 M são tamponadas a cerca de pH 6. Outras composições apropriadas compreendem um agente caotrópico a cerca de 3,5 M, que são tamponadas a cerca de pH 5,5. Outros sistemas tampão podem ser empregados apropriadamente.

Utilizando os sistemas tampão conforme descritos acima, altos níveis de desagregação são obtidos dentro de um ou mais caótropos, em concentrações entre cerca de 3 M e

cerca de 4 M uréia por um período de tempo de até cerca de 5 horas a cerca de 24 horas. Conforme descrito em detalhes aqui, a atividade da proteína de ligação é insensível à concentração da proteína e o acúmulo de agregados de peso molecular maior (HMW) é substancialmente reduzido.

Dentro de determinados aspectos da presente invenção, as composições e métodos compreendem, adicionalmente, um ou mais agentes de redução, tais como, por exemplo, cloridrato de tris (2-carboxietil)fosfina, beta-mercaptoetanol (BME), ditiotreitol (DTT) e gutationa (GSH). Será apreciado pelos versados na técnica que a adição de agentes de redução é especificamente vantajosa para uso com proteínas de ligação onde ligações de dissulfeto intra e/ou intermoleculares não são necessárias para prover estabilização da estrutura de proteína terciária e/ou quaternária. DTT está presente tipicamente nas composições entre cerca de 1 mM e cerca de 50 mM. GSH está presente tipicamente nas composições entre cerca de 1 μM e cerca de 100 μM, mais tipicamente entre cerca de 5 μM e cerca de 20 μM.

Ainda nos aspectos adicionais, as composições e métodos podem compreender adicional ou alternativamente, um ou mais agentes quelantes exemplificados por DTPA (ácido dietilenotriamina pentacético; ácido dietilenotriamina-N,N,N',N',N''-pentacético; ácido pentacético; N,N-bis(2-(bis,-(carboximetil)amino)etil)-glicina; ácido dietilenotriamina pentaacético, [[(ácido carboximetil)imino]bis(etilenonitrilo)]-tetracético); EDTA (ácido edético; ácido etilenodinitrilo tetracético; EDTA, base li-

vre; ácido livre EDTA; ácido etilenodiamina-N,N,N',N'-tetracético; Hampeno; Verseno; N,N'-1,2-Etano diilbis-(N-(carboximetil)glicina); ácido etileno diamina tetracético); e NTA (N,N-bis(carboximetil)glicina; ácido triglicolâmico; trilona A; ácido alfa,alfa',alfa"-trimetilamina tricarboxílico; tri(carboximetil)amina; ácido aminotriacético; ácido Hampshire nta; ácido nitrilo-2,2',2"-triacético; Titriplex i; ácido nitrilotriacético). Outros agentes quelantes podem ser empregados apropriadamente.

A desagregação de uma grande variedade de proteínas de ligação pode ser obtida, satisfatoriamente, com as composições e métodos apresentados aqui. São exemplificadas proteínas de ligação possuindo afinidade de ligação específica para CD20, VEGF, Her2, EGFR ou CD37. Por exemplo, a presente invenção é exemplificada pelas composições e métodos para desagregação de um produto SMIP™ possuindo afinidade de ligação específica para CD20.

As proteínas de ligação desagregadas pelas composições e métodos da presente invenção exibem níveis substanciais de atividade in vitro conforme evidenciado pelos ensaios de ligação e funcionais, bem como níveis substanciais de atividade in vivo. Por exemplo, o produto SMIP™ específico de CD20 apresentado aqui exibe níveis substanciais de ligação específica ao antígeno CD20 expresso na superfície da linhagem de células WIL-2S, bem como níveis substanciais de atividade de citotoxicidade dependente de complemento (CDC) em um ensaio de fixação de complemento in vitro.

Esses e outros aspectos da presente invenção ficarão aparentes com referência à descrição detalhada que se segue. Todas as citações reveladas são incorporadas como referência em sua totalidade, como se tivessem sido incorporadas individualmente.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

A Figura 1 apresenta um traço cromatográfico mostrando a eluição dependente do tempo dos agregados de proteína e POI para um produto SMIP™ específico para CD20 de uma coluna de cromatografia de Proteína A eluída com uma etapa simples da Proteína A em pH 5. Os dados apresentados na Figura IA foram obtidos com uma proteína de ligação aplicada à coluna em um tampão de controle compreendendo 25 mM de NaCl, 25 mM de NaOAc em pH 5, considerando-se que os dados apresentados na Figura IB foram obtidos com a mesma proteína de ligação aplicada à coluna seguindo-se um tratamento de 20 horas com uma solução compreendendo 25 mM NaCl, 25 mM NaOAc, 3 M uréia em pH 5. A porcentagem de "proteína de interesse", ou % POI, obtida na Figura IA foi de 46,8% considerando-se que a % POI obtida na Figura IB foi de 80,1%.

A Figura 2 é um gráfico de barras demonstrando rendimentos aperfeiçoados (expressos como % POI) para um produto SMIP™ específico para CD20 exemplar (5 mg/mL e 10 mg/mL) empregando composições e métodos da presente invenção (isto é, 25 mM de NaOAc, 25 mM de NaCl, 3 M uréia, pH 5 e 25 mM de NaOAc, 25 mM de NaCl, 4 M uréia, pH 5) em contraste com a % POI para a mesma proteína de ligação em salmoura

tamponada com fosfato (PBS), pH 7 em combinação com 3 M uréia ou 4 M uréia.

A Figura 3 é um gráfico ilustrando a concentração dependente do tempo da POI (expressa como "área sob a curva" ou AUC) para um produto SMIP™ específico para CD20 exemplar nas composições indicadas compreendendo 2 M, 3 M, ou 4 M uréia cada, em pH 4, pH 5, e pH 6.

A Figura 4 apresenta um gráfico de barras demonstrando rendimentos aperfeiçoados (% POI, a Figura 4A e POI-AUC, a Figura 4B) para um produto SMIP™ específico para CD20 exemplar empregando composições e métodos exemplares da presente invenção (isto é, 25 mM de NaOAc, 25 mM de NaCl, 3M uréia, pH 5 e 25 mM de NaOAc, 25 mM de NaCl, 4M uréia, pH 6).

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Conforme indicado acima, a presente invenção es refere às composições e métodos para a desagregação das proteínas de ligação incluindo, porém não limitada aos ligantes de proteína, receptores solúveis, anticorpos, fragmentos de anticorpo, anticorpos de cadeia simples de fragmento variável (scFv), e produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos (produtos SMIP™). As composições e métodos revelados aqui são eficazes para obtenção da desagregação das proteínas de ligação, enquanto mantém um nível alto de atividade funcional.

Conforme usado nesse relatório descritivo e nas reivindicações apensas, as formas singulares "um(a)" e (o,a)

incluem referências ao plural, a menos que o contexto indique claramente o contrário.

A prática da presente invenção empregará, a menos que especificamente indicado ao contrário, os métodos convencionais de imunologia, microbiologia, biologia molecular, química da proteína e técnicas de DNA recombinante dentro do conhecimento da técnica, muitos sendo descritos abaixo para fins de ilustração. Tais técnicas são plenamente explicadas na literatura. Vide, por exemplo, Sambrook, e outros, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (segunda edição, 1989); Maniatis e outros, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual" (1982); "DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II" (D. Glover, ed); "Oligonucleotide Synthesis" (N. Gait, ed., 1984); "Nucleic Acid Hybridization" (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); "Transcription and Translation" (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); "Animal Cell Culture" (R. Freshney, ed, 1986); Perbal, "A Practical Guide to Molecular Cloning" (1984); Ausubel e outros, "Current protocols in Molecular Biology" (New York, John Wiley and Sons, 1987); Bonifacino e outros, "Current Protocols in Cell Biology" (New York, John Wiley & Sons, 1999); Coligan e outros, "Current Protocols in Immunology" (New York, John Wiley & Sons, 1999); e Harlow and Lane Antibodies: a Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory (1988).

Todas publicações, patentes, e pedidos de patente citados aqui, se acima ou a seguir, são incorporados como referência em sua totalidade. A presente invenção será melhor entendida através da descrição detalhada das modalida-

des específicas, dada uma das quais sendo descrita a seguir em maiores detalhes.

Definições

Conforme empregado aqui, o termo "proteína de ligação" se refere, de modo geral, a todas as classes de ligantes de proteína, receptores solúveis, anticorpos, fragmentos de anticorpo, anticorpos de cadeia simples de fragmento variável (scFv), e produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos (produtos SMIP™). São exemplificadas aqui as proteínas de ligação possuindo afinidade de ligação específica para proteínas alvo e outras moléculas, incluindo receptores de superfície de célula associados às doenças, tais como, câncer e doenças inflamatórias. Em determinadas modalidades, proteínas de ligação possuem afinidade de ligação específica às proteínas alvo CD20, VEGF, Her2, EGFR, e CD37. Mais especificamente, são apresentados aqui os produtos SMIP™ que se ligam especificamente às proteínas alvo CD20, VEGF, Her2, EGFR e CD37.

Conforme empregado aqui, o termo "anticorpo" inclui anticorpos monoclonais, quiméricos, humanizados, e completamente humanos, bem como fragmentos de ligação de antígeno ou biológica e/ou porções dos mesmos. Referências aqui a um "anticorpo" incluem referências às partes, fragmentos, formas precursoras, derivados, variantes e formas construídas geneticamente ou mutadas naturalmente e incluem substituições de aminoácido e marcação com substâncias químicas e/ou radioisótopos e semelhantes, à medida que o derivado e/ou variante mantenha uma quantidade pelo menos substancial

de especificidade de ligação ao alvo e/ou afinidade. O termo "anticorpo" inclui amplamente ambas as cadeias de anticorpo leve e pesada, bem como todos os isótopos de anticorpos, incluindo IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA_1 e IgA_2, e também engloba, fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos, incluindo, porém não limitado a Fab, F(ab')2, Fc, e scFv.

O termo "anticorpo monoclonal," conforme empregado aqui, se refere a um anticorpo obtido de uma população de anticorpos substancialmente homogêneos, isto é, os anticorpos individuais compreendendo a população são idênticos, exceto pelas mutações ocorrendo naturalmente que substancialmente não afetam a especificidade, afinidade e/ou atividade de ligação do anticorpo.

Conforme empregado aqui, o termo "anticorpos quiméricos" se refere às moléculas de anticorpo compreendendo cadeias pesada e leve onde os domínios variáveis de anticorpo não humanos são fundidos operavelmente aos domínios de constante humana. Os anticorpos quiméricos exibem, de modo geral, imunogenicidade reduzida, quando comparados ao anticorpo completamente não humano de origem.

Conforme empregado aqui, o termo "anticorpos humanizados" se refere aos anticorpos compreendendo uma ou mais região de determinação de complementaridade não humana (CDR), uma região de estrutura de domínio variável humana (FR) e um domínio constante de cadeia pesada humano, tal como, o domínio constante de cadeia pesada IgG_2 e o domínio constante de cadeia leve humano, tal como, o domínio cons-

tante de cadeia leve Igcapa. Conforme empregado aqui, o termo "anticorpo humanizado" significa a inclusão de anticorpos humanos (anticorpo receptor) onde os resíduos da região de determinação de complementaridade (CDR) do receptor são substituídos pelos resíduos de uma CDR das espécies não humanas (anticorpo doador), tais como, camundongo, rato ou coelho possuindo especificidade, afinidade e capacidade desejadas. Em alguns exemplos, os resíduos de estrutura de domínio variável do corpo humano são substituídos pelos resíduos não humanos correspondentes. Anticorpos humanizados podem também compreender resíduos que não são encontrados nem no anticorpo do receptor nem na CDR importada ou seqüências de estrutura. Os métodos para humanização dos anticorpos não humanos são bem conhecidos na arte. De modo geral, um anticorpo humanizado possui um ou mais resíduos de aminoácido introduzidos no mesmo a partir de uma fonte que não é humana. A humanização pode ser obtida por enxerto de CDRs em uma FR de suporte humana antes da fusão com o domínio constante de anticorpo humano apropriado. Vide, Jones e outros, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann e outros, Nature 332:323.-327 (1988); Verhoeyen e outros, Science 239:1534-1536 (1988).

Conforme empregado aqui, o termo "anticorpo de cadeia simples de fragmento variável" ou "scFv" se refere a um heterodímero $V_H::V_L$ ligado covalentemente que é expresso de uma fusão gênica incluindo genes codificando V_H- e V_L- ligados por um ligante codificando peptídeo. Huston e outros, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85(16):5879-5883 (1988). Vários métodos foram descritos relacionados às estruturas químicas

para conversão das cadeias de polipeptídeo leve e pesada naturalmente agregadas, porém quimicamente separadas de uma região V de anticorpo em uma molécula scFv que redobrarão em uma estrutura tridimensional substancialmente semelhante à estrutura de um sítio de ligação de antígeno. Vide, por exemplo, as Patentes US números 5.091.513, 5.132.405, e 4.946.778.

Conforme empregado aqui, as proteínas de fusão fabricadas, denominadas "produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos" ou produtos "SMIP™", são conforme descritas nas Publicações de Patente US de co-propriedade 2003/133939, 2003/0118592 e 2005/0136049 e Publicações de Patente Internacionais de co-propriedade WO02/056910, WO2005/037989 e WO2005/017148, que são incorporados aqui como referência.

Uma proteína de ligação específica alvo, tal como um anticorpo ou fragmento de ligação de antígeno do mesmo, "se liga especificamente", "liga imunologicamente" e/ou é "imunologicamente reativo" a um alvo, se ele reage em um nível detectável (em, por exemplo, um ensaio ELISA) com o alvo e não reage detectavelmente com os polipeptídeos não relacionados sob condições semelhantes.

"Ligação imunológica", de acordo com o contexto, se refere de modo geral, às interações não covalentes do tipo que ocorrem enter um anticorpo e um antígeno para o qual o anticorpo é específico. A resistência ou afinidade das interações de ligação de anticorpo-alvo podem ser expressas em termos da constante de dissociação (K_d) da interação, onde um K_d menor representa uma afinidade maior. Propriedades de

ligação imunológicas dos anticorpos específicos alvos podem ser quantificadas usando métodos bem conhecidos na arte. Tal método acarreta medição das taxas de anticorpos específicos alvo/formação de complexo de antígeno e dissociação, onde essas taxas dependem das concentrações dos parceiros de complexo, a afinidade da interação e os parâmetros geométricos que igualmente influenciam a taxa em ambas direções. Assim, ambas a "constante dentro da taxa" (K_{on}) e "constante fora da taxa" (K_{off}) podem ser determinadas por cálculo das concentrações e das taxas reais de associação e dissociação. A taxa de K_{off}/K_{on} permite o cancelamento de todos os parâmetros não relacionados à afinidade, e é assim igual à constante de dissociação K_d. Vide, de modo geral, Davies e outros, Annual Rev. Biochem. 59:439-473 (1990). "Se liga especificamente" aqui significa que as proteínas de ligação se ligam aos polipeptídeos alvo, proteínas e/ou outras moléculas com uma constante de dissociação na faixa de pelo menos 10^{-6} -10^{-9} M, mais geralmente pelo menos 10^{-7} - 10^{-9} M.

Um "sítio de ligação de antígeno" ou "porção de ligação" de um anticorpo específico alvo se refere à parte daquela molécula de anticorpo que participa na ligação alvo. O sítio de ligação de antígeno é formado por resíduos de aminoácido das regiões variáveis (V) de término N das cadeias pesada ("H") e leve ("L"). Três estiramentos altamente divergentes dentro das regiões V das cadeias pesada e leve são referidos como "regiões hipervariáveis" ou "regiões determinando complementaridade (CDRs)" que são interpostas entre

estiramentos de flanqueamento mais conservados conhecidos como "regiões de estrutura", ou "FRs".

Conforme usado aqui, o termo "agregado de proteína" se refere a associação não específica e não nativa entre duas ou mais proteínas de ligação. Os agregados de proteína podem incluir dímeros, trímeros, tetrâmetros e multímeros de ordem mais alta das proteínas de ligação. A presença dos agregados de proteína na composição farmacêutica, especialmente composições farmacêuticas formuladas para liberação parenteral está associada aos as reações in vivo adversas incluindo choque analiftálico. Vide, por exemplo, Moore and Leppart, J. Clin. Enodcrin. and Metab. 51:691-697 (1980); Rattier e outros, Diabetes 39:728-733 (1990); e Thornton and Ballow, Arch. Neurology 50: 135-136 (1993).

Conforme empregado aqui, o termo "atividade biológica" se refere à ambas a capacidade da proteína de ligação para ligação ao alvo específico, bem como a capacidade de mediar suas funcionalidades biológicas nativas.

Conforme empregado aqui, o termo "caótropo" ou "agente caotrópico" se refere aos compostos incluindo, porém não limitados ao cloridrato de guanidina (aka, cloridrato de guanidina, GdmHCl), tiocianato de sódio, uréia, arginina e/ou um detergente. Caótropos têm em comum a capacidade de interromper ligação intermolecular não covalente entre monômeros de proteína ou dímeros, onde os monômeros ou dímeros representam o estado nativo da proteína de ligação.

Conforme empregado aqui, o termo "tampão" ou "agente de tamponamento" se refere a um composto ou combinação

de compostos que são adicionados a uma composição para obter um valor de pH desejado ou faixa de pH. Os tampões são geralmente classificados como tampões inorgânicos (exemplificados pelos tampões fosfato e carbonato) e tampões orgânicos (exemplificados por tampões citrato, Tris, MOPS, MES e HEPES). Outros tampões e agentes de tamponamento podem também ser empregados nas composições e métodos apresentados aqui.

Conforme empregado aqui, o termo "célula hospedeira" se refere a uma célula procariótica ou eucariótica, tal como, célula bacteriana, de levedura, de inseto, mamífero, ou de planta que seja transformada ou transfectada, tal que ela expresse uma proteína de ligação heteróloga de interesse. Células hospedeiras exemplares incluem, porém não estão limitadas ao Escherichia coli, Sarccharomyces cerevisia, Pichia pastoris, SF9, COS e células CHO.

Composições para a Desagregação das Proteínas de Ligação

Conforme indicado acima, a presente invenção fornece composições que são apropriadas para obtenção da desagregação de proteínas de ligação. As composições reveladas aqui podem ser empregadas apropriadamente para a desagregação de soluções compreendendo altas concentrações da proteína de ligação, tipicamente na faixa entre cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 50 mg/mL, mais tipicamente entre cerca de 0:5 e cerca de 20 mg/mL ou entre cerca de 1 mg/mL e cerca de 10 mg/mL. São exemplificadas aqui as soluções de proteína de

ligação de cerca de 1 mg/mL, cerca de 2 mg/mL, cerca de 5 mg/mL, cerca de 8 mg/ml, e cerca de 10 mg/mL.

Composições da presente invenção de modo geral compreendem sistemas tampão que são compatíveis com processos de fabricação GMP. Por exemplo, sistemas tampão apropriados podem englobar um ou mais sais incluindo, porém não limitado ao Acetato de Sódio e/ou Cloreto de Sódio. Outros sais podem ser vantajosamente empregados. Faixas de concentração apropriadas para cada um desses sais são de cerca de 1 mM a cerca de 100 mM, mais tipicamente de cerca de 5 mM a cerca de 50 mM ou de cerca de 10 mM a cerca de 25mM. É exemplificado aqui um sistema tampão compreendendo 25 mM Acetato de Sódio e 25 mM Cloreto de Sódio.

As composições para desagregação das proteínas de ligação apresentadas aqui compreendem adicionalmente, um ou mais agentes caotrópicos incluindo, porém não limitado a, um ou mais de cloridrato de guanidina, arginina e uréia. Será entendido que a concentração precisa do agente caotrópico dependerá da natureza da proteína de ligação e sua sensibilidade ao agente caotrópico, porém não está limitada às concentrações que permitem retenção da atividade biológica da proteína em sua forma nativa. Tipicamente, cada um ou os agentes caotrópicos estão presentes nas composições em uma faixa de concentração de cerca de 0,1 M a cerca de 8 M. Mais tipicamente, cada um ou os agentes caotrópicos estão presentes em uma faixa de concentração de cerca de 0,5 M a cerca de 6 M, mesmo mais tipicamente de cerca de 1 M a cerca de 5 M ou de cerca de 3 M a cerca de 5 M. São exemplificadas aqui

composições compreendendo um ou mais caótropo(s) em concentrações de cerca de 3 M, 3,5 M, 4 M, 4,5 M e 5 M.

Dentro de aspectos correlatos, será apreciado que os efeitos sinergísticos entre as combinações de dois ou mais caótropos podem ser obtidos de modo vantajoso. Por exemplo, a presente invenção contempla composições e métodos empregando uréia em combinação com cloridrato de guanidina, uréia em combinação com arginina e cloridrato de guanidina em combinação com arginina. Independente da combinação de caótropos empregada, cada um ou os agentes caotrópicos estão presentes nas composições em uma faixa de concentração de cerca de 0,1 M a cerca de 8 M. Mais tipicamente, cada agente(s) caotrópico(s) está presente em uma faixa de concentração de cerca de 0:5 M a cerca de 6M, mesmo mais tipicamente de cerca de 1M a cerca de 5M ou de cerca de 3M a cerca de 5M.

Independente do teor de sal e concentração precisos, as composições providas aqui são tipicamente ajustadas a um pH ligeiramente ácido, tipicamente na faixa de cerca de pH 4 a cerca de pH 7, mais tipicamente na faixa de cerca de pH 5 a cerca de pH 6. São exemplificadas aqui composições tamponadas a cerca de pH 5, cerca de pH 5,5, e cerca de pH 6. Será entendido que, como uma regra geral, composições compreendendo concentrações maiores de agente(s) caotrópico(s) são tipicamente tamponadas a um pH maior, considerando-se que composições compreendendo concentrações menores de agente(s) caotrópico(s) são tipicamente tamponadas a m pH menor. Assim, por exemplo, composições compreendendo um a-

gente caotrópico de cerca de 3M são tipicamente tamponadas a um pH de cerca de 5, considerando-se que composições compreendendo um agente caotrópico de cerca de 4 M são tamponadas a cerca de pH 6. Outras composições apropriadas compreendendo um agente caotrópico de cerca de 3,5 M, são tamponadas a cerca de pH 5,5. Outros sistemas tampão podem ser apropriadamente empregados.

Em razão do emprego de tais sistemas tampão conforme descrito acima, níveis maiores de desagregação são obtidos com um ou mais caótropo em concentrações entre cerca de 3 M e cerca de 4 M de uréia, por um período de tempo de cerca de 24 horas. Conforme descrito aqui adicionalmente em detalhes, a atividade da proteína de ligação é insensível à concentração de proteína e o acúmulo de agregados de peso molecular alto (HMW) não ocorre.

Dentro de determinados aspectos da presente invenção, as composições podem compreender, adicionalmente, um ou mais agente(s) de oxidação e/ou um ou mais agente(s) de redução, tais como, por exemplo, cloridrato de tris (2-carboxietil)fosfina (TCEP), beta-mercaptoetanol (BME), ditiotreitol (DTT) e glutationa (GSH). Será apreciado pelos versados na técnica que a adição de agentes de redução é especificamente vantajosa para uso com proteínas de ligação, onde ligações dissulfeto intra e/ou intermoleculares não são necessárias para prover estabilização da estrutura de proteína terciária e/ou quaternária. DTT tipicamente está presente nas composições entre cerca de 1 mM e cerca de 50 mM. GSH está presente, tipicamente, nas composições entre cerca de 1

mM e cerca de 50 mM. GSH está presente tipicamente nas composições entre cerca de 1 μM e cerca de 100 μM, mais tipicamente entre cerca de 5 μM e cerca de 20 μM.

Ainda nos aspectos adicionais, as composições e métodos podem compreender adicional ou alternativamente, um ou mais agentes quelantes exemplificados por DTPA (ácido dietilenotriamina pentacético; ácido dietilenotriamina-N,N,N',N',N''-pentaacético; ácido pentacético; N,N-bis(2-(bis,-(carboximetil)amino)etil)-glicina; ácido dietilenotriamina pentacético, [[(ácido carboximetil)imino]bis(etilenonitrilo)]-tetracético); EDTA (ácido acético; ácido etilenodinitrilo tetracético; EDTA, base livre; ácido livre EDTA; ácido etilenodiamina-N,N,N',N'-tetracético; Hampeno; Verseno; N,N'-1,2-Etano diilbis-(N-(carboximetil)glicina); ácido etileno diamina tetracético); e NTA (N,N-bis(carboximetil)glicina; ácido triglicolâmico; trilona A; ácido alfa,alfa',alfa"-trimetilamina tricarboxílico; tri(carboximetil)amina; ácido aminotriacético; ácido Hampshire nta; ácido nitrilo-2,2',2"-triacético; Titriplex i; ácido nitrilotriacético). Outros agentes quelantes podem ser empregados apropriadamente.

As composições da presente invenção podem ser empregadas, apropriadamente, em uma ampla faixa de temperaturas entre o ponto de congelamento da composição específica e a temperatura na qual a proteína de ligação exibe um grau substancial de desnaturação térmica. Assim, por exemplo, composições e métodos podem ser empregados entre cerca de -10°C e cerca de 50°C. Mais tipicamente, contudo, composições

e métodos são empregados entre cerca de -10°C e cerca de 37°C; ainda mais tipicamente entre cerca de 0°C e cerca de 30°C ou entre cerca de 10°C e cerca de 25°C. Será entendido, contudo, que a temperatura ótima para uma dada composição e processo dependerá substancialmente em parte das propriedades de biofísicas da proteína de ligação específica empregada.

A desagregação de uma grande variedade de proteínas de ligação pode ser obtida, satisfatoriamente, com as composições e métodos apresentados aqui. São exemplificadas aqui as proteínas de ligação possuindo afinidade de ligação específica para CD20, VEGF, Her2, EGFR e CD37. Por exemplo, a presente invenção é exemplificada pelas composições e métodos para desagregação de um produto SMIP™ possuindo afinidade de ligação específica para CD20.

As proteínas de ligação desagregadas pelas composições da presente invenção exibem níveis substanciais de atividade in vitro conforme evidenciado por ensaios de ligação e funcionais, bem como níveis substanciais de atividade in vivo. Por exemplo, o produto SMIP™ específico de CD20 apresentado aqui exibe níveis substanciais de ligação específica ao antígeno CD20 expressos na superfície da linhagem de célula WIL-2S, bem como níveis substanciais de atividade de citotoxicidade dependente de complemento (CDC) em um ensaio de fixação in vitro, quando comparado ao produto SMIP™ não tratado.

Métodos para Desagregação das Proteínas de Ligação

Conforme indicado acima, a presente invenção também provê métodos para a desagregação de uma ampla variedade de proteínas de ligação incluindo, porém não limitado aos ligantes de proteína, receptores solúveis, anticorpos, anticorpo de cadeia simples de fragmento variável (scFv) e produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos (produtos SMIP™).

Os métodos da invenção revelados aqui são empregados apropriadamente com concentrações altas de proteínas de ligação, conforme indicado acima, de modo geral na faixa de cerca de 0,1 mg/mL a cerca de 50 mg/mL. São exemplificados aqui os métodos para obtenção da desagregação das proteínas de ligação em concentrações de 5 mg/mL, 8 mg/mL e 10 mg/mL. Será entendido, contudo, que os presentes métodos podem ser aplicados a uma ampla variedade de soluções de proteína de ligação concentradas.

Em resumo, uma célula ou linhagem de célula apropriada é selecionada para a expressão de uma proteína de ligação de interesse e é transformada ou transfectada com um vetor plasmídeo ou outro sistema de expressão apropriado, transportando um gene a ser expresso. Uma suspensão compreendendo uma mistura de proteína de ligação agregada e desagregada é isolada da célula ou sobrenadante da cultura, concentrada conforme apropriado e submetida a uma ou mais etapas de isolamento de proteína e inativação viral. A proteína de ligação concentrada é trocada no sistema tampão apropriado, exemplificado aqui por um sistema tampão compreendendo 25 mM de NaOAc e 25 mM de NaCl. Será entendido, contudo, que

os sais precisos e concentrações podem ser modificados considerando-se as propriedades biofísicas da proteína de ligação de interesse.

Tipicamente, um ou mais caótropos, tais como, por exemplo, cloridrato de guanidina, arginina e/ou uréia, é adicionado à proteína de ligação tamponada a uma concentração entre cerca de 2 M e cerca de 5 M. Mais tipicamente, um ou mais caótropos são adicionados à proteína de ligação tamponada a uma concentração entre cerca de 3 M e cerca de 4 M. Por exemplo um ou mais caótropos podem ser adicionados à proteína de ligação tamponada a uma concentração de cerca de 3 M, cerca de 3,2 M, cerca de 3,4 M, cerca de 3,6 M, cerca de 3,8 M ou cerca de 4 M.

Dependendo da proteína de ligação precisa, do caótropo e/ou do sistema tampão empregado, e considerando-se a concentração do caótropo, a solução é tipicamente ajustada para um pH entre cerca de pH 4 a cerca de pH 7. Mais tipicamente, o pH da proteína de ligação, do caótropo e da solução de sistema tampão é um pH entre cerca de pH 5 e cerca de pH 6. Conforme descrito acima, foi determinado para a proteína de ligação exemplar revelada aqui que para soluções compreendendo um ou mais caótropos a 3 M, um pH de cerca de pH 5 é apropriado para obtenção da desagregação da proteína. Alternativamente, para soluções compreendendo um ou mais caótropos a 4 M, um pH de cerca de 6 pode ser apropriado. A combinação precisa de caótropos e pH dependerá, em parte, das propriedades biofísicas da proteína de ligação que necessitem de desagregação, a combinação podendo ser obtida por um

versado na técnica através de experimentação de rotina, em vista da diretriz provida aqui.

Será apreciado, adicionalmente, que os presentes métodos podem empregar, adicionalmente, a adição de um ou mais agentes de redução, tais como, por exemplo, cloridrato de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP), beta-mercaptoetanol (BME), ditiotreitol (DTT), e glutationa (GSH) e/ou um ou mais agentes quelantes, tais como, por exemplo, DTPA, EDTA, e/ou NTA.

Os presentes métodos são apropriados para a desagregação de uma grande variedade de proteínas de ligação exemplificada aqui por proteínas de ligação possuindo afinidade de ligação específica para CD20, VEGF, Her2, EGFR e CD37. Por exemplo, a presente invenção é exemplificada por métodos para a desagregação de um produto de SMIP™ possuindo afinidade de ligação específica para CD20.

Para obtenção de um alto grau de desagregação da proteína, é vantajoso manter a proteína de ligação, o caótropo, a solução do sistema de tampão a uma temperatura entre cerca de 0°C e cerca de 100°C por um período entre cerca de 5 horas a cerca de 24 horas. Por exemplo, de modo a obter a desagregação da proteína de ligação apresentada aqui, a solução foi mantida a uma temperatura de cerca de 25°C (isto é, temperatura ambiente) por um período entre cerca de 5 horas e cerca de 20 horas.

Seguindo-se o período de manutenção, as proteínas desagregadas são tipicamente trocadas dentro do sistema tampão, tal como, um sistema tampão de 25 mM de NaOAc, 25 mM de

NaCl em pH 5. Sob essas condições, as proteínas desagregadas são estáveis e não sofrem reagregação substancial. As etapas subsequentes de purificação da proteína e filtração viral podem ser, opcionalmente, realizadas a fim de obter uma solução altamente purificada compreendendo a proteína de ligação desagregada de interesse.

Sistemas de Ensaio para Avaliar a Atividade biológica Das Proteínas de Ligação Desagregadas

As proteínas de ligação que são desagregadas por emprego das composições e métodos revelados aqui podem ser testadas quanto a atividade biológica por várias metodologias apropriadas na arte incluindo, de modo geral, sistemas de ensaio para avaliar a atividade de ligação específica e afinidade, bem como sistemas de ensaio para avaliar outras atividades funcionais. Conforme usado aqui, os termos "funcionalmente ativo" e "atividade funcional" se referem às atividades biológicas e/ou imunológicas específicas, alvo da proteína de ligação não agregada, nativa.

Por exemplo, o produto SMIP™ específico de CD20 desagregado pelos métodos exemplares apresentados aqui exibe níveis substanciais de ligação específica ao antígeno CD20a expressos na superfície da linhagem de célula WIL-2S, bem como, níveis substanciais de atividade de citotoxicidade dependente de complemento (CDC), em um ensaio de fixação de complemento in vitro, como comparado ao produto SMIP não tratado.

Os sistemas de ensaio que se seguem para avaliar a funcionalidade das proteínas de ligação desagregadas iso-

ladas por emprego das composições e métodos apresentados aqui são providos como exemplo e não como limitação.

Sistemas de Ensaio para Medir Morte Celular Necrótica

A necrose é um processo passivo onde a parada da hemostase interna conduz à dissolução celular envolvendo uma perda de integridade da membrana do plasma e intumescimento subsequente, seguido por lise da célula, Schwartz e outros, 1993. A morte celular necrótica é caracterizada pela perda da integridade da membrana celular e permeabilidade aos corantes, tais como, iodeto de propídio (PI) que é conhecido pelos versados na técnica por se ligar ao DNA das células sofrendo necrose primária e secundária. Vitale e outros, Histochemistry 100:223-229 (1993) e Swat e outros, J. Immunol. Methods 137:79-87 (1991). A necrose pode ser distinguida da apoptose pelo que, as membranas celulares permanecem intactas nos estágios anteriores da apoptose. Como uma conseqüência, ensaios de exclusão de corante usando PI podem ser usados em paralelo um ensaio para apoptose, conforme descrito a seguir, a fim de distinguir a morte celular apoptótica da necrótica. Ensaios de citometria de fluxo com base em um separador de células ativado por fluorescência (FACS) usando PI permite a avaliação rápida e quantificação da porcentagem das células necróticas.

Sistemas de Ensaio para Medir a Morte Celular Apoptótica

A detecção da morte celular programada ou apoptose pode ser realizada conforme será apreciado por um versado na

técnica. A porcentagem de células sofrendo apoptose pode ser medida em vários períodos de tempo após estímulo da apoptose com ou sem administração de uma proteína de ligação desagregada por emprego das composições e métodos revelados aqui. A morfologia das células sofrendo morte de célula apoptótica é geralmente caracterizada por uma contração do citoplasma da célula, além de núcleo, condensação e fragmentação da cromatina. Wyllie e outros, J. Pathol. 142:67-77 (1984);

Sistemas de Ensaio para Medição da Afinidade de Ligação Específica com o Alvo e Especificidade

As proteínas de ligação desagregadas por emprego das composições e métodos revelados aqui podem também ser testas quanto a afinidade de ligação específica com o alvo e especificidade e comparadas à afinidade de ligação e atividade da proteína nativa.

Proteínas de ligação podem ser testadas quanto a afinidade de ligação ao antígeno exemplar e/ou especificidade por qualquer uma das metodologias que se encontram atualmente disponíveis na arte. Por exemplo, superfícies revestidas com antígeno e anticorpo de células convencionais, Western blotting e procedimentos ELISA podem ser empregados para realizar a etapa de classificação quanto às proteínas de ligação que possuem uma especificidade particular. Uma ampla faixa de técnicas de imunoensaio apropriadas está disponível conforme pode ser visto com referência às Patentes US números 4.016.043, 4.424.279, e 4.018.653, cada uma das quais sendo incorporada aqui como referência.

Em um tipo de ensaio, um anticorpo de proteína antiligação não marcado é imobilizado sobre um suporte sólido e a proteína de ligação desagregada a ser testada é colocada em contato com o anticorpo imobilizado. Após um período de tempo apropriado suficiente para permitir a formação de um primeiro complexo, uma molécula alvo marcada com uma molécula repórter capaz de produzir um sinal detectável é então adicionada e incubada, permitindo tempo suficiente para a formação de um segundo complexo de anticorpo imobilizado/proteína de ligação/molécula alvo. O material não complexado é lavado e a presença da molécula alvo é determinada por observação de um sinal produzido pela molécula repórter. Os resultados podem tanto ser qualitativos, por observação simples do sinal visível, quanto podem ser quantitativos, por comparação com uma amostra de controle contendo quantidades conhecidas de proteína de ligação nativa.

Em um segundo tipo de ensaio, uma molécula alvo a qual a proteína de ligação especificamente se liga é unida a um suporte sólido. Os processos de ligação são bem conhecidos na arte e geralmente consistem em reticulação, ligação covalente ou adsorção física da molécula alvo em relação ao suporte sólido. A amostra contendo proteína de ligação desagregada a ser testada é então adicionada ao complexo de fase sólida e incubada por um período de tempo suficiente (por exemplo, 2-40 minutos ou por toda a noite, se for mais conveniente) e sob condições apropriadas (por exemplo, de cerca da temperatura ambiente para cerca de 38°C, tal como 25°C) para permitir ligação da proteína de ligação à molécula al-

vo. Seguindo-se o período de incubação, o suporte sólido é lavado e seco e incubado com a proteína de ligação-anticorpo específico ao qual uma molécula repórter pode ser anexada, pelo que, permitindo a detecção da ligação da proteína de ligação-anticorpo específico à proteína de ligação desagregada complexada com relação à molécula alvo imobilizada.

O termo "suporte sólido" conforme usado aqui, se refere, por exemplo, às placas de microtitulação, membranas e microesferas, etc. Por exemplo, tais suportes sólidos podem ser fabricados de vidro, plástico (por exemplo, poliestireno), polissacarídeos, náilon, nitrocelulose ou teflon, etc. A superfície de tais suportes pode ser sólida ou porosa e de qualquer forma conveniente. Suportes sólidos apropriados incluem vidro ou um polímero, os polímeros mais comumente usados sendo celulose, poliacrilamida, náilon, poliestireno, cloreto de polivinila ou polipropileno. Os suportes sólidos podem estar na forma de tubos, microesferas, discos ou microplacas ou qualquer outra superfície para condução de um imunoensaio.

Um sistema de ensaio alternativo envolve a imobilização da proteína de ligação desagregada e exposição da proteína de ligação imobilizada a uma molécula alvo que pode ou não ser marcada com uma molécula repórter. Conforme usado aqui, o termo "molécula repórter" se refere a uma molécula que, por sua natureza química, bioquímica e/ou física, provê um sinal analiticamente identificável que permite a classificação das proteínas de ligação complexas com moléculas alvo ou com segundos anticorpos. A detecção pode ser qualita-

tiva ou quantitativa. As moléculas repórter empregadas de modo geral nos ensaios do tipo revelado aqui são enzimas, fluorforos, radioisótopos e/ou moléculas quimioluminecentes.

No caso de um imunoensaio de enzima (EIA), uma enzima é conjugada no anticorpo de detecção ou molécula alvo, de modo geral por meio de glutaraldeído ou periodato. Conforme será prontamente reconhecido, contudo, existe uma ampla variedade de diferentes técnicas de conjugação que são prontamente disponíveis aos versados na técnica. As enzimas geralmente empregadas incluem peroxidase de rábano silvestre, glicose oxidase, β-galactosidase e fosfatase alcalina. Em geral, o anticorpo marcado com enzima é adicionado a um complexo em potencial entre uma molécula alvo e uma proteína de ligação, deixado se ligar e então lavado para remover o excesso de reagente. A solução contendo o substrato apropriado é então adicionada ao complexo de antígeno alvo/proteína de ligação desagregada/anticorpo marcado. O substrato reage com a enzima ligada ao anticorpo marcado, fornecendo um sinal visual qualitativo que pode ser adicionalmente quantificado, geralmente espectrofotometricamente, para indicar a atividade da proteína de ligação desagregada presente na amostra.

Alternativamente, os compostos fluorescentes, tais como, fluoresceína e rodamina ou proteínas fluorescentes, tais como, ficoeritrina, podem ser quimicamente acoplados aos anticorpos, sem alterar sua capacidade de ligação. Quando ativados por iluminação com luz de um comprimento de onda específico, o anticorpo marcado com fluorcromo absorve

a energia da luz, induzindo um estado de excitabilidade na molécula, seguido por emissão da luz em uma cor característica, visualmente detectável com um microscópio de luz ou outros instrumentos ópticos. Como no EIA, o anticorpo marcado fluorescente é deixado se ligar ao complexo de antígeno-anticorpo. Após remoção do reagente não ligado, o complexo terciário remanescente é exposto à luz de comprimento de onda apropriado. A fluorescência observada indica a presença da proteína de ligação unida de interesse.

Técnicas de imunofluorescência e EIA são ambas bem estabelecidas na técnica. Será entendido que as outras moléculas repórter, tais como, radioisótopos e moléculas quimiluminescentes e/ou bioluminescentes podem também ser apropriadamente empregadas nos métodos de classificação revelados aqui.

Os exemplos que se seguem servem para descrever mais completamente a maneira de uso da invenção descrita acima, bem como estabelece os melhores modos contemplados para realizar vários aspectos da invenção. Esses exemplos, de modo algum, devem limitar o escopo verdadeiro dessa invenção, porém ao invés disso, são apresentados para fins ilustrativos.

EXEMPLOS

Exemplo 1

Sistema de Cromatografia de Líquido de Alto Desempenho de Exclusão por Tamanho (SEC-HPLC) para a Separação de Agregados de Proteína e Proteína Não Agregada

Esse Exemplo demonstra um sistema de cromatografia de líquido de alto desempenho de exclusão por tamanho (SEC-HPLC) para separar agregados multiméricos de proteína da proteína de interesse não agregada, ativa (POI) para um produto SMIP™ específico para CD20 exemplar.

As amostras de um produto SMIP™ específico para CD20 foram analisadas por cromatografia de líquido de alto desempenho de exclusão por tamanho (SEC-HPLC; coluna Progel-TSK G3000 SWXL HPLC; Tosoh Bioscience LLC, Montgomeryville, PA) e áreas máximas integradas. Vide Tabela 1 quanto aos parâmetros operacionais de SEC-HPLC.

Tabela 1

Parâmetros Operacionais de SEC-HPLC

Tamanho da Coluna	7,8 mm (DI) x 30,0 cm (L)
Tamanho do poro	5 μm
Pressão máxima da coluna	70 kg/cm²
Temperatura operacional	Ambiente
Temperatura da amostra	Ambiente
Detecção/comprimento de onda de referência	280 nm/ n/a com equipamento Shimadzu
Largura da faixa (nm)	2 nm
Fase móvel	DPBS + 0,05% azida de sódio
Razão de Fluxo	1 mL/min
Período de tempo da operação	15 minutos
Quantidade de amostra de proteína injetada	250 μg
Método de integração	Queda perpendicular

A faixa linear para o produto a granel do produto SMIP™ específico para CD20 empregando a coluna TSK G3000SWXL foi determinada como 10 µg para 500 µg ($r^2 \geq 0,99$), com capacidade de repetição aceitável da pureza relativa através da faixa de 50 µg a 500 µg (sd ≤ 0,1 %). As interações entre o produto e a matriz da coluna foram observadas como resultando em uma subestimativa do peso molecular para a POI do produto SMI™ específico para CD20 (81 kDa em comparação ao peso teórico de 107 kDa para o produto SMIP™ específico para CD20 dimérico) e leve diminuição da máxima da proteína de interesse.

A inspeção visual dos gráficos de linearidade mostrou que a resposta de área máxima foi linear até uma carga de 500 µg (dados não mostrados). Um resumo dos resultados gerados pela análise de reagreção é mostrado na Tabela 2. A análise de regressão realizada nos dados de área máxima da POI para cargas de 9 µg a 491 µg forneceu um quadrado do coeficiente de correlação (r^2) de 0,997 e um valor de interceptação de 41,65 de unidades de área máxima. A resposta através da faixa de carga de 9 µg a 491 µg forneceu linearidade aceitável ($r^2 \geq 0,99$).

Tabela 2

Análise de Regressão da Carga de 9 µg a 491 µg e Área Máxima para 130 L de Produto a Granel "Proteína de Interesse" para um Produto SMIP™ específico para CD-20

Parâmetro	Valor
Interceptação (mAU*s)	41,6476
Inclinação (mAU*s/µg)	95,2907

r^2	0,9974

As Figuras 1A e 1B apresentam traços cromatográficos mostrando a eluição dependente do tempo dos agregados de proteína e POI para um produto SMIP™ específico para CD20 exemplar de uma coluna de cromatografia de Proteína A eluída com uma etapa simples da Proteína A em pH 5. Os dados apresentados na Figura 1B foram obtidos com a mesma proteína de ligação aplicada à coluna seguindo-se um tratamento de 20 horas com uma solução compreendendo 25 mM NaCl, 25 mM de NaOAc, 3M uréia em pH 5. A %POI obtida na Figura 1A foi de 46,8% (vide Tabela 3), considerando-se que a %POI obtida na Figura 1B foi de 80,1% (vide Tabela 4).

Tabela 3

Separação SEC-HPLC de Agregados de Produto SMIP™ específico para CD20 do Produto SMIP™ específico para CD20 Não Agregado em 25 mM de NaCl/25 nM de NaOAc, pH 5

Máxima número	Tempo de retenção	Área máxima	Porcentagem de Área Máxima total	Altura máxima
1	5,732	1187786	9,284	50362
2	6,372	1295781	10,128	44255
3	6,808	1603612	12,534	50174
4	7,512	2718219	21,247	70023
5(POI)	8,804	5988243	46,806	165024
TOTAIS		12793641	100,000	379838

Tabela 4

Separação SEC-HPLC de Agregados de Produto SMIP™ específico para CD20 do Produto SMIP™ específico para CD20 Não Agregado em 25 mM de NaCl/25 nM de NaOAc, 3 M Uréia

Máxima número	Tempo de retenção	Área máxima	Porcentagem de Área Máxima Total	Altura máxima
1	5,772	130273	1,252	5174
2	6,808	416329	4,002	10699
3	7,460	1465905	13,092	35220
4(POI)	8,864	83371788	80,149	231667
5	12,004	52432	0,504	675
TOTAIS		10402127	100,000	283435

Exemplo 2

Aumento Dependente da Composição na Desagregação para um Produto SMIP™ específico para CD20

Esse exemplo demonstra que composições compreendendo várias concentrações de caótropo nas soluções tampão ácido compreendendo NaOAc e NaCl são eficazes para o aumento do rendimento de proteína de interesse desagregada, ativa (POI) para um produto de SMIP™ específico para CD20.

Em um primeiro experimento, uma amostra de 10 mL de um eluato de Proteína A de 16,3 mg/m de um produto SMIP específico para CD20 foi dialisada por toda a noite contra 1 litro de salmoura de fosfato tamponada (PDS), pH 7,0. Em paralelo, uma segunda amostra de 10 mL do mesmo eluato de Proteína A de 16,3 mg/mL do produto de SMIP™ especifico para

CD20 exemplar foi dialisado por toda a noite contra 1 litro de 25 mM de NaOAc/ 25 mM de NaCl, pH 5,0.

Cada amostra foi removida da diálise, diluída para 5 ou 10 mg/mL no respectivo tampão de diálise e ajustada para uma concentração final de uréia de 0 M, 3 M, ou 4M para um total de 12 amostras. Essas amostras foram incubadas a temperatura ambiente por 22 horas.

10 µL de cada uma das 12 amostras foram analisados por cromatografia de líquido de alto desempenho de exclusão por tamanho (conforme descrito no Exemplo 1) e as áreas máximas foram integradas. A área máxima relativa da Máxima de Interesse (POI) de controle de uréia 0 M em tempo de retenção de ~8,8 minutos foi ajustada em 100% e aumento relativo nas áreas do grupo experimental POI foi colocado em gráfico para cada amostra. Vide Figura 2.

No segundo experimento, o curso de tempo para desagregação de um produto SMIP™ específico para CD20 exemplar foi determinado em pH 4,0, pH 5,0 e pH 6,0 com 3 M e 4 M de uréia. 8 mL de Eluato de Proteína A do Produto SMIP™ específico para CD20 em 16,3 mg/mL foram dialisados por toda a noite contra 500 mL de 25 mM de NaOAc/25 mM de NaCl em pH 4,0, 5,0, ou 6,0. As três amostras foram diluídas com o respectivo tampão de diálise e uréia a uma concentração final de 8 mg/mL Produto SMIP™ específico para CD20 e 0 M, 2 M, 3 M ou 4 M uréia. As amostras de 0 M uréia foram analisadas por SEC HPLC e as áreas máximas de POI foram estabelecidas como sendo o ponto de tempo t = 0. 12 µL de amostras de concentração de uréia de 2 M, 3 M e 4 M em pH 4,0, 5,0, e 6,0

foram injetados e analisados seqüencialmente por SEC HPLC, com toda a seqüência repetida no curso de ~24 horas. A área máxima total da POI foi colocada em gráfico contra o tempo de injeção para criar um curso de tempo de desagregação nessas 9 condições. Os resultados desse experimento são resumidos na Figura 3.

Em um terceiro experimento, a desagregação dependente de uréia de um produto SMIP™ específico para CD20 exemplar foi medida em pH 5, em 3 M de uréia e em pH 6 em 4 M de uréia. Duas amostras de 2 mL do eluato de Proteína A do produto SMIP™ específico para CD20 exemplar em 16,3 mg/mL foram dialisadas por toda a noite contra 300 mL de 25 mM de NaO Ac/25 mM de NaCl em pH 5,0 ou pH 6,0, respectivamente. A amostra de pH 5,0 foi ajustada para 8 mg/mL de produto SMIP™ específico para CD20 e 3 M de uréia em tampão contendo 25 mM de NaOAc/25 mM de NaCl em pH 5,0. A amostra de pH 6,0 foi ajustada para 8 mg/mL de produto SMIP™ específico para CD20 e 4 M de uréia em tampão contendo 25 mM de NaOAc/25 mM de NaCl em pH 6,0. Essas amostras foram incubadas a temperatura ambiente por ~20 horas. Ambas as amostras foram trocadas em PBS por diálise de 5 horas. Ambas as amostras foram analisadas por SEC HPLC e as áreas de POI total e % POI do total foram colocadas em gráfico de barra. Vide Figura 4.

Exemplo 3

Caracterização In vitro de um SMIP™ Específico para CD20

Esse exemplo demonstra a atividade in vitro de um produto SMIP™ específico para CD20 desagregado pelas composições e métodos da presente invenção.

O efeito citotóxico de um produto SMIPT(M) específico para CD20, em combinação com complemento, nas células cancerígenas, é medido com base na redução metabólica celular do corante AlamarBlue™. Uma linhagem de célula de linfoblastóide B humana, WIL-2-S, é empregada em combinação com um produto SMIP™ especifico para CD20, exemplar, e complemento de coelho em um formato de 96 poços. Os controles apropriados e concentrações de amostra de produto são adicionados e deixados incubar a 37°C, 5% de CO_2. A solução de corante AlamarBlue™ é então adicionada. O corante é reduzido por metabolismo celular em uma forma que é lida fluormetricamente em um ponto de tempo ajustado. As unidades de fluorescência relativa (RFUs) são diretamente proporcionais ao número de células viáveis em cada amostra.

A afinidade alvo do produto SMIP™ especifico para CD20 exemplar em uma linhagem de célula expressando CD20 é medida com base na fluorescência relativa de uma coloração conjugada de isotiocianato de fluoresceína (FITC) que se liga ao produto SMIP™ especifico para CD20 em um modo dependente de dose. Uma linhagem celular de linfoblastódie B humano, WIL2-S, é incubada com várias diluições do produto SMIP™ especifico para CD20, que permitem ligação ao alvo celular. As células são lavadas para remoção de qualquer produto SMIP™ específico para CD20 não ligado e coloridas para detecção da proteína de ligação. As células são lavadas para

remoção de qualquer coloração não ligada e analisadas por citometria de fluxo (FACS) quanto a intensidade de fluorescência média geométrica de FITTC (GMFI). Os dados são ajustados para curvas de 4 parâmetros e os valores ED50 calculados. Os resultados são reportados como % de Potência Relativa (padrão de amostra versus referência).

Exemplo 4

Caracterização In vivo de um Produto SMI™ específico para CD20 Desagregado

Esse Exemplo revela um sistema de modelo animal de célula tumoral Ramos para avaliar a atividade in vivo de um produto SMIP™ especifico para CD20, desagregado pelas composições e métodos da presente invenção.

Células Ramos são cultivadas para confluência apropriada e viabilidade superior a 90%, colhidas e lavadas 2 x com PBS estéril. As células colhidas são resuspensas a um número apropriado de células para injeção (isto é, 100 µL/camundongo; para 5 x 10^6 células/camundongo, as células são resuspensas para 5 x 10^7 células/mL) e mantidas em gelo até a injeção. Usando uma agulha 27G de 1,27 cm, 100 µL de suspensão de célula foram injetados subcutaneamente no flanco direito do camundongo, o que fornece tipicamente uma bolha visível. Os camundongos são observados diariamente quanto ao crescimento do tumor. Os tumores são tipicamente estabelecidos quando alcançam ~150-300 mm^3.

No dia 0, os animais são classificados e agrupados de acordo com o tamanho do tumor (usando software LabCat; Innovative Programming Associates, Inc., Princeton, NJ) e os

pesos corpóreos são registrados Os tumores são medidos 2 a 3 vezes por semana e os pesos corpóreos monitorados semanalmente. Os animais são mantidos até os tumores alcançarem não mais de 1.500 mm^3. Os animais são sacrificados se ocorre ulceração do tumor, se existir perda extrema de peso corpóreo, se o tumor exceder a 1.500 mm^3 e/ou se o tumor inibir a mobilidade do animal. Os estudos são tipicamente terminados após o 90° dia.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, para desagregação de uma proteína de ligação, a composição **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende um sal a uma concentração entre cerca de 1 mM e cerca de 100 mM e um agente caotrópico a uma concentração entre cerca de 0,1 M e cerca de 8M, onde a composição possui um pH entre cerca de pH 4 e cerca de pH 7.

2. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o sal é uma concentração entre cerca de 10 mM e cerca de 25 mM.

3. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o sal é selecionado do grupo consistindo em NaCl e NaOAc.

4. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o agente caotrópico é uma concentração entre cerca de 3 M e cerca de 5 M.

5. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que o agente caotrópico é selecionado do grupo consistindo em guanidina, arginina e uréia.

6. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que a composição possui um pH entre cerca de pH 5 e cerca de pH 6.

7. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende, adicionalmente, um agente de redução selecionado do grupo consistindo em cloridrato de tris (2-carboxietil) fosfina (TCEP), beta-mercaptoetanol (BME), ditiotreitol (DTT) e glutationa (GSH).

8. Composição, de acordo com a reivindicação 1, **CARACTERIZADA** pelo fato de que compreende, adicionalmente, um agente quelante selecionado do grupo consistindo em DTPA, EDTA e NTA.

9. Método, para a desagregação de uma proteína de ligação, o método **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende as etapas de:

a) suspensão da mistura compreendendo uma proteína de ligação não agregada e uma proteína de ligação agregada a uma concentração entre cerca de 0,1 mg/m e cerca de 50 mg/mL em uma composição compreendendo um sal em uma concentração entre cerca de 1 mM e cerca de 100 mM e um agente caotrópico a uma concentração entre cerca de 0,1 M e cerca de 8 M, pelo que, provendo uma suspensão da proteína de ligação;

b) ajuste do pH da suspensão da proteína de ligação para um pH entre cerca de pH 4 e cerca de pH 7; e

c) mantendo a suspensão da proteína de ligação a uma temperatura entre cerca de -10°C e cerca de 50°C por cerca de 5 horas e cerca de 24 horas, pelo que, aumentando a porcentagem da proteína de ligação não agregada e diminuindo a porcentagem da proteína de ligação agregada.

10. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende, adicionalmente, a etapa de troca da suspensão da proteína de ligação em um sistema tampão compreendendo um sal, onde o sistema tampão está em um pH de cerca 5.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, **CARACTERIZADO** pelo fato de que compreende, adicionalmente, a

etapa de separação da proteína de ligação não agregada da proteína de ligação agregada.

12. Método, de acordo com a reivindicação 9, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de ligação é selecionada do grupo consistindo em um ligante de proteína, um receptor solúvel, um anticorpo, um fragmento de anticorpo, um anticorpo de cadeia simples de fragmento variável (scFv), e um produto imunofarmacêutico modular pequeno.

13. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de ligação é suspensa a uma concentração entre cerca de 1 mg/mL e cerca de 50 mg/ml.

14. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a concentração de sal está entre cerca de 10 mM e cerca de 25 mM.

15. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o sal é selecionado do grupo consistindo em NaOAc e NaCl.

16. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente caotrópico está em uma concentração entre cerca de 3 M e cerca de 5 M.

17. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que o agente caotrópico é selecionado do grupo consistindo em guanidina, arginina e uréia.

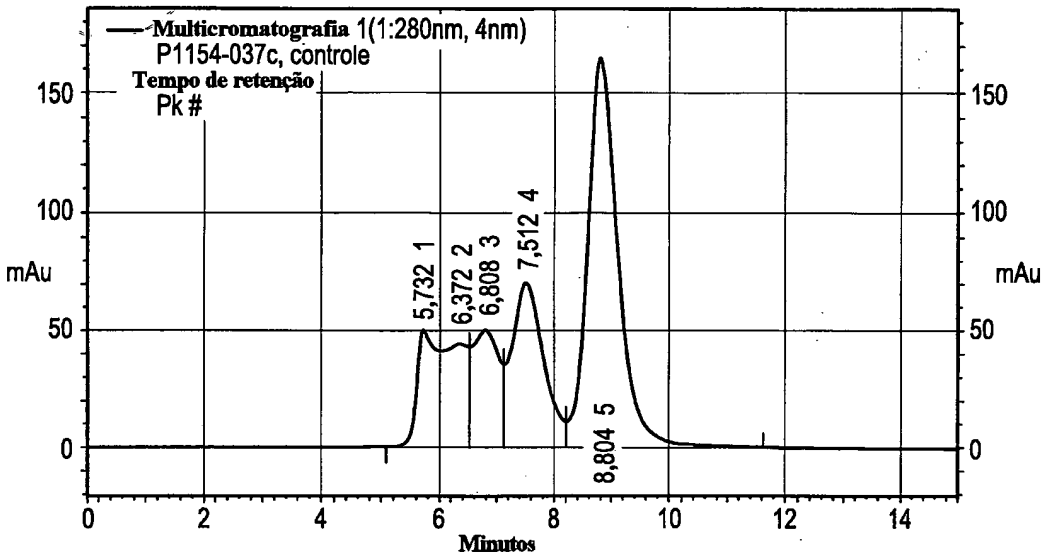
18. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a suspensão da proteína de ligação é ajustada a um pH entre cerca de pH 5 e cerca de pH 6.

19. Método, de acordo com a reivindicação 12, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de ligação possui afinidade de ligação específica com uma proteína alvo selecionada do grupo consistindo em CD20, VEGF, Her2, EGFR e CD37.

20. Método, de acordo com a reivindicação 19, **CARACTERIZADO** pelo fato de que a proteína de ligação é um produto imunofarmacêutico modular pequeno onde o produto imunofarmacêutico modular pequeno se liga à proteína alvo com uma constante de dissociação na faixa de pelo menos 10^{-6}-10^{-9} M.

FIG. 1

A


Multicromatografia 1(1:280nm, 4nm)
P1154-037c, controle
Tempo de retenção
Pk #
5,732 1
6,372 2
6,808 3
7,512 4
8,804 5
mAu
Minutos

B

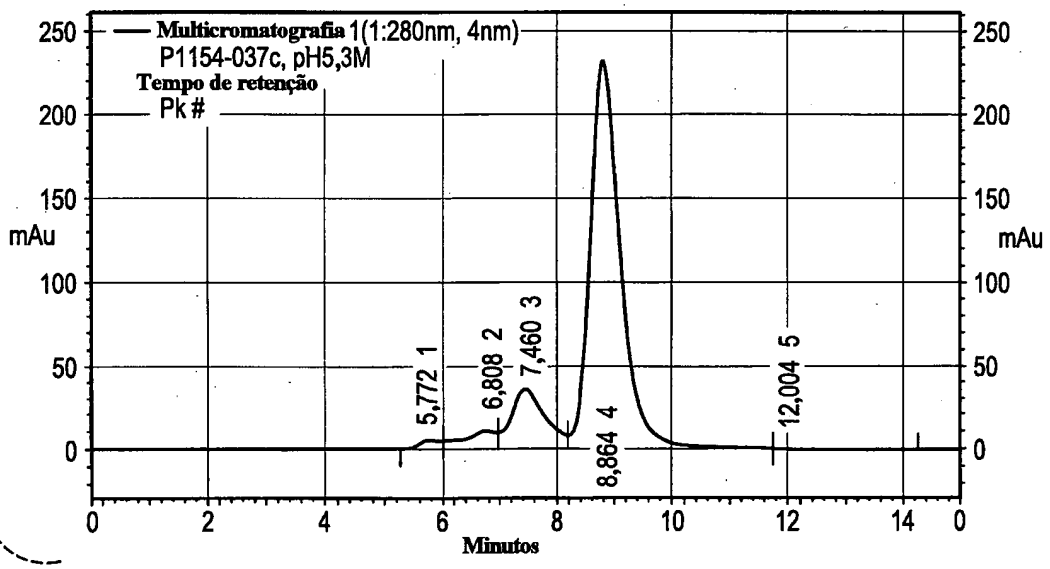

Multicromatografia 1(1:280nm, 4nm)
P1154-037c, pH5,3M
Tempo de retenção
Pk #
5,772 1
6,808 2
7,460 3
8,864 4
12,004 5
mAu
Minutos

FIG. 2

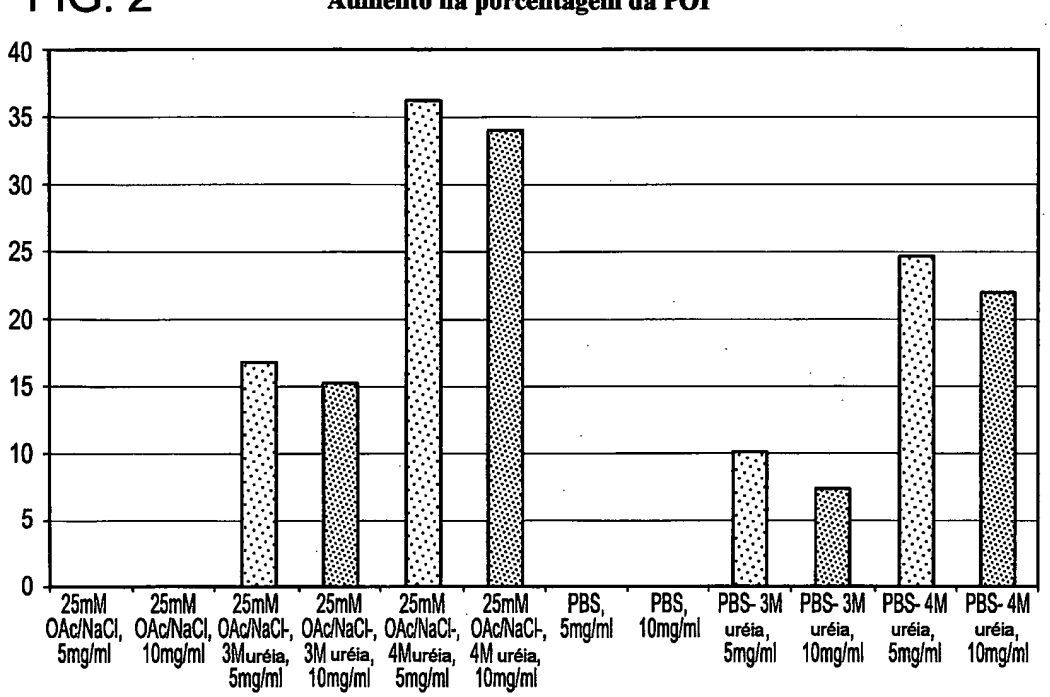

Aumento na porcentagem da POI
40
35
30
25
20
15
10
5
0
25mM OAc/NaCl, 5mg/ml
25mM OAc/NaCl, 10mg/ml
25mM OAc/NaCl, 3M uréia, 5mg/ml
25mM OAc/NaCl, 3M uréia, 10mg/ml
25mM OAc/NaCl, 4M uréia, 5mg/ml
25mM OAc/NaCl, 4M uréia, 10mg/ml
PBS, 5mg/ml
PBS, 10mg/ml
PBS- 3M uréia, 5mg/ml
PBS- 3M uréia, 10mg/ml
PBS- 4M uréia, 5mg/ml
PBS- 4M uréia, 10mg/ml

FIG. 3

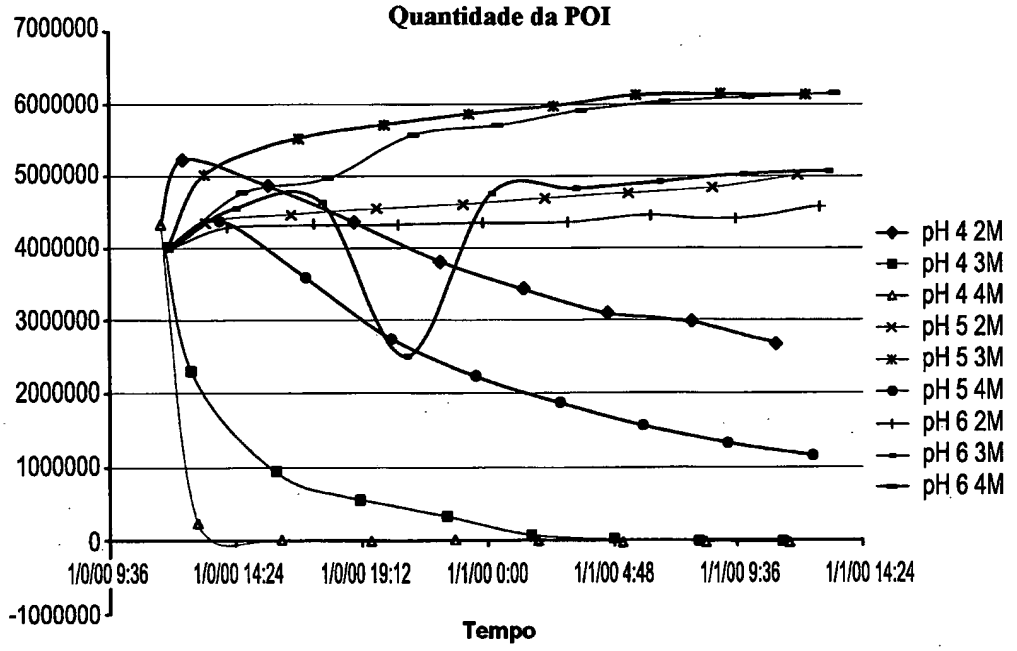
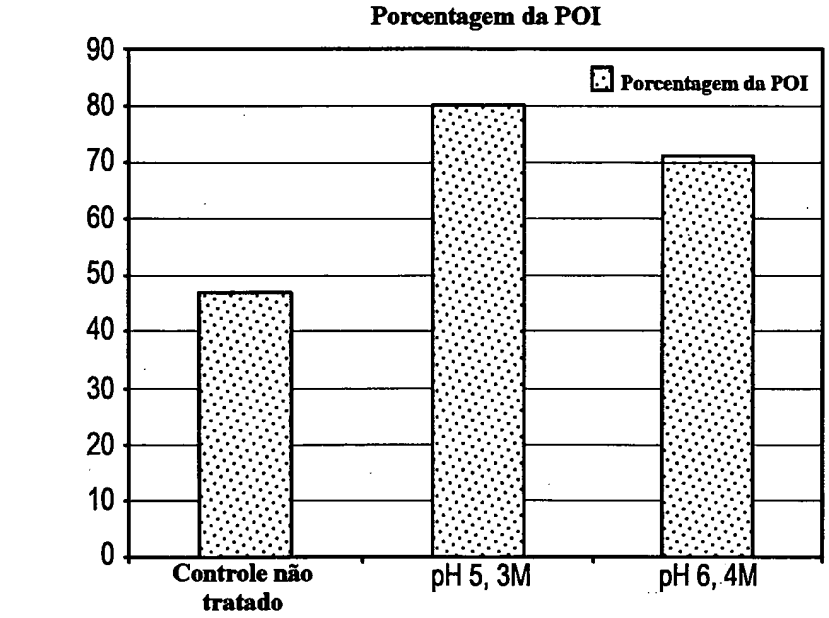
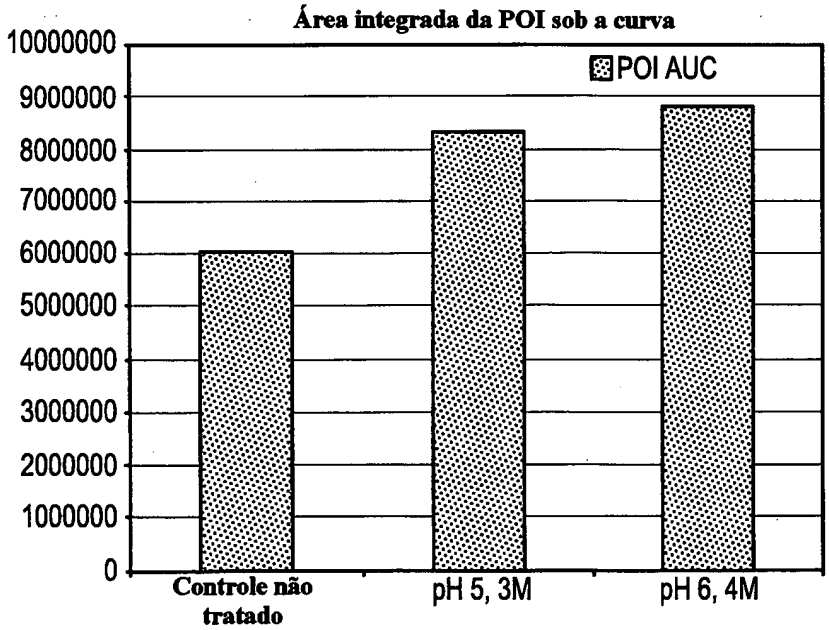

Quantidade da POI
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
-1000000
1/0/00 9:36
1/0/00 14:24
1/0/00 19:12
1/1/00 0:00
1/1/00 4:48
1/1/00 9:36
1/1/00 14:24
Tempo
pH 4 2M
pH 4 3M
pH 4 4M
pH 5 2M
pH 5 3M
pH 5 4M
pH 6 2M
pH 6 3M
pH 6 4M

FIG. 4


Porcentagem da POI
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Porcentagem da POI
Controle não tratado
pH 5, 3M
pH 6, 4M


Área integrada da POI sob a curva
10000000
9000000
8000000
7000000
6000000
5000000
4000000
3000000
2000000
1000000
0
POI AUC
Controle não tratado
pH 5, 3M
pH 6, 4M

PI0613653-2

RESUMO

"COMPOSIÇÕES E MÉTODOS PARA DESAGREGAÇÃO DE PROTEÍNA"

Composições e métodos são providos para obtenção da desagregação das proteínas de ligação incluindo, porém não limitado aos ligantes de proteína, receptores solúveis, anticorpos, fragmentos de anticorpos, anticorpos de cadeia simples de fragmento variável (scFv), e produtos imunofarmacêuticos modulares pequenos (produtos SMIP™). As composições, que são apropriadas para a desagregação de soluções altamente concentradas de proteínas de ligação, contêm um ou mais caótropos, são tipicamente formuladas em um pH ácido e podem ser usadas para prover proteínas de ligação apropriadas para a preparação de composições farmacêuticas e administração in vivo a um paciente.