



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

**(11) PI 0616359-9 B1**



**(22) Data do Depósito: 29/09/2006**

**(45) Data de Concessão: 08/09/2021**

---

**(54) Título:** COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO DE UM ANTICORPO DE IL-13 E USO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO UM ANTICORPO

**(51) Int.Cl.:** A61K 47/02; A61K 47/12; A61K 47/26; A61K 9/00; A61K 39/395; (...).

**(30) Prioridade Unionista:** 30/09/2005 GB 0519923.7; 30/09/2005 US 60/721,974.

**(73) Titular(es):** MEDIMMUNE LIMITED.

**(72) Inventor(es):** BRENDAN, CORMICK ,FISH; JEANETTE, ELIZABETH, LANGSTONE; KAREN, BANNISTER; CLAIRE, LOUISE, HOPE.

**(86) Pedido PCT:** PCT GB2006003650 de 29/09/2006

**(87) Publicação PCT:** WO 2007/036745 de 05/04/2007

**(85) Data do Início da Fase Nacional:** 25/03/2008

**(57) Resumo:** COMPOSIÇÃO DE ANTICORPO DE INTERLEUCINA-13. A presente invenção se refere a urna composição farmacêutica compreendendo um anticorpo de interleucina-13, mais particularmente, um anticorpo monoclonal de interleucina-13, especialmente, um anticorpo monoclonal de interleucina-13 humana, também, a um processo para purificação do dito anticorpo e ao uso do dito anticorpo no tratamento de distúrbios correlacionados à interleucina-13, tais como, asma, dermatite atópica, rinite alérgica, fibrose, doença pulmonar obstrutiva crônica, escleroderma, doença inflamatória do intestino e linfoma de Hodgkin, particularmente, asma.

**"COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO PARA PURIFICAÇÃO DE UM ANTICORPO DE IL-13 E USO DE UMA COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA CONTENDO UM ANTICORPO"**

[001] A presente invenção se refere a uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo de interleucina-13, mais particularmente, um anticorpo monoclonal de interleucina-13, especialmente, um anticorpo monoclonal de interleucina-13 humana, também, a um processo para purificação do dito anticorpo e ao uso do dito anticorpo no tratamento de distúrbios correlacionados à interleucina-13, tal como, a asma.

[002] A interleucina-13 (IL-13) é uma citocina de 114 aminoácidos com uma massa molecular não-modificada de aproximadamente 12 kDa. A IL-13 é mais proximamente correlacionada à IL-4, com a qual compartilha 30% de homologia de seqüência ao nível do aminoácido. O gene da IL-13 humana está localizado no cromossomo 5q31, adjacente ao gene da IL-4 [McKenzie, A.N. *et al.*, J. Immunol., 1993, **150(12)**, 5436-5444; Minty, A. *et al.*, Nature, 1993, **362(6417)**, 248-50].

[003] Embora inicialmente identificada como citocina derivada do linfócito Th2 CD4+, a IL-13 é também produzida por células-T Th1 CD4+, células NK de linfócitos CD8+ T, e populações de células diferentes da célula T, tais como, as células mastócitos, basófilos, eosinófilos, macrófagos, monócitos e as células do músculo liso das vias aéreas.

[004] A IL-13 tem sido correlacionada a um determinado número de doenças, em particular, doenças que são causadas por uma resposta inflamatória. Por exemplo, a administração da IL-13 recombinante às vias aéreas de roedores simples não-sensibilizados foi mostrada como causadora de diversos aspectos do fenótipo da asma, incluindo a inflamação das vias aéreas, produção de muco e hiper-susceptibilidade das vias aéreas (AHR) [Wills-Karp, M. *et al.*, Science, 1998, **282(5397)**,

2258-2261; Grunig, G. *et al.*, *Science*, 1998, **282(5397)**, 2261-2263; Venkayya, R., *et al.*, *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 2002, **26(2)**, 202-208; Morse, B. *et al.*, *Am. J. Physiol., Lung Cell Mol. Physiol.*, 2002, **282(1)**, L44-49]. Um fenótipo similar foi observado em um camundongo transgênico no qual a IL-13 foi especificamente sobreexpressa no pulmão. Nesse modelo, uma exposição mais acentuada à IL-13 também resultou em fibrose [Zhu, Z. *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 1999, **103(6)**, 779-788].

[005] Um determinado número de polimorfismos genéticos no gene da IL-13 foi também correlacionado a doenças alérgicas. Em particular, uma variante do gene da IL-13, em que o resíduo de arginina no aminoácido 130 é substituído por glutamina (Q130R), foi associada com a asma bronquial, dermatite atópica e níveis elevados de soro de IgE [Heinzmann, A. *et al.*, *Hum. Mol. Genet.*, 2000, **9(4)**, 549-559; Howard, T. D. *et al.*, *Am. J. Hum. Genet.*, 2002, **70(1)**, 230-236; Kauppi, P. *et al.*, *Genomics*, 2001, **77(1-2)**, 35-42; Graves, P. E. *et al.*, *J. Allergy Clin. Immunol.*, 2000, **105(3)**, 506-513]. Esta particular variante da IL-13 é também referida como variante Q110R (resíduo de arginina no aminoácido 110 substituído por glutamina) por alguns grupos que excluem a seqüência de sinal do aminoácido 20 da contagem do aminoácidos.

[006] A produção da IL-13 foi também associada com a asma alérgica [van der Pouw Kraan, T. C. *et al.*, *Genes Immun.*, 1999, **1(1)**, 61-65] e elevados níveis da IL-13 foram medidos em pessoas humanas com rinite atópica (febre do feno), dermatite alérgica (eczema) e sinusite crônica.

[007] Além da asma, a IL-13 foi associada a outros condicionamentos fibróticos. Os níveis elevados da IL-13, até 1000 vezes maior que da IL-4, foram medidos no soro de pacientes com esclerose sistêmica e em amostras de lavagem interna bronco-alveolar

(BAL) de pacientes afetados com outras formas de fibrose pulmonar [Hasegawa, M. *et al.*, J. Rheumatol., 1997, **24(2)**, 328-332; Hancock, A. *et al.*, Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., 1998, **18(1)**, 60-65].

[008] Foi demonstrado que a sobreexpressão da IL-13 no pulmão de camundongo provocou enfisema, elevada produção de muco e inflamação, refletindo aspectos da doença pulmonar obstrutiva crônica (COPD) [Zheng, T. *et al.*, J. Clin. Invest., 2000, **106(9)**, 1081-1093].

[009] Foi proposto que a IL-13 pode também desempenhar um importante papel na patogênese da doença inflamatória do intestino [Heller, F. *et al.*, Immunity, 2002, **17(5)**, 629-38] e elevados níveis da IL-13 foram detectados no soro de alguns pacientes da doença de Hodgkin, quando comparado aos controles normais [Fiumara, P. *et al.*, Blood, 2001, **98(9)**, 2877-2878].

[0010] Os inibidores de IL-13 são também acreditados como sendo terapêuticamente úteis na prevenção de reincidência ou metástase de tumores [Terabe, M. *et al.*, Nat. Immunol., 2000, **1(6)**, 515-520]. A inibição da IL-13 foi também mostrada como reforço de vacinas antivirais em modelos de animais, podendo ser benéfica no tratamento de HIV e outras doenças infecciosas [Ahlers, J. D. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2002, **99(20)**, 13020-13025].

[0011] Uma abordagem dirigida ao anticorpo para inibição da IL-13 foi descrita. Por exemplo, o documento de patente WO 2005/007699 (Cambridge Antibody Technology Limited) descreve uma série de moléculas de anticorpo anti-IL-13 humana, que são mostradas para neutralizar a atividade da IL-13 e que são reivindicadas como sendo de uso potencial no tratamento de distúrbios correlacionados à IL-13,

[0012] De acordo com um primeiro aspecto da invenção, é proporcionada uma composição farmacêutica compreendendo um anticorpo de IL-13 e um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis, tamponados para um pH entre 4,5-6,0 com um tampão de

acetato.

[0013] É normalmente conhecido que procedimentos de purificação de anticorpo, tipicamente, requerem um determinado número de técnicas de separação, tais como, separações por cromatografia (por exemplo, cromatografia da Proteína A, cromatografia por troca de íons e similares). Uma consequência desse modo de separação requer o uso de um certo número de diferentes tampões. Por exemplo, o procedimento de purificação de anticorpo descrito no documento de patente WO 2004/076485 requer o uso de glicina/glicinato 50mM, pH de 8,0, para a cromatografia da Proteína A, Tris-HCl 50mM, pH de 8,0 e fosfato de sódio 20mM, pH de 6,5, para a cromatografia de Q-Sefarose, e Tris-HCl 25mM, pH de 8,6, para cromatografia DEAE-sefarose.

[0014] Ao contrário, a presente invenção requer o uso de um simples tampão de acetato em uma concentração fixa e em um predeterminado pH presente na dita composição, o que traz a vantagem de estar presente em todas as etapas de purificação de anticorpo de IL-13, Assim, o uso desse tampão, não apenas no começo do processo de purificação, mas também em todo o processo de purificação, resulta, portanto, numa redução do tempo de processamento, de custo e aumento de produção do produto.

[0015] Deverá ser observado que as referências ao "anticorpo" incluem as referências a uma imunoglobulina, natural ou produzida parcial ou totalmente sintética. O termo também cobre qualquer polipetídeo ou proteína compreendendo um domínio de ligação a antígeno.

[0016] Fragmentos de anticorpos que compreendem um domínio de ligação a antígeno são moléculas, tais como, Fab, scFv, Fv, dAb, Fd; e *diabodies* (dímeros de scFv).

[0017] É possível se tomar anticorpos monoclonais e outros anticorpos e se utilizar técnicas de tecnologia de DNA recombinante

para produzir outros anticorpos ou moléculas quiméricas que retenham a especificidade do anticorpo original. Essas técnicas podem envolver a introdução de codificação do DNA na região de imunoglobulina variável ou em regiões de determinação de complementaridade (CDRs), de um anticorpo para as regiões constantes ou regiões constantes mais regiões de estrutura de uma diferente imunoglobulina. Consultar, por exemplo, os documentos de patentes EP-A-184187, GB 2,188,638-A ou EP-A-239400, e uma ampla variedade de literatura subsequente.

[0018] Alternativamente, novas regiões de VH ou VL portadoras de seqüências derivadas de CDR podem ser geradas usando mutagênese aleatória de um ou mais genes selecionados de VH e/ou VL, a fim de gerar mutações em todo o domínio variável. Essa técnica é descrita por Gram *et al.*, PNAS, USA, 1992, **89**, 3576-3580, que utiliza PCR de propensão a erro. Outro método que pode ser usado é dirigir a mutagênese para regiões de CDR de genes VH e VL. Essas técnicas são divulgadas por Barbas *et al.*, PNAS, USA, 1994, **91**, 3809-3813 e Schier *et al.*, J. Mol. Biol., 1996, **263**, 551-567.

[0019] Como os anticorpos podem ser modificados de diversas maneiras, o termo "anticorpo" deve ser considerado como cobrindo qualquer elemento de ligação específica ou substância tendo um domínio de ligação a antígeno, com a necessária especificidade. Assim, esse termo cobre os fragmentos e derivados de anticorpos, incluindo qualquer polipetídeo que compreenda um domínio de ligação a imunoglobulina, tanto natural como total ou parcialmente sintética. As moléculas quiméricas compreendendo um domínio de ligação a imunoglobulina ou equivalente, fundidas a outro polipetídeo, são, portanto, incluídas. A clonagem e expressão de anticorpos quiméricos são descritas nos documentos de patentes EP-A-0120694 e EP-A-0125023 e numa ampla variedade de literatura subsequente.

[0020] Outros procedimentos disponíveis no estado da técnica de

engenharia de anticorpos tornou possível se isolar anticorpos humanos e humanizados. Por exemplo, os hibridomas humanos podem ser feitos conforme descrito por Kontermann *et al.*, [2001; Antibody Engineering, Springer Laboratory Manuals]. A exibição do fago, uma outra técnica estabelecida para a geração de elementos de ligação específica, foi descrita em detalhes em diversas publicações, tais como, Kontermann *et al.* (supra) e documento de patente W0 92/01047, Camundongos transgênicos, em que os genes do anticorpo do camundongo são inativados e funcionalmente substituídos por genes de anticorpo humano, deixando intacto outros componentes do sistema imune do camundongo, podem ser usados para isolamento de anticorpos humanos em antígenos humanos. A exibição do ribossomo, uma tecnologia de translação isento de célula que introduz mutações em seqüências de genes conhecidas, pode também ser usada para gerar e/ou otimizar elementos de ligação específica [Hanes e Plückthun, PNAS, USA, 1994, **94**, 4937-4942; He and Taussig Nucleic Acids Res., 1997, **25**, 5132-5134; Schaffitzel *et al.*, J. Immunol. Methods, 1999, **231**, 119-135; He *et al.*, J. Immunol. Methods, 1999, **231**, 105-117; He *et al.*, Methods Mol. Biol., 2004, **248**, 177-189].

[0021] As moléculas de anticorpos sintéticos podem ser criadas pela expressão de genes gerados por meio de oligonucleotídeos sintetizados e construídos com adequados vetores de expressão, por exemplo, conforme descrito por Knappik *et al.*, J. Mol. Biol., 2000, **296**, 57-86 ou por Krebs *et al.*, Journal of Immunological Methods, 2001, **254**, 67-84,

[0022] Foi mostrado que os fragmentos de um anticorpo inteiro podem executar a função de antígenos de ligação. Exemplos de fragmentos de ligação são: (i) o fragmento Fab, consistindo de domínios de VL, VH, CL e CH1; (ii) o fragmento Fd, consistindo de domínios de VH e CH1; (iii) o fragmento Fv, consistindo de domínios de VL e VH de

um único anticorpo; (iv) o fragmento dAb [Ward, E. S. *et al.*, *Nature*, 1989, **341**, 544-546; McCafferty *et al.*, *Nature*, 1990, **348**, 552-554; Holt *et al.*, *Trends Biotechnol.* 2003, **21(11)**, 484-490] que consiste de um domínio de VH ou VL; (v) regiões de CDR isoladas; (vi) F(ab'), 2 fragmentos, um fragmento bivalente compreendendo dois fragmentos de Fab ligados; (vii) moléculas de Fv de cadeia única (scFv), onde um domínio de VH e um domínio de VL são ligados por um ligador de peptídeo que permite aos dois domínios se associarem para formar um local de ligação a antígeno [Bird *et al.*, *Science*, 1988, **242**, 423-426; Huston *et al.*, *PNAS, USA*, 1988, **85**, 5879-5883]; (viii) dímeros de Fv de cadeia bi-específica única (documento de patente PCT/US92/09965); e (ix) "*diabodies*", fragmentos multivalentes ou multi-específicos construídos por meio de fusão de genes [documento de patente WO 94/13804; P. Holliger *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1993, **90**, 6444-6448]. As moléculas Fv, scFv ou moléculas de *diabody* podem ser estabilizadas mediante incorporação de ligações ou pontes de dissulfeto, que ligam os domínios de VH e VL [Y. Reiter *et al.*, *Nature Biotech.*, 1996, **14**, 1239-1245]. Minicorpos compreendendo uma scFv unida a um domínio de CH3 podem também ser feitos [S. Hu *et al.*, *Cancer Res.*, 1996, **56**, 3055-3061].

[0023] Quando anticorpos bi-específicos devem ser usados, estes podem ser anticorpos bi-específicos convencionais, os quais podem ser fabricados de uma variedade de maneiras [Holliger and Winter *Current Opinion Biotechnol.*, 1993, **4**, 446-449], por exemplo, preparados quimicamente ou a partir de hibridomas híbridos ou podem ser quaisquer dos fragmentos de anticorpos bi-específicos mencionados acima. Exemplos de anticorpos bi-específicos incluem aqueles da tecnologia BiTE, em que os domínios de ligação de dois anticorpos com diferente especificidade podem ser usados e diretamente ligados através de curtos peptídeos flexíveis. Isto combina dois anticorpos em

uma única cadeia de polipetídeo curta. Os *diabodies* e scFv podem ser construídos sem uma região de Fc, usando apenas domínios variáveis, reduzindo potencialmente os efeitos da reação anti-idiotípica.

[0024] Os *diabodies* bi-específicos, que se opõem a todos os anticorpos bi-específicos, podem ser também particularmente úteis, pelo fato de poderem ser facilmente reconstruídos e expressos na *E. coli*. Os *diabodies* (e muitos outros polipetídeos, como os fragmentos de anticorpos) de apropriada especificidade de ligação podem ser facilmente selecionados usando a exibição de fagos (conforme descrito no documento de patente W0 94/13804) a partir das bibliotecas. Se um braço do *diabody* é para ser mantido constante, por exemplo, com uma especificidade dirigida contra a IL-13, então pode ser feita uma biblioteca onde o outro braço é variado, sendo selecionado um anticorpo de apropriada especificidade. Anticorpos inteiramente bi-específicos podem ser feitos através da engenharia do tipo "botões-em-furos" [Ridgeway *et al.*, Protein Eng., 1996, **9**, 616-621].

[0025] Deverá ser observado que as referências a um "anticorpo de IL-13" incluem as referências a um inteiro anticorpo ou fragmento de anticorpo que é capaz de neutralizar uma IL-13 de ocorrência natural, numa concentração inferior a 500nM, conforme os ensaios estabelecidos nos Exemplos 2-10 e 25 do documento de patente WO 2005/007699,

[0026] Preferivelmente, o anticorpo de IL-13 neutraliza a IL-13 de ocorrência natural com uma atividade farmacológica que é igual ou melhor que a atividade farmacológica de um local de ligação a um antígeno de IL-13, formado pelo domínio BAK502G9 VH (SEQ ID NO:15, no documento de patente WO 2005/007699) e domínio BAK502G9 VL (SEQ ID NO:16, no documento de patente WO 2005/007699).

[0027] Preferivelmente, o anticorpo de IL-13 é um anticorpo

monoclonal de IL-13, mais preferivelmente, um anticorpo monoclonal de IL-13 humano.

[0028] Um anticorpo de IL-13 particularmente preferido é um anticorpo selecionado dentre aqueles descritos nos documentos de patentes WO 2003/035847, WO 2003/086451, WO 2005/007699 ou WO 2005/081873.

[0029] Por exemplo, em uma modalidade particularmente preferida, o anticorpo de IL-13 é BAK278D6 HCDR1-3 e LCDR1-3 (SEQ ID NOS: 1-6, no documento de patente WO 2005/007699, respectivamente). Um conjunto de CDR's com o conjunto de BAK278D6 de CDR's, conjunto BAK278D6 de HCDR's ou BAK278D6 LCDR's, ou uma ou duas substituições no mesmo, é dito como sendo da linha celular BAK278D6.

[0030] Numa outra modalidade particularmente preferida, o anticorpo de IL-13 é BAK502G9 HCDR1-3 e LCDR1-3 (SEQ ID NOS: 7-12, no documento de patente WO 2005/007699, respectivamente).

[0031] Ainda numa outra modalidade particularmente preferida, o anticorpo de IL-13 é BAK1111D10 HCDR1-3 e LCDR1-3 (SEQ ID NOS: 91-96, no documento de patente WO 2005/007699, respectivamente).

[0032] Em ainda outra modalidade particularmente preferida, o anticorpo de IL-13 é BAK1167F2 HCDR1-3 e LCDR1-3 (SEQ ID NOS: 61-66, no documento de patente WO 2005/007699, respectivamente).

[0033] Ainda numa outra modalidade particularmente preferida, o anticorpo de IL-13 é BAK1183H4 HCDR1-3 e LCDR1-3 (SEQ ID NOS: 97-102, no documento de patente WO 2005/007699, respectivamente).

[0034] O adequado conjunto de CDR's é provido dentro de regiões de estrutura de anticorpo ou de outras armações de proteínas, por exemplo, fibronectina ou citocromo B [Koide *et al.*, J. Mol. Biol., 1998, **284**, 1141-1151; Nygren *et al.*, Current Opinion in Structural Biology, 1997, **7**, 463-469]. Preferivelmente, são empregadas regiões de estrutura de anticorpo, e quando são empregadas, elas são

preferivelmente da linha de microorganismos, mais preferivelmente, a região de estrutura de anticorpo para cadeia pesada pode ser a DP14 da família VH1, A região de estrutura preferida para cadeia leve pode ser  $\lambda$ 3-3H. Para o conjunto BAK502G9 de CDR's, é preferido que as regiões de estrutura de anticorpo sejam para VH FR1-3, as SEQ ID NOS: 27-29, no documento de patente WO 2005/007699, respectivamente, e para cadeia leve FR1-3, as SEQ ID NOS: 30-32, no documento de patente WO 2005/007699, respectivamente. Numa modalidade preferida, um domínio de VH é provido com a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 15, no documento de patente WO 2005/007699, este sendo chamado de "domínio de VH BAK502G9". Numa outra modalidade altamente preferida, é provido um domínio de VL com a seqüência de aminoácidos da SEQ ID NO: 16, no documento de patente WO 2005/007699, este sendo chamado de "domínio de VL BAK502G9".

[0035] Numa modalidade preferida, o anticorpo de IL-13 reage de forma cruzada com o cinomólogo de IL-13 e/ou a variante de IL-13, Q130R.

[0036] Preferivelmente, o anticorpo de IL-13 está presente na composição farmacêutica numa quantidade entre 1 e 200 mg/mL, mais preferivelmente, entre 50 e 100 mg/mL, especialmente, 50 mg/mL.

[0037] Preferivelmente, a composição farmacêutica é tamponada para um pH de 5,2 a 5,7, mais preferivelmente, de  $5,5 \pm 0,1$ . A seleção de tal pH confere uma significativa estabilidade para a composição farmacêutica. Exemplos de tampões alternativos que controlam o pH nessa faixa, incluem os tampões de succinato, gliconato, histidina, citrato, fosfato, glutárico, cacodilite, maleato ácido de sódio, tris-(hidroximetil)aminometano (Tris), ácido 2-(N-morfolino)etanossulfônico (MES), imidazol e outros tampões de ácidos orgânicos.

[0038] Preferivelmente, o tampão é um tampão de acetato, mais

preferivelmente, acetato de sódio.

[0039] Preferivelmente, o tampão de acetato está presente na composição farmacêutica numa quantidade entre 1 e 100mM, mais preferivelmente, entre 30 e 70 mM, especialmente, 50 mM.

[0040] Deverá ser observado que as referências a um "excipiente farmacêuticamente aceitável" inclui as referências a qualquer excipiente convencionalmente usado nas composições farmacêuticas. Esses excipientes podem, tipicamente, incluir um ou mais dentre tensoativos, sal inorgânico ou orgânico, estabilizador, diluente, solubilizador, agente redutor, antioxidante, agente quelante, conservante e similares.

[0041] Exemplos de um tensoativo típico incluem: - tensoativos não-iônicos (HLB 6 a 18), tais como, ésteres de ácido graxo de sorbitan (por exemplo, monocaprilato de sorbitan, monolaurato de sorbitan, monopalmitato de sorbitan), ésteres de ácido graxo de glicerina (por exemplo, monocaprilato de glicerina, monomiristato de glicerina, monoestearato de glicerina), ésteres de ácido graxo de poliglicerina (por exemplo, monoestearato de decaglicerila, diestearato de decaglicerila, monolinoleato de decaglicerila), ésteres de ácido graxo de sorbitan-polioxietileno (por exemplo, monolaurato de sorbitan-polioxietileno, monooleato de sorbitan-polioxietileno, monoestearato de sorbitan-polioxietileno, monopalmitato de sorbitan-polioxietileno, trioleato de sorbitan-polioxietileno, triestearato de sorbitan-polioxietileno), ésteres de ácido graxo de sorbitol-polioxietileno (por exemplo, tetraestearato de sorbitol-polioxietileno, tetraoleato de sorbitol-polioxietileno), ésteres de ácido graxo de glicerina-polioxietileno (por exemplo, monoestearato de gliceril-polioxietileno), ésteres de ácido graxo de polietilenoglicol (por exemplo, diestearato de polietilenoglicol), éteres alquílicos de polioxietileno (por exemplo, éter laurílico de polioxietileno), éteres alquílicos de polioxietileno-polioxipropileno (por exemplo, éter de polioxietileno-polioxipropilenoglicol, éter propílico de polioxietileno-

polioxipropileno, éter cetílico de polioxietileno-polioxipropileno), éteres alquilfenílicos de polioxietileno (por exemplo, éter nonilfenílico de polioxietileno), óleos de mamona hidrogenado-polioxietileno (por exemplo, óleo de mamona-polioxietileno, óleo de mamona hidrogenado-polioxietileno), derivados de cera de abelha-polioxietileno (por exemplo, cera de abelha de sorbitol-polioxietileno), derivados de lanolina-polioxietileno (por exemplo, lanolina-polioxietileno), e amidas de ácido graxo de polioxietileno (por exemplo, estearil-amida de polioxietileno); - tensoativos aniônicos, tais como, sais de sulfato de C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> alquila (por exemplo, sulfato de cetil sódico, sulfato de lauril sódico, sulfato de oleil sódico), sais de sulfato de éter de polioxietileno C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub> alquila, com uma média de 2 a 4 moles de óxido de etileno (por exemplo, sulfato de lauril-polioxietileno sódico), e sais de éster de sulfosuccinato de C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub> alquila (por exemplo, éster de sulfosuccinato de lauril sódico); e tensoativos naturais, tais como, lecitina, glicero-fosfolípideo, esfingo-fosfolípideos (por exemplo, esfingo-mielina), e ésteres de sacarose de ácidos C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub> graxos.

[0042] Preferivelmente, o tensoativo é selecionado de ésteres de ácido graxo de sorbitan-polioxietileno. Particularmente e preferivelmente, o tensoativo é Polissorbato 20, 21, 40, 60, 65, 80, 81 e 85, mais preferivelmente, Polissorbato 20 e 80, especialmente, Polissorbato 80,

[0043] Preferivelmente, o tensoativo está presente na composição farmacêutica numa quantidade entre 0,001 e 0,1% (peso/peso), mais preferivelmente, entre 0,005 e 0,05 (peso/peso), especialmente, numa quantidade de 0,01% (peso/peso).

[0044] Exemplos de um sal inorgânico típico incluem: cloreto de sódio, cloreto de potássio, cloreto de cálcio, fosfato de sódio, sulfato de sódio, sulfato de amônio, fosfato de potássio e bicarbonato de sódio ou qualquer outro sal de sódio, potássio ou cálcio. Preferivelmente, o sal

inorgânico é cloreto de sódio.

[0045] Preferivelmente, o sal inorgânico está presente na composição farmacêutica numa quantidade entre 10 e 200mM, mais preferivelmente, entre 60 e 130mM, especialmente, numa quantidade de 85mM.

[0046] Exemplos de um agente redutor incluem N-acetil-cisteína, N-acetil-homocisteína, ácido tiótico, tioglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiossorbitol, ácido tioglicólico e um sal do mesmo, tiosulfato de sódio, glutatona e um ácido C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub> tioalcanóico.

[0047] Exemplos de um antioxidante incluem ácido eritórbico, dibutilidroxitolueno, butilidroxianisol, alfa-tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico e um sal do mesmo, palmitato de ácido L-ascórbico, estearato de ácido L-ascórbico, bissulfito de sódio, sulfito de sódio, galato de triamila e galato de propila.

[0048] Exemplos de um agente quelante incluem etilenodiaminotetraacetato dissódico (EDTA), pirofosfato de sódio e metafosfato de sódio.

[0049] Exemplos de um estabilizador incluem creatinina, um aminoácido selecionado de histidina, alanina, ácido glutâmico, glicina, leucina, fenilalanina, metionina, isoleucina, prolina, ácido aspártico, arginina, lisina e treonina, um carboidrato selecionado de sacarose, trealose, sorbitol, xilitol e manose, tensoativos selecionados de polietilenoglicol (PEG; por exemplo, PEG3350 ou PEG4000) ou ésteres de ácido graxo de sorbitan-polioxietileno (por exemplo, Polissorbato 20 ou Polissorbato 80), ou qualquer combinação dos mesmos.

[0050] Numa modalidade preferida, o estabilizador compreende um único carboidrato, conforme anteriormente definido (por exemplo, trealose).

[0051] Numa modalidade alternativamente preferida, o estabilizador compreende uma combinação de aminoácidos com um carboidrato (por

exemplo, trealose e alanina ou trealose, alanina e glicina).

[0052] Numa outra modalidade alternativamente preferida, o estabilizador compreende um aminoácido em combinação com um carboidrato e um tensoativo (por exemplo, trealose, alanina e PEG350, ou trealose, prolina e PEG350, ou trealose, alanina e Polissorbato 80, ou trealose, prolina e Polissorbato 80, ou trealose, alanina, glicina e PEG3350, ou trealose, alanina, glicina e Polissorbato 80).

[0053] Ainda numa outra modalidade alternativamente preferida, o estabilizador compreende um aminoácido em combinação com um tensoativo (por exemplo, alanina e PEG3350 ou alanina, glicina e PEG3350).

[0054] Ainda numa outra modalidade alternativamente preferida, o estabilizador compreende um carboidrato em combinação com um tensoativo (por exemplo, trealose e PEG3350 ou trealose e Polissorbato 80).

[0055] Exemplos de um conservante incluem cloreto de octadecildimetilbenzil-amônio, cloreto de hexametônio, cloreto de benzalcônio (uma mistura de cloretos de alquilbenzildimetilamônio, em que os grupos alquila são compostos de cadeia longa), cloreto de benzetônio, alcoóis aromáticos, tais como, fenol, álcool butílico e álcool benzílico, alquil-parabens, tais como, metil ou propil-paraben, catecol, resorcinol, cicloexanol, 3-pentanol e m-cresol.

[0056] Numa modalidade preferida da invenção, a composição farmacêutica compreende um anticorpo de IL-13, um tensoativo e um sal inorgânico, tamponados para um pH de  $5,5 \pm 0,1$ , com um tampão de acetato.

[0057] Numa adicional modalidade preferida da invenção, a composição farmacêutica compreende um anticorpo de IL-13 e Polissorbato 80, tamponados para um pH de  $5,5 \pm 0,1$ , com, um tampão de acetato de sódio.

[0058] Ainda numa outra modalidade preferida da invenção, a composição farmacêutica compreende 50mg/mL de um anticorpo de IL-13, cloreto de sódio a 85mM e Polissorbato 80 a 0,01% (peso/peso), tamponados para um pH de  $5,5 \pm 0,1$ , com um tampão de acetato de sódio a 50mM.

[0059] De acordo com um segundo aspecto da invenção, é proporcionado um processo para purificação de um anticorpo de IL-13, cujo processo compreende uma ou mais etapas de separação cromatográfica, em que cada das ditas etapas de separação compreende a eluição com um tampão de eluição, o qual compreende um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis, tamponados para um pH de 3,5-7,0 com um tampão de acetato.

[0060] Preferivelmente, a um ou mais etapas de separação cromatográfica são selecionadas de cromatografia de afinidade (por exemplo, cromatografia de afinidade da Proteína A ou Proteína G), cromatografia de troca de íons (por exemplo, cromatografia de troca de cátion e anion), cromatografia de interação hidrofóbica (por exemplo, cromatografia de fenila), cromatografia de hidroxapatita, cromatografia de exclusão de tamanho, cromatografia de afinidade de metal imobilizado, cromatografia de interação hidrofílica, cromatografia de adsorção tiofílica, cromatografia de adsorção de euglobulina, cromatografia de ligando de corante, ou cromatografia de boronato imobilizado. De modo mais preferível, a separação cromatográfica é executada por cromatografia de afinidade da Proteína A, seguida de cromatografia de troca de cátion (por exemplo, usando uma matriz de SP-sefarose), seguido de cromatografia de troca de anion (por exemplo, usando uma matriz de Q-sefarose).

[0061] Preferivelmente, o um ou mais excipientes farmacêuticamente aceitáveis compreendem um sal inorgânico, tal como, cloreto de sódio.

[0062] Preferivelmente, o sal inorgânico está presente no tampão de eluição numa quantidade entre 10 e 200mM, mais preferivelmente, entre 60 e 130mM, especialmente, numa quantidade de 85mM.

[0063] Exemplos de tampões alternativos que controlam o pH na faixa de 3,5-7,0 incluem os tampões de succinato, gliconato, histidina, citrato, fosfato e outros tampões de ácidos orgânicos.

[0064] Preferivelmente, o tampão é um tampão de acetato, mais preferivelmente, de acetato de sódio.

[0065] Preferivelmente, o tampão de acetato está presente no tampão de eluição numa quantidade entre 1 e 100mM, mais preferivelmente, entre 30 e 70mM, especialmente, numa quantidade de 50mM.

[0066] Mais preferivelmente, o tampão de eluição compreende acetato de sódio a 50mM, e cloreto de sódio a 85mM, tamponados para um pH de  $5,5 \pm 0,1$ .

[0067] Um ácido nucléico que codifica qualquer anticorpo de IL-13 da invenção (por exemplo, CDR ou um conjunto de CDRs, ou um domínio de VH ou domínio de VL, ou um local de ligação a antígeno de anticorpo ou molécula de anticorpo, por exemplo, scFv ou IgG4, conforme fornecido), pode ser expresso mediante cultura sob apropriadas condições de células recombinantes hospedeiras contendo o referido ácido nucléico. Após a produção mediante expressão de um domínio de VH ou VL ou de elemento de ligação específica, pode ser isolado e/ou purificado usando qualquer técnica adequada, conforme apropriado.

[0068] Elementos de ligação específica, domínios de VH e/ou VL e moléculas e vetores codificadores de ácido nucléico podem ser fornecidos isolados e/ou purificados, por exemplo, a partir de seu ambiente natural, numa forma substancialmente pura ou homogênea ou, no caso do ácido nucléico, livre ou substancialmente livre de ácido

nucléico ou gene de origem diferente da seqüência codificadora de um polipetídeo com a necessária função. O ácido nucléico pode compreender DNA ou RNA e pode ser total ou parcialmente sintético.

[0069] Uma referência a uma seqüência de nucleotídeo conforme aqui estabelecida, inclui uma molécula de DNA com a seqüência especificada e uma molécula de RNA com a seqüência especificada, em que U é substituído por T, a menos que o contexto requeira de outro modo.

[0070] Os sistemas para clonagem e expressão de um polipetídeo em uma variedade de diferentes células hospedeiras são bem conhecidos. Adequadas células hospedeiras incluem as bactérias, células de mamíferos, células de plantas, leveduras e sistemas de baculovirus, e plantas transgênicas e animais.

[0071] As linhas celulares de mamíferos disponíveis no segmento da técnica para expressão de um polipetídeo heterólogo incluem as células de ovário de criceto Chinês (CHO), as células HeLa, células de rins de criceto recém-nascido, células de melanoma de camundongo NS0, células de mieloma de rato YB2/0, células de rins embriônicos humanos, células de retina embriônica humana e muitas outras.

[0072] Preferivelmente, a dita linha celular de mamífero é uma cultura de célula de mieloma, tal como, células de NS0 [Galfre and Milstein Methods Enzymology, 1981, **73**, 3]. As células de mieloma são células de plasmacitoma, isto é, células da linhagem de célula de linfóide. Um exemplo da linha celular NS0 é, por exemplo, a linha celular ECACC No. 85110503, livremente disponível da European Collection of Cell Cultures (ECACC), Centre for Applied Microbiology & Research, Salisbury, Wiltshire, SP4 0JG, Reino Unido. A linha celular NS0 foi descoberta como sendo capaz de proporcionar o surgimento de rendimentos de produtos extremamente altos, em particular, se usada para a produção de anticorpos recombinantes.

[0073] Uma linha celular de mamífero alternativamente preferida inclui as células de ovário de criceto Chinês (CHO). Estas células podem ser deficientes de diidrofolato redutase (dhfr) e, assim, dependentes da timidina e hipoxantina para o crescimento [PNAS, 1990, **77**, 4216-4220]. A linha celular parental de CHO dhfr é transfectada com o gene de anticorpo e o gene dhfr, o que possibilita a seleção de transformantes de célula CHO de fenótipo positivo de dhfr. A seleção é realizada mediante cultura de colônias em um meio desprovido de timidina e hipoxantina, cuja ausência impede que as células não-transformadas cresçam e as células transformadas tornem a se recuperar do caminho de folato, dessa forma, escapando do sistema de seleção. Esses transformantes normalmente expressam baixos níveis do gene produto, em virtude da co-integração de ambos os genes transfectados. Os níveis de expressão do gene de anticorpo podem ser aumentados através de ampliação, usando metotrexato (MTX). Esta droga é um inibidor direto da enzima dhfr e permite o isolamento de colônias resistentes que amplificam seu número de cópias de gene de dhfr de modo suficiente, para sobreviver sob essas condições. Uma vez que a diidrofolato redutase (dhfr) e os genes de anticorpo estão mais proximamente ligados nos transformantes originais, ocorre uma ampliação normalmente concomitante e, portanto, um aumento de expressão do desejado gene de anticorpo.

[0074] Outro sistema de seleção para uso com células de CHO ou células de mieloma é o sistema de ampliação de glutamina sintetase (GS) descrito no documento de patente WO 87/04462, Esse sistema envolve a transfecção de uma célula com um gene codificador da enzima GS e o desejado gene de anticorpo. As células são depois selecionadas, crescendo em um meio isento de glutamina. Estas células selecionadas são depois submetidas à inibição da enzima GS usando metionina-sulfoximina (MSX). As células, a fim de sobreviverem, irão

ampliar o gene GS com a simultânea ampliação do gene codificador do anticorpo.

[0075] A expressão de anticorpos e fragmentos de anticorpos em células procarióticas, tais como, *E. coli*, é bem estabelecida no segmento da técnica. Para uma melhor análise, consultar, por exemplo, Pluckthun A., *Bio/Technology*, 1991, **9**, 545-551, A expressão em células eucarióticas na cultura é também disponível para os especialistas versados na técnica como uma opção de produção de um elemento de ligação específica, por exemplo, conforme descrito por [Chadd H.E. e Chamow S.M., *Current Opinion in Biotechnology*, 2001, **12**, 188-194; Andersen D.C. e Krummen L., *Current Opinion in Biotechnology*, 2002, **13**, 117; Larrick J.W. e Thomas D.W., *Current opinion in Biotechnology* 2001, **12**, 411-418].

[0076] Adequados vetores podem ser escolhidos ou construídos, contendo apropriadas seqüências reguladoras, incluindo seqüências promotoras, seqüências terminadoras, seqüências de poliadenilação, seqüências reforçadoras, genes marcadores e outras seqüências, caso apropriado. Os vetores podem ser plasmídeos, por exemplo, "fago ou fagemídeo", caso apropriado. Para maiores detalhes, consultar, por exemplo, a publicação "Molecular Cloning: a Laboratory Manual"; 3ª. edição, Sambrook e Russell, 2001, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Diversas técnicas e protocolos conhecidos para manipulação de ácido nucléico, por exemplo, na preparação de construções de ácido nucléico, em mutagênese, sequenciamento, introdução de DNA em células e expressão de gene, e análise de proteínas, são descritas em detalhes nas publicações "Current Protocols in Molecular Biology", 2ª. Edição, Ausubel *et al.*, editores, John Wiley & Sons, 1988; "Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology", Ausubel *et al.*, editores, John Wiley & Sons, 4a. Edição, 1999, As divulgações de Sambrook *et al.* E de

Ausubel *et al.* (ambas) são aqui incorporadas por meio dessas referências.

[0077] A introdução de um ácido nucléico em uma célula hospedeira pode utilizar qualquer técnica disponível. Para as células eucarióticas, técnicas adequadas podem incluir a transfecção de fosfato de cálcio, eletroporação por DEAE-Dextrano, transfecção e transdução mediadas por lipossomo usando retrovírus ou outros vírus, por exemplo, vacina, ou para células de insetos, baculovirus. A introdução de ácido nucléico na célula hospedeira, em particular, numa célula eucariótica, pode utilizar um sistema viral ou à base de plasmídeo. O sistema de plasmídeo pode ser mantido episomalmente ou pode ser incorporado na célula hospedeira ou em um cromossomo artificial [Csonka E. *et al.*, *Journal of Cell Science*, 2002, **113**, 3207-3216; Vanderbyl S. *et al.*, *Molecular Therapy*, 2002, **5 (5)**, 10]. A incorporação pode ser aleatória ou uma integração almejada de uma ou mais cópias em um lugar específico único ou múltiplo. Para as células bacterianas, técnicas adequadas podem incluir transformação com cloreto de cálcio, eletroporação e infecção, usando bacteriófagos.

[0078] A introdução pode ser seguida por provocação ou permissão de expressão do ácido nucléico, por exemplo, mediante cultura de células hospedeiras, sob condições para expressão de gene.

[0079] Em uma modalidade, o ácido nucléico da invenção é integrado ao genoma (por exemplo, cromossomo) da célula hospedeira.

[0080] A integração pode ser promovida através da inclusão de seqüências que promovem a recombinação com o genoma, em conformidade com técnicas padrões.

[0081] De acordo com um terceiro aspecto da invenção, é proporcionado o uso de uma composição farmacêutica contendo um anticorpo, conforme anteriormente definido, na fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio correlacionado à IL-13,

[0082] Preferivelmente, o distúrbio correlacionado à IL-13 é selecionado de asma, dermatite atópica, rinite alérgica, fibrose, doença pulmonar obstrutiva crônica, escleroderma, doença inflamatória do intestino e linfoma de Hodgkin. A composição da invenção pode também ser usada no tratamento de tumores e infecções virais, na medida em que os anticorpos de IL-13 irão inibir a imunossupressão mediada pela IL-13. Mais preferivelmente, o distúrbio correlacionado à IL-13 é a asma.

[0083] A invenção proporciona ainda um método de tratamento ou profilaxia de um distúrbio correlacionado à IL-13, cujo método compreende a administração a um paciente de uma quantidade terapêuticamente efetiva de uma composição farmacêutica contendo um anticorpo, conforme anteriormente definido.

[0084] A invenção proporciona ainda uma composição farmacêutica contendo um anticorpo, conforme anteriormente aqui definido, para uso no tratamento de um distúrbio correlacionado à IL-13,

[0085] A composição farmacêutica da invenção pode ser uma formulação líquida ou uma formulação liofilizada, a qual é reconstituída antes de ser usada. Como excipientes para uma formulação liofilizada, podem ser usados, por exemplo, alcoóis de açúcar ou sacarídeos (por exemplo, manitol ou glicose). No caso de uma formulação líquida, a composição farmacêutica da invenção é normalmente provida na forma de frascos com volume definido, incluindo frascos de plástico ou de vidro lacrados e esterilizados, ampolas e seringas, assim como, na forma de recipientes de grande volume, como, por exemplo, garrafas. Preferivelmente, a composição da invenção é uma formulação líquida.

[0086] A composição farmacêutica da invenção pode ser administrada oralmente, mediante injeção (por exemplo, pelas vias subcutânea, intravenosa, intraperitoneal ou intramuscular), através de inalação ou topicamente (por exemplo, pelas vias intraocular, intranasal, retal, dentro de feridas ou sobre a pele). A rota de administração pode

ser determinada pelas características físico-químicas do tratamento, por especiais considerações quanto à doença ou pela necessidade de otimização da eficácia ou minimização dos efeitos colaterais.

[0087] Preferivelmente, a composição da invenção é administrada por meio de injeção subcutânea. É pretendido que o tratamento não se restrinja ao uso em uma clínica. Portanto, uma injeção subcutânea usando um dispositivo isento de agulha pode ser também preferida.

[0088] De acordo com a invenção, as composições providas podem ser administradas em indivíduos. A administração, preferivelmente, se faz numa "quantidade terapeuticamente efetiva", esta quantidade sendo suficiente para mostrar benefício a um paciente. Tal benefício pode ser pelo menos uma melhora de pelo menos um sintoma. A quantidade administrada em questão e a velocidade e período de tempo de administração irão depender da natureza e gravidade da doença que está sendo tratada. A prescrição do tratamento, por exemplo, decisões sobre a dosagem, etc., é de responsabilidade dos clínicos gerais e de outros médicos. Doses apropriadas de anticorpos são bem conhecidas no segmento da técnica, consultar, por exemplo, as publicações de [Ledermann J.A. *et al.*, *Int. J. Cancer*, 1999, **47**, 659-664; Bagshawe K.D. *et al.*, *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals*, 1991, **4**, 915-922].

[0089] A dose exata irá depender de um determinado número de fatores, incluindo o tamanho e a localização da área a ser tratada, da exata natureza do anticorpo (por exemplo, anticorpo integral, fragmento ou *diabody*) e da natureza de qualquer rótulo detectável ou outra molécula fixada ao anticorpo. Uma dose de anticorpo típica será na faixa de 100pg a 10g para aplicações sistêmicas e de 1µg a 100mg para aplicações tópicas.

[0090] Tipicamente, o anticorpo será um anticorpo integral, preferivelmente, o isótipo de IgG4, Uma dose para um único tratamento

de um paciente adulto pode ser proporcionalmente ajustada para meninos e crianças e também ajustada para outros formatos de anticorpo na proporção relativa ao peso molecular. Os tratamentos podem ser repetidos em intervalos diários, de duas vezes por semana, semanais ou mensais, de acordo com a orientação do médico. Em modalidades preferidas da presente invenção, o tratamento é periódico e o intervalo entre as administrações é de cerca de duas ou mais semanas, preferivelmente, de cerca de três ou mais semanas, mais preferivelmente, de cerca de quatro ou mais semanas ou cerca de uma vez ao mês.

#### Breve Descrição das Figuras

[0091] A figura 1 mostra os resultados da análise de SDS-PAGE de amostras no dia 1 de um exame de estabilidade de 28 dias, com relação à composição da invenção.

[0092] A figura 2 mostra os resultados da análise de SDS-PAGE de amostras no dia 21 de um exame de estabilidade de 28 dias, com relação à composição da invenção.

[0093] A figura 3 mostra os resultados da análise de GP-HPLC de amostras no dia 1 de um exame de estabilidade de 28 dias, com relação à composição da invenção.

[0094] A figura 4 mostra um amálgama dos resultados obtidos da análise de GP-HPLC de diversas amostras, durante uma determinação de estabilidade de 28 dias da composição da invenção, a uma temperatura de 2-8°C.

[0095] A figura 5 mostra um amálgama dos resultados obtidos da análise de GP-HPLC de diversas amostras, durante uma determinação de estabilidade de 28 dias da composição da invenção, a uma temperatura de 25°C.

[0096] A figura 6 mostra um amálgama dos resultados obtidos da análise de GP-HPLC de diversas amostras, durante uma determinação

de estabilidade de 28 dias da composição da invenção, quando neutralizadas com diferentes tampões.

[0097] A figura 7 mostra os resultados da análise de IEF de diversas amostras, no dia 28 de uma determinação de estabilidade de 28 dias da composição da invenção.

[0098] A figura 8 mostra os resultados da análise de HPLC por filtração de gel de uma determinação de estabilidade de 12 meses, de diferentes formulações armazenadas à temperatura de -70°C.

[0099] A figura 9 mostra os resultados da análise de HPLC por filtração de gel de uma determinação de estabilidade de 12 meses, de diferentes formulações armazenadas à temperatura de +5°C.

[00100] A figura 10 mostra os resultados da análise de HPLC por filtração de gel de uma determinação de estabilidade de 12 meses, de diferentes formulações armazenadas à temperatura de +25°C.

[00101] A figura 11 mostra os resultados da análise de HPLC por filtração de gel de uma determinação de estabilidade de 8 semanas, de diferentes formulações armazenadas à temperatura de +37°C.

[00102] A figura 12 mostra os resultados da análise de HPLC por filtração de gel de uma determinação de estabilidade de 5 dias, de diferentes formulações armazenadas à temperatura de +45°C.

[00103] A figura 13 mostra os resultados da análise de SDS-PAGE em 0, 6 e 12 meses, durante uma determinação de estabilidade de 12 meses de diferentes formulações armazenadas à temperatura de -70°C.

[00104] A figura 14 mostra a percentagem abundante de cadeias pesadas e leves de BAK502G9, após uma análise reduzida de SDS-PAGE, como mostrado na figura 13, quando armazenadas à temperatura de -70°C.

[00105] A figura 15 mostra os resultados da análise reduzida de SDS-PAGE, em 0, 6 e 12 meses, durante uma determinação de estabilidade de 12 meses de diferentes formulações, quando armazenadas à

temperatura de +5°C.

[00106] A figura 16 mostra a percentagem abundante de cadeias pesadas e leves de BAK502G9, após uma análise reduzida de SDS-PAGE, como mostrado na figura 15, quando armazenadas à temperatura de +5°C.

[00107] A figura 17 mostra os resultados da análise reduzida de SDS-PAGE, em 0, 6 e 12 meses, durante uma determinação de estabilidade de 12 meses de diferentes formulações, quando armazenadas à temperatura de +25°C.

[00108] A figura 18 mostra a percentagem abundante de

[00109] cadeias pesadas e leves de BAK502G9, após uma análise reduzida de SDS-PAGE, como mostrado na figura 17, quando armazenadas à temperatura de +25°C.

[00110] A figura 19 mostra os resultados da análise reduzida de SDS-PAGE, em 0 e 8 semanas, durante uma determinação de estabilidade de 8 semanas de diferentes formulações, quando armazenadas à temperatura de +37°C.

[00111] A figura 20 mostra a percentagem abundante de

[00112] cadeias pesadas e leves de BAK502G9, após uma análise reduzida de SDS-PAGE, como mostrado na figura 19, quando armazenadas à temperatura de +37°C.

[00113] A figura 21 mostra os resultados da análise reduzida de SDS-PAGE, em 0 e 5 dias, durante uma determinação de estabilidade de 5 dias de diferentes formulações, quando armazenadas à temperatura de +45°C.

[00114] A figura 22 mostra a percentagem abundante de cadeias pesadas e leves de BAK502G9, após uma análise reduzida de SDS-PAGE, como mostrado na figura 21, quando armazenadas à temperatura de +45°C.

[00115] A figura 23 mostra os resultados da análise não-reduzida de

SDS-PAGE, em 0, 6 e 12 meses, durante uma determinação de estabilidade de 12 meses de diferentes formulações, quando armazenadas à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

[00116] A figura 24 mostra a percentagem abundante do monômero intacto de BAK502G9, após uma análise não-reduzida de SDS-PAGE, como mostrado na figura 23, quando armazenadas à temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

[00117] A figura 25 mostra os resultados da análise não-reduzida de SDS-PAGE, em 0, 6 e 12 meses, durante uma determinação de estabilidade de 12 meses de diferentes formulações, quando armazenadas à temperatura de  $+5^{\circ}\text{C}$ .

[00118] A figura 26 mostra a percentagem abundante do monômero intacto de BAK502G9, após uma análise não-reduzida de SDS-PAGE, como mostrado na figura 25, quando armazenadas à temperatura de  $+5^{\circ}\text{C}$ .

[00119] A figura 27 mostra os resultados da análise não-reduzida de SDS-PAGE, em 0, 6 e 12 meses, durante uma determinação de estabilidade de 12 meses de diferentes formulações, quando armazenadas à temperatura de  $+25^{\circ}\text{C}$ .

[00120] A figura 28 mostra a percentagem abundante do monômero intacto de BAK502G9, após uma análise não-reduzida de SDS-PAGE, como mostrado na figura 27, quando armazenadas à temperatura de  $+25^{\circ}\text{C}$ .

[00121] A figura 29 mostra os resultados da análise não-reduzida de SDS-PAGE, em 0 e 8 semanas, durante uma determinação de estabilidade de 8 semanas de diferentes formulações, quando armazenadas à temperatura de  $+37^{\circ}\text{C}$ .

[00122] A figura 30 mostra a percentagem abundante do monômero intacto de BAK502G9, após uma análise não-reduzida de SDS-PAGE, como mostrado na figura 29, quando armazenadas à temperatura de

+37°C.

[00123] A figura 31 mostra os resultados da análise não-reduzida de SDS-PAGE, em 0 e 5 dias, durante uma determinação de estabilidade de 5 dias de diferentes formulações, quando armazenadas à temperatura de +45°C.

[00124] A figura 32 mostra a percentagem abundante do monômero intacto de BAK502G9, após uma análise não-reduzida de SDS-PAGE, como mostrado na figura 31, quando armazenadas à temperatura de +45°C.

[00125] A presente invenção será agora ilustrada, simplesmente por meio de exemplos, fazendo-se referência aos métodos e exemplos seguintes.

#### Exemplo 1: Expressão do Anticorpo BAK502G9

[00126] O anticorpo BAK502G9 foi expresso em uma linha celular GS NS0, de maneira análoga aos procedimentos descritos nos documentos de patentes WO 87/04462 e WO 2004/076485 e produziu uma cultura de sobrenadante contendo 598 mg/L do anticorpo BAK502G9,

#### Exemplo 2: Purificação do Anticorpo BAK502G9

##### (a) Purificação por Sefarose da Proteína A rmp

[00127] A coluna usada para a etapa de cromatografia de fluxo rápido por Sefarose de Proteína A rmp foi de 2,6 cm de diâmetro, empacotada em 0,9% (peso/volume) de cloreto de sódio, em uma altura de leito de 14,5 cm, proporcionando um volume de coluna de 77 mL. A resina foi fornecida pela GE Healthcare/Amersham Biosciences, 17-5138, A cromatografia foi executada usando uma bomba P-50, Amersham Biosciences, um detector UV1 e um fluxo celular. A coluna foi limpa com cloridrato de guanidina 6M, antes de ser usada.

[00128] A coluna de cromatografia de fluxo rápido por Sefarose de Proteína A rmp foi balanceada com 350 mL de uma solução salina

tamponada de fosfato, pH de 7,2, seguido de lavagem com água e limpeza. Em seguida, 2,6 L de cultura de sobrenadante foram introduzidos diretamente na coluna a uma velocidade de 200 cm/h e sob a temperatura ambiente.

[00129] A coluna foi depois lavada com 567 mL de uma solução salina tamponada de fosfato, pH de 7,2, seguido de 568 mL de acetato de sódio 50mM, pH de 5,55, O anticorpo BAK502G9 foi eluído da coluna mediante lavagem com 380 mL de acetato de sódio 50mM, pH de 3,75, Após a eluição, a coluna foi lavada com ácido acético 50mM, pH de 3,0.

[00130] O pico da eluição foi coletado entre uma deflexão de UV de um máximo de 2%, na inclinação ascendente e descendente do pico. Em seguida, 1,5 g do anticorpo BAK502G9 foram recuperadas em 217 mL.

#### (b) Inativação Viral de Baixo pH

[00131] O eluato de fluxo rápido de Sefarose de Proteína A rmp foi ajustado para um pH de 3,0 com 173 mL de ácido acético 100mM. O eluato ajustado foi mantido depois por 60 minutos para inativação viral. Após esse período, o eluato ajustado foi neutralizado com 473 mL de hidróxido de sódio 50mM para um pH de 5,50, e filtrado (0,22µm), usando um dispositivo de filtração da Millipore (número do produto, SCGPU11RE). Em seguida, foram recuperadas 1,4g do anticorpo BAK502G9 em 823 mL.

#### (c) Purificação por SP Sefarose

[00132] A coluna usada para a etapa de cromatografia de fluxo rápido por SP Sefarose foi de 1,6 cm de diâmetro, empacotada em uma solução salina de fosfato, pH de 7,2, em uma altura de leito de 15,5 cm, proporcionando um volume de coluna de 31 mL. A resina foi fornecida pela GE Healthcare/Amersham Biosciences, 17-0729, A cromatografia foi executada usando uma bomba P-50, Amersham Biosciences, um detector UV1 e um fluxo celular. A coluna foi limpa com hidróxido de

sódio 0,5M, antes de ser usada.

[00133] A coluna de cromatografia de fluxo rápido por SP Sefarose foi balanceada com 145 mL de acetato de sódio 50mM, pH de 5,50, seguido de lavagem com água e limpeza.

[00134] Em seguida, 400 mL do anticorpo BAK502G9 na forma de eluato de Proteína A rmp neutralizado, foram introduzidas na coluna a uma velocidade de 200cm/h e sob a temperatura ambiente.

[00135] A coluna foi depois lavada com 302 mL de uma mistura de acetato de sódio 50mM/cloreto de sódio 30mM, pH de 5,50.

[00136] O anticorpo BAK502G9 foi eluído da coluna mediante lavagem com 150 mL de acetato de sódio 50mM + cloreto de sódio 85mM, pH de 5,50. Após a eluição, a coluna foi lavada com acetato de sódio 50mM + cloreto de sódio 2M, pH de 5,50.

[00137] O pico da eluição foi coletado entre uma deflexão de UV de um máximo de 2%, na inclinação descendente do pico. O eluato foi filtrado (0,22 µm) usando um dispositivo de filtração da Millipore (número do produto, SCGPOO525). Em seguida, 0,67 g do anticorpo BAK502G9 foram recuperadas em 54 mL. Esta etapa do processo foi repetida com os restantes 392 mL do anticorpo BAK502G9, na forma do eluato de Proteína A rmp neutralizado. Uma quantidade adicional de 0,67 g do anticorpo BAK502G9 foi recuperada em 54 mL. Os dois eluatos filtrados de SP Sefarose foram agrupados, antes de seguir para a próxima etapa.

#### (d) Cromatografia de Fluxo Rápido por Q Sefarose

[00138] A coluna usada para a etapa de cromatografia de fluxo rápido por Q Sefarose foi de 1,6 cm de diâmetro, empacotada em uma solução salina de fosfato, pH de 7,2, em uma altura de leito de 13,3 cm, proporcionando um volume de coluna de 27 mL. A resina foi fornecida pela GE Healthcare/Amersham Biosciences, 17-0510. A cromatografia foi executada usando uma bomba P-50, Amersham Biosciences, um detector UV1 e um fluxo celular. A coluna foi limpa com hidróxido de

sódio 0,5M, antes de ser usada.

[00139] A coluna de cromatografia de fluxo rápido por Q Sefarose foi balanceada com 138 mL de acetato de sódio 50mM + cloreto de sódio 85mM, pH de 5,50, seguido de lavagem com água e limpeza.

[00140] Em seguida, 44 mL do anticorpo BAK502G9 na forma de eluato de SP Sefarose foram introduzidas diretamente na coluna a uma velocidade de 200cm/h e sob a temperatura ambiente.

[00141] A eluição isocrática do anticorpo BAK502G9 foi tomada através de lavagem da coluna com 124 mL de acetato de sódio 50mM + cloreto de sódio 85mM, pH de 5,50. Após a eluição, a coluna foi lavada com acetato de sódio 50mM + cloreto de sódio 2M, pH de 5,50.

[00142] O pico da eluição foi coletado entre uma deflexão de UV de um máximo de 2% na inclinação ascendente e de 2% na inclinação descendente do pico. O eluato foi filtrado (0,22 µm) usando um dispositivo de filtração da Millipore (número do produto, SCGPU01RE). Em seguida, 0,52 g do anticorpo BAK502G9 foram recuperadas em 88 mL. Esta etapa do processo foi repetida com os restantes 44 mL do anticorpo BAK502G9, na forma do eluato de SP Sefarose. Uma quantidade adicional de 0,54 g do anticorpo BAK502G9 foi recuperada em 51 mL. Os dois eluatos filtrados de Q Sefarose foram depois agrupados.

#### (e) Concentração

[00143] O produto foi obtido em acetato de sódio 50mM + cloreto de sódio 85mM, pH de 5,50 e não precisou de diafiltração. 95,31 g do anticorpo BAK502G9 na forma de eluato de Q Sefarose em 17,5 L, foram concentradas para o volume de 1,5 L. Um sistema Pellicon 2 TFF da Millipore e uma membrana 0,1 M<sup>2</sup> 30KDa (Millipore P2B030A01) foram usados para executar a concentração. O anticorpo BAK502G9 foi então recuperado do equipamento, o equipamento foi depois descarregado do tampão com acetato de sódio 50mM + cloreto de sódio

85mM, pH de 5,50. O anticorpo concentrado foi depois misturado com a descarga do tampão. Em seguida, foram adicionados 1,67 mL de Polissorbato 80 a 10% (peso/volume) à mistura acima, proporcionando uma concentração final do Polissorbato 80 de 0,01% (peso/volume). A mistura foi depois filtrada (0,22 µm). Em seguida, 91,6 g do anticorpo BAK502G9 foram recuperadas em 1,67 L.

#### (f) Materiais Usados

[00144] Os produtos químicos usados para preparar os tampões descritos acima foram os seguintes:

- Cloridrato de Guanidina; Sigma Aldrich, G4505;
- Orto-fosfato ácido dissódico; VWR, 1038349;
- Orto-fosfato ácido dissódico; VWR, 102454R;
- Acetato de sódio triidratado; VWR, 102354X;
- Cloreto de sódio; VWR, 10241AP;
- Ácido acético; VWR, 10001CU;
- Polissorbato 80; J. T. Baker, 7394.

#### Exemplo 3: Análise de Estabilidade de 28 Dias

##### Metodologia

[00145] A cromatografia de Proteína A rmp foi executada conforme estabelecido na Tabela 1, abaixo.

Tabela 1: Parâmetros de Cromatografia da Proteína A

Matriz	Sefarose de Proteína A rmp
Altura do leito	14,2 cm
Diâmetro da Coluna	5,0 cm
Volume da Coluna	278 mL
Vazão Linear	150 cm/h
Tampão de Equilíbrio & CV's:	Solução salina de fosfato tamponada, pH 7,2, 5 CV's
Material de Carga	Colheita da cultura clarificada
Capacidade de Carga (mg IgG/mL matriz)	16,6 mg/mL matriz

Lavagem com 1 tampão e CV's	Solução salina de fosfato tamponada, pH 7,2, 7,5 CV's
Lavagem com 2 tampões e CV's	Acetato de sódio 50mM, pH 5,50 ± 0,10, 7,5 CV's
Tampão de Elução	Acetato de sódio 50mM, pH 3,75 ± 0,10, 1,6 CV's
Tampão de extração/limpeza e CV's	Acetato de sódio 50mM, pH 3,0 ± 0,10, 2 CVs.

[00146] 1,6 CV do tampão de elução foram necessários para eluir o pico e para a absorbância retornar a uma deflexão de escala integral < 2% (AuFS). Após isso, o tampão foi trocado para um tampão de extração. A inativação do vírus com um baixo pH foi depois realizada usando o eluato de Proteína A, conforme estabelecido na Tabela 2, abaixo.

**Tabela 2:** Inativação do Vírus com baixo pH

Material de partida	Eluato da Proteína A
Redução do pH	para um pH de 3,70
Tampão para Redução do pH	Ácido acético 100mM
Velocidade de adição	8,6 mL/min (19,0 mL/min/L eluato)
Tempo de manutenção do pH baixo	60 minutos após o ajuste do pH
Neutralização após a inativação do vírus	para um pH de 5,48, mediante adição gradual de hidróxido de sódio 100 mM
Velocidade de adição	17,8 mL/min (39,3 mL/min/L eluato – ajustado para amostragem)
Filtração após a neutralização	Millipak 20

[00147] Todas as amostras foram armazenadas em recipientes de 200 mL da Hycyclone BioProcess, que são feitos de polietileno com tubulação fixada C-flex de entrada e saída.

[00148] Além disso, um amostra de 50 mL de eluato de Proteína A inativada de vírus foi neutralizada com o tampão original (hidróxido de

sódio 50mM) e armazenada em um recipiente de bioprocesso à temperatura de 2 a 8°C durante vinte e oito dias, antes da análise.

[00149] Todas as amostras foram armazenadas em uma sala fria de classificação 100.000 (2 a 8°C, monitorada com registrador de gráfico e alarme) ou em uma incubadora controlada termostaticamente e ajustada a uma temperatura de 25°C, conforme apropriado.

[00150] Ocorreram cinco pontos de tempo e duas temperaturas de armazenamento (2 a 8°C e 25°C), isto é, dez pontos de amostragem separados.

[00151] O filtrado neutralizado do eluato de Proteína A foi separado em dez lotes, cinco lotes sendo armazenados em cada temperatura. Um adicional recipiente de material não-filtrado do eluato de Proteína A neutralizado foi armazenado na temperatura de 2 a 8°C.

[00152] Para preencher cada recipiente de bioprocesso, o eluato de Proteína A neutralizado foi bombeado através do filtro Millipak de 0,2 µm para dentro de um recipiente de bioprocesso 200 mL. Cada recipiente de bioprocesso foi enchido com aproximadamente 100 mL, de modo a se aproximar da proporção de produto para superfície de contato, idealizada para a produção em escala final de 2000 L.

[00153] Um recipiente de bioprocesso foi usado para amostragem em cada temperatura e em cada ponto de tempo, tendo sido tomado cuidado para não deixar material na tubulação durante o armazenamento.

[00154] Um recipiente de bioprocesso de cada temperatura foi removido nos dias 1, 3, 15, 21 e 28, Os conteúdos de cada recipiente de bioprocesso foram deixados alcançar a temperatura ambiente antes da amostragem.

[00155] As amostras foram tomadas em recipientes Bijoux ou tubos Falcon de 50 mL. Os primeiros mililitros da amostra foram descartados, tendo em vista a possibilidade dos mesmos terem tido algum contato

com a tubulação durante o armazenamento.

[00156] A posterior amostragem dos recipientes contendo o material restante foi armazenada a uma temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

[00157] A análise seguinte foi realizada no dia de cada ponto de tempo e para cada temperatura de armazenamento, de modo a determinar a comparação dessas amostras em si, e o padrão de referência. Um frasco de material fresco de BAK502G9 padrão foi usado em cada ponto de tempo para comparar a estabilidade do material em estudo. O material de referência foi congelado na temperatura ambiente do armazenamento sob temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ . Sabe-se que níveis de multímero podem ser ligeiramente elevados depois do congelamento desse anticorpo, de modo que finalmente possa se realizar a análise de GP-HPLC.

#### (A) Análise de Turbidez

[00158] A turbidez foi determinada como uma medida de decomposição da proteína no decorrer do tempo e, portanto, serve como uma conveniente determinação de estabilidade da composição da invenção.

[00159] A turbidez foi medida ao se tomar a absorbância média da amostra, entre 340 e 360 nm (Eckhardt *et al.* 1993). Este ensaio foi realizado sem posterior filtração.

[00160] Os dados obtidos da cromatografia da Proteína A rmp são resumidos na Tabela 3 e o cromatograma é mostrado na figura 1.

Tabela 3: Dados de Cromatografia da Proteína A rmp

Detalhes da Etapa	Resultado
Volume da Coluna	278 mL
Volume Total Introduzido	3204 mL
Produto Total Introduzido	4620 mg
Volume de Eluato	453 mL (1,6CV)
Concentração do Eluato	8,42 mg/mL

pH na Elução	4,40
Volume de ácido acético 100mM adicionado	665 mL (2,4CV)
Volume de hidróxido de sódio 100mM adicionado	838 mL (3,0CV; 3,2 CV, ajustado*)
Volume prévio no processo de filtração	1900 mL* (6,8 CV)
Concentração posterior no processo de filtração	2,28 mg/mL
Produto Total posterior no processo de filtração	4327 mg
Percentual de recuperação no processo de filtração	93,7%

\*50 mL removido do eluato inativado de vírus, para ajuste com hidróxido de sódio 50mM. O volume final é de amostragem posterior.

[00161] A cromatografia de Proteína A rmp executada conforme previsto gerou volumes de tampões comparáveis aos observados em larga escala. O eluato neutralizado foi visivelmente mais turvo do que normalmente observado com o eluato neutralizado com hidróxido de sódio 50mM. Durante a filtração nos recipientes de bioprocessos, começou a se observar uma precipitação, isso ocorrendo depois de uma hora da neutralização. A turbidez não foi testada até depois desse tempo. A recuperação ocorreu dentro da faixa esperada de pós-filtração.

[00162] Todas as amostras do eluato foram examinadas quanto à turbidez no dia 1, Os eluatos filtrados armazenados em ambas as temperaturas foram examinados quanto à turbidez nos dias: 1, 3, 15, 21 e 28, Além disso, os eluatos armazenados não-filtrados (ajustados com hidróxido de sódio 50 mM ou hidróxido de sódio 100 mM) foram testados quanto à turbidez tanto antes como depois da filtração, no dia 28, Os resultados da análise de turbidez são mostrados na Tabela 4, onde pode ser observado que embora tenha ocorrido um acentuado aumento na turbidez da amostra armazenada à temperatura de 25°C no dia 28, as amostras foram, de um modo geral, estáveis à temperatura de 25°C durante pelo menos 21 dias.

**Tabela 4:** Medições de Turbidez do Processo e Estabilidade das Amostras de Estudo

Amostra	Turbidez Média		Categoria	
Eluato não-ajustado	0,0640		Opalescente	
Vírus inativado	0,0247		Ligeiramente Opalescente	
Pré-filtração neutralizada	0,2856		Turvo	
Eluato filtrado	0,0093		Transparente	
Dia	2 a 8°C		25°C	
	Turbidez	Categoria	Turbidez	Categoria
Dia 1	0,0093	Transparente	0,0132	Transparente
Dia 3	0,0115	Transparente	0,0176	Ligeiramente Opalescente
Dia 15	0,0208	Ligeiramente Opalescente	0,0203	Ligeiramente Opalescente
Dia 21	0,0120	Transparente	0,0202	Ligeiramente Opalescente
Dia 28	0,0140	Transparente	0,0412	Opalescente

### B) Análise da Concentração da Proteína

[00163] A concentração de IgG foi medida e calculada usando absorvância em 280nm e um coeficiente de extinção de  $E_{1cm}^{0.1\%} = 1.723$ .

[00164] Os eluatos que foram filtrados no período de neutralização não foram novamente filtrados antes da absorvância ser medida em 280nm para o cálculo de concentrações da proteína. Na medida em que as características de turbidez foram todas baixas, acredita-se que isso não afetaria os resultados. A absorvância em 280nm foi consistente entre as temperaturas de armazenamento e os pontos de tempo que são mostrados na Tabela 5.

**Tabela 5:** Concentrações de Proteína de Amostras de Eluato

	Concentração da Proteína (mg/mL)	
Amostra: Eluato de Proteína A filtrado e neutralizado com hidróxido de sódio 100mM; Dia:	Temperatura	
	2 a 8°C	25°C
Um	2,28	2,28
Três	2,29	2,29
Quinze	2,28	2,29
Vinte e um	2,29	2,28
Vinte e oito	2,28	2,26
Novamente filtrada (Vinte e oito)	2,29	-

### (C) Análise de SDS-PAGE

[00165] A análise reduzida e nao-reduzida de SDS-PAGE foi processada usando 4 a 12% de géis Bis-Tris NuPage. Os géis foram processados usando tampão de corrida de MES e tingimento com gel Pierce, código azul.

[00166] A análise de SDS-PAGE demonstrou variações em níveis de meio anticorpo, mas não existe uma tendência aparente, sendo provável que esteja dentro da variação do ensaio (ver as Figuras 1 e 2 e as Tabelas 6 e 7). No dia vinte e um, algumas adicionais faixas menores foram observadas na amostra à temperatura de 25°C. Essas faixas não foram observadas no dia vinte e oito. Portanto, essas faixas podem se encontrar nos limites de detecção do ensaio. Essas faixas podem corresponder aos pequenos picos adicionais observados no ensaio de GP-HPLC (ver o Exemplo 3D).

[00167] As amostras não foram processadas ao final do estudo pelo fato de que não seria possível se distinguir as mesmas entre as diferenças que se faziam presentes na amostra original ou, então, foram resultado de um maior período de armazenamento. Um frasco recém-congelado de referência padrão foi processado para cada gel. Isto foi

comparável entre os pontos de tempo diferentes, indicando que a análise foi realizada conforme o esperado. Foi também observado que as faixas extras observadas no dia vinte e um, a amostra à temperatura de 25°C, não foram observadas no padrão de referência ou amostra à temperatura de 2 a 8°C, processada no mesmo gel. Por razões de melhor clareza, todas as faixas na Figura 2 são indicadas com um círculo.

**Tabela 6:** Resultados de Densitometria de SDS-PAGE, Amostras Reduzidas

Dia	Amostra	Porcentagem			
		Cadeia Pesada	Cadeia Leve	Meio anticorpo	Outros
Um	Referência	61,1	37,2	1,7	0,0
	2 a 8 °C	61,3	37,4	1,2	0,0
	25°C	61,5	37,5	1,0	0,0
Três	Referência	65,7	32,4	1,9	0,0
	2 a 8 °C	64,4	33,4	2,1	0,0
	25°C	66,0	32,8	1,2	0,0
Quinze	Referência	62,7	35,9	1,3	0,0
	2 a 8 °C	62,3	37,3	0,4	0,0
	25°C	62,4	39,9	0,7	0,0
Vinte e um	Referência	58,2	39,5	2,3	0,0
	2 a 8 °C	57,8	39,9	2,2	0,1
	25°C	55,9	40,0	2,5	1,6
Vinte e oito	Referência	64,4	33,7	1,9	0,0
	2 a 8 °C	66,1	32,5	1,4	0,0
	25°C	61,2	35,2	1,5	0,0

**Tabela 7: Resultados de Densitometria de SDS-PAGE, Amostras Não-Reduzidas**

Dia	Amostra	Porcentagem		
		Anticorpo Integral	Meio anticorpo	Outros
Um	Referência	83,2	16,8	0,0
	2 a 8 °C	82,6	17,4	0,0
	25°C	83,7	16,3	0,0
Três	Referência	89,8	10,2	0,0
	2 a 8 °C	87,1	12,9	0,0
	25°C	87,4	12,6	0,0
Quinze	Referência	86,0	14,0	0,0
	2 a 8 °C	84,6	15,4	0,0
	25°C	86,8	13,2	0,0
Vinte e um	Referência	82,5	17,4	0,0
	2 a 8 °C	81,6	17,9	0,5
	25°C	82,5	15,7	1,8
Vinte e oito	Referência	87,1	12,9	0,0
	2 a 8 °C	85,0	14,8	0,0
	25°C	87,9	11,3	0,0

#### (D) Análise de GP-HPLC

[00168] As amostras foram analisadas usando uma coluna de exclusão de tamanho TSK GS3000SW com fosfato de sódio 200mM e azida de sódio a 0,05%, pH de 7,0, como fase móvel e detecção em 280nm.

[00169] Todas as frações da cromatografia de Proteína A foram examinadas no dia 1. Os eluatos armazenados em ambas as temperaturas foram depois examinados nos dias 1, 3, 15, 21 e 28. As amostras de referência foram também processadas em todos os pontos de tempo. Os eluatos foram separadamente neutralizados com hidróxido de sódio 100 mM ou hidróxido de sódio 50 mM no dia 1, mas

não foram filtrados até o dia 28; nesse dia 28, foram testados pelo procedimento de GP-HPLC.

[00170] Os cromatogramas da análise de GP-HPLC do dia 1 são mostrados na Figura 3. Estes são como esperado, o eluato final sendo > 95% do monômero, o que atende a especificação final para o BAK502G9.

[00171] A análise de GP-HPLC das amostras durante todo o curso do estudo revelou um ligeiro aumento no aspecto truncado (em particular, um pequeno pico eluindo entre 9,9 e 10,3 minutos) de BAK502G9 à temperatura de 25°C (Tabela 8 e Figuras 4 e 5). Os níveis de monômero foram consistentes entre 97,0 e 98,2% durante todo o estudo.

[00172] Os eluatos foram neutralizados com hidróxido de sódio 50 mM e níveis mais altos do monômero (99,2% do monômero) do que o eluato neutralizado com hidróxido de sódio 100 mM (97,4% de monômero), ambos sendo superiores ao nível solicitado de 95% de monômero para o produto final (Tabela 9 e Figura 6).

[00173] Os resultados obtidos da integração automática foram encontrados como sendo imprecisos, portanto, os cromatogramas de GP-HPLC foram reintegrados manualmente.

**Tabela 8:** GP-HPLC de Eluatos Armazenados em Diferentes Temperaturas

Dia	2 a 8°C (percentagem)			25°C (percentagem)		
	Multímero	Monômero	Truncado	Multímero	Monômero	Truncado
1	1,4	98,2	0,4	1,4	98,0	0,7
3	1,7	97,5	0,8	1,0	98,3	0,7
15	1,4	98,0	0,6	1,0	98,0	1,0
21	1,2	98,1	0,6	1,3	97,4	1,3
28	1,2	98,2	0,7	1,5	97,0	1,5

**Tabela 9:** GP-HPLC de Eluatos Neutralizados com Hidróxido de Sódio 100 mM ou 50 mM

Fração	Multímero (%)	Monômero (%)	Truncado (%)
Eluato neutralizado com hidróxido de sódio 100mM, filtrado e testado no dia 28	1,4	97,4	1,2
Eluato neutralizado com hidróxido de sódio 50mM, filtrado e testado no dia 28	0,3	99,2	0,5
Eluato filtrado e neutralizado com hidróxido de sódio 100mM, testado no dia 28	1,4	98,2	0,4

**(E): Análise de IEF**

[00174] As amostras foram analisadas usando géis de IEF, pH de 3 a 10, da Invitrogen, usando tampões da Invitrogen.

[00175] A análise de IEF do BAK502G9 mostrou um aspecto consistente em todo o estudo (Figura 7). Três faixas maiores e duas faixas menores, entre pls aproximados de 7,1 e 6,4, são observadas.

**(E) Análise de Endotoxina**

[00176] As amostras tomadas no dia 28 de ambas as temperaturas foram examinadas quanto aos níveis de endotoxina, usando um ensaio de LAL.

[00177] Os níveis de endotoxina nas amostras armazenadas em ambas as temperaturas foram baixos. Isso demonstra que não ocorreu contaminação por bactéria gram-negativa em todo o curso do estudo.

[00178] Eluato armazenado à temperatura de 2 a 8°C = 0,87 EU/mg.

[00179] Eluato armazenado à temperatura de 25°C < 0,44 EU/mg.

**Resumo dos Resultados da Análise de Estabilidade de 28 Dias**

[00180] O anticorpo BAK502G9 armazenado por até quinze dias à temperatura de 2 a 8°C ou 25°C é equivalente em todos os ensaios

realizados no Exemplo 3. Após vinte e um dias, algumas pequenas diferenças são observadas pelas análises de SDS-PAGE (Exemplo 3C) e GP-HPLC (Exemplo 3D), mas o produto permanece comparável até vinte e oito dias.

#### Exemplo 4: Análise de Estabilidade de 12 Meses

[00181] A análise de estabilidade de 12 meses foi executada de maneira análoga à descrita na análise de estabilidade de 28 dias do Exemplo 3.

[00182] O estudo foi idealizado para investigar a estabilidade de diferentes concentrações de BAK502G9, quando armazenado em diferentes temperaturas (por exemplo,  $-70$ ,  $+5$ ,  $+25$ ,  $+37$  e  $+45^{\circ}\text{C}$ ). As diferentes formulações usadas nessa análise são apresentadas na Tabela 10, abaixo.

Tabela 10: Composição das formulações usadas na análise de estabilidade de 12 meses.

Formulação	Concentração Nominal (mg/mL)	Composição
Controle (CF)	10	Acetato de sódio 50mM/Cloreto de sódio 85mM, pH 5,5
Teste 1A (TF1A)	50	Acetato de sódio 50mM/Cloreto de sódio 85mM/Polissorbato 80 (0,01%), pH 5,5
Teste 1B (TF1B)	100	Acetato de sódio 50mM/Cloreto de sódio 85mM/Polissorbato 80 (0,01%), pH 5,5
Teste 1C (TF1C)	150	Acetato de sódio 50mM/Cloreto de sódio 85mM/Polissorbato 80 (0,01%), pH 5,5

[00183] A análise das amostras foi verificada em pontos de tempo variados, por exemplo, as formulações armazenadas às temperaturas de  $-70$ ,  $+5$ ,  $+25^{\circ}\text{C}$  foram medidas em 0, 3, 6, 9 e 12 meses, as formulações armazenadas à temperatura de  $+37^{\circ}\text{C}$  foram medidas em 0, 1, 2, 4 e 8 semanas e as formulações armazenadas à temperatura de  $+45^{\circ}\text{C}$  foram medidas em 0, 1, 2 e 5 dias.

(A) Análise de pH

[00184] O pH foi medido usando um medidor de pH PHM220 (Radiometer Analytical), adaptado com um eletrodo de pH de pequeno volume de (BDH) e os resultados da medição de pH das formulações CF, TF1A, TF1B e TF1C em cada temperatura são mostrados nas Tabelas 11-15, abaixo.

Tabela 11: pH após Armazenamento à Temperatura de -70°C

Tempo (meses)	pH			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	5,67	5,52	5,51	5,54
3	5,47	5,48	5,48	NT
6	5,50	5,50	5,48	NT
9	5,56	5,55	5,57	5,58
12	5,46	5,47	5,46	5,46

Tabela 12: pH após Armazenamento à Temperatura de +5°C

Tempo (meses)	pH			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	5,67	5,52	5,51	5,54
3	5,48	5,49	5,49	NT
6	5,49	5,49	5,49	NT
9	5,56	5,56	5,55	5,56
12	5,47	5,47	5,46	5,47

Tabela 13: pH após Armazenamento à Temperatura de +25°C

Tempo (meses)	pH			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	5,67	5,52	5,51	5,54
3	5,49	5,50	5,51	NT
6	5,49	5,50	5,48	NT
9	5,53	5,53	5,55	5,58
12	5,49	5,49	5,48	5,48

**Tabela 14:** pH após Armazenamento à Temperatura de +37°C

Tempo (semanas)	pH			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	5,50	5,52	5,52	5,52
1	5,45	5,46	5,46	NT
2	5,45	5,45	5,47	NT
4	5,46	5,45	5,45	NT
8	5,45	5,45	5,45	5,46

**Tabela 15:** pH após Armazenamento à Temperatura de +45°C

Tempo (dias)	pH			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	5,50	5,52	5,52	5,52
1	5,47	5,48	5,48	NT
2	5,47	5,47	5,46	NT
5	5,48	5,48	5,47	5,49

NT = Não Testado

### (B) Análise da Concentração

[00185] As amostras foram diluídas em um nível apropriado com o tampão adequado e sua absorbância determinada em 280 nm usando um espectrofotômetro visível à UV, HP8453 (Agilent Technologies). Os valores de absorbância foram convertidos para as concentrações de BAK502G9 usando o conhecido coeficiente de extinção de 1,723. Os resultados da medição da absorbância das formulações CF, TF1A, TF1B e TF1C em cada temperatura são mostrados nas Tabelas 16-20, abaixo.

**Tabela 16:** Concentração do BAK502G9 após Armazenamento à Temperatura de -70°C

Tempo (meses)	Concentração Média $\pm$ SD <sup>a</sup> (mg/mL)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	10,8 $\pm$ 0,1	48,9 $\pm$ 0,3	107,4 $\pm$ 0,9	147,7 $\pm$ 4,6
3	11,0 $\pm$ 0,1	52,4 $\pm$ 0,7	112,8 $\pm$ 0,6	NT
6	10,3 $\pm$ 0,1	46,4 $\pm$ 0,6	104,5 $\pm$ 2,1	NT
9	10,6 $\pm$ 0,2	46,9 $\pm$ 0,8	105,8 $\pm$ 0,7	151,8 $\pm$ 1,4
12	10,7 $\pm$ 0,1	50,9 $\pm$ 0,0	109,3 $\pm$ 0,3	152,7

**Tabela 17:** Concentração do BAK502G9 após Armazenamento à Temperatura de +5°C

Tempo (meses)	Concentração Média $\pm$ SD <sup>a</sup> (mg/mL)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	10,8 $\pm$ 0,1	48,9 $\pm$ 0,3	107,4 $\pm$ 0,9	147,7 $\pm$ 4,6
3	10,8 $\pm$ 0,2	51,4 $\pm$ 0,3	110,7 $\pm$ 0,3	NT
6	10,4 $\pm$ 0,2	46,4 $\pm$ 0,9	99,1 $\pm$ 0,9	NT
9	10,6 $\pm$ 0,1	46,6 $\pm$ 0,5	105,9 $\pm$ 0,9	150,2 $\pm$ 0,2
12	10,7 $\pm$ 0,1	50,5 $\pm$ 0,1	112,3 $\pm$ 0,4	156,1 $\pm$ 0,5

**Tabela 18:** Concentração do BAK502G9 após Armazenamento à Temperatura de +25°C

Tempo (meses)	Concentração Média $\pm$ SD <sup>a</sup> (mg/mL)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	10,8 $\pm$ 0,1	48,9 $\pm$ 0,3	107,4 $\pm$ 0,9	147,7 $\pm$ 4,6
3	10,8 $\pm$ 0,2	53,8 $\pm$ 0,4	116,2 $\pm$ 0,5	NT
6	10,4 $\pm$ 0,1	46,5 $\pm$ 0,4	102,9 $\pm$ 2,7	NT
9	10,6 $\pm$ 0,2	46,2 $\pm$ 0,9	106,3 $\pm$ 1,2	152,3 $\pm$ 1,9
12	10,2 $\pm$ 0,1	52,0 $\pm$ 0,9	110,8 $\pm$ 0,5	155,8 $\pm$ 1,3

**Tabela 19:** Concentração do BAK502G9 após Armazenamento à Temperatura de +37°C

Tempo (semanas)	Concentração Média $\pm$ SD <sup>a</sup> (mg/mL)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	10,4 $\pm$ 0,1	46,4 $\pm$ 0,4	98,6 $\pm$ 1,2	142,3 $\pm$ 0,8
1	11,1 $\pm$ 0,2	52,1 $\pm$ 0,7	112,1 $\pm$ 0,8	NT
2	11,0 $\pm$ 0,3	51,4 $\pm$ 1,3	118,7 $\pm$ 0,3	NT
4	10,9 $\pm$ 0,3	54,2 $\pm$ 0,4	120,6 $\pm$ 1,0	NT
8	11,0 $\pm$ 0,2	56,2 $\pm$ 1,9	117,2 $\pm$ 0,2	165,8 $\pm$ 1,1

**Tabela 20:** Concentração do BAK502G9 após Armazenamento à Temperatura de +45°C

Tempo (dias)	Concentração Média $\pm$ SD <sup>a</sup> (mg/mL)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	10,4 $\pm$ 0,1	46,4 $\pm$ 0,4	98,6 $\pm$ 1,2	142,3 $\pm$ 0,8
1	10,6 $\pm$ 0,2	54,6 $\pm$ 1,7	120,4 $\pm$ 2,4	NT
2	10,7 $\pm$ 0,1	54,7 $\pm$ 1,4	124,9 $\pm$ 1,3	NT
5	10,6 $\pm$ 0,3	54,7 $\pm$ 2,0	122,2 $\pm$ 0,3	151,5 $\pm$ 1,6

<sup>a)</sup> n=3

NT = Não Testado

### (C) Análise de HPLC por Filtração de Gel

[00186] O procedimento de HPLC por filtração de gel foi executado em um sistema HP1100 (Agilent Technologies). Uma coluna TSK-Gel 3000S foi balanceada com fosfato de sódio 0,2M, pH de 7,5. As amostras foram diluídas para 1 mg/mL com o tampão adequado e centrifugadas a 13.000 rpm durante 10 minutos para remover qualquer matéria particulada. Em seguida, foram feitas injeções de 3 x 20  $\mu$ L de cada amostra na coluna, que foi processada a uma vazão de 1 mL/min. Um detector de comprimento de onda variável foi usado para monitorar a absorvância em 220 e 280nm.

[00187] Os resultados da análise de filtração de gel das formulações CF, TF1A, TF1B e TF1C em cada temperatura são mostrados nas

Figuras 8-12.

(D) Análise de SDS-PAGE de Amostras Reduzidas

[00188] As amostras foram diluídas para 1 mg/mL com um tampão adequado e foram adicionados 16,7 µL a 12,5 µL de tampão de amostra (4X LDS) (Invitrogen), 15,8 µL de água Milli-Q e 5 µL de agente redutor (Invitrogen). As amostras foram aquecidas à temperatura de 95°C por um minuto e depois colocadas em gelo. Em seguida, 15 µL de cada amostra foram misturados em um gel BisTris a 4-12% (Invitrogen), em um tanque contendo o tampão de processamento de MES SDS (1x) e o gel foi processado durante 35 minutos sob uma corrente constante de 500 mA. Após a eletroforese, o gel foi removido de seu invólucro, lavado (3x) por 10 minutos com água Milli-Q, tingido com o reagente de tingimento Gelcode® Blue (Pierce) por um mínimo de uma hora e depois descolorido com água Milli-Q. O gel foi fotografado e analisado usando um sistema de documentação de gel UVP GDS8000. A relativa abundância de cadeias pesadas e leves de BAK502G9 em cada amostra foi determinada.

[00189] Os resultados da análise de SDS-PAGE de amostra reduzida das formulações CF, TF1A, TF1B e TF1C em cada temperatura são mostrados nas Figuras 13, 15, 17, 19 e 21. As medições de abundância de cadeias pesadas e leves de BAK502G9 em cada temperatura são também mostradas nas Figuras 14, 16, 18, 20 e 22.

(E) Análise de SDS-PAGE de Amostras Não-Reduzidas

[00190] As amostras foram diluídas para 1 mg/mL com um tampão adequado e foram adicionados 16,7 µL a 25 µL de tampão de amostra não-redutor SDS (2X) (Tris 0,125M, pH 6,8, 4% (peso/volume), glicerol 30% (vol/vol), azul de bromofenol 0,004% (peso/vol), 3,3 µL de água Milli-Q e 5 µL de iodoacetamida 1M. As amostras foram aquecidas à temperatura de 95°C por um minuto e depois colocadas em gelo. Em seguida, 15 µL de cada amostra foram misturados em um gel BisTris a

4-12% (Invitrogen), em um tanque contendo o tampão de processamento de MES SDS (1x) e o gel foi processado durante 35 minutos sob uma corrente constante de 500 mA. Após a eletroforese, o gel foi removido de seu invólucro, lavado (3x) por 10 minutos com água Milli-Q, tingido com o reagente de tingimento Gelcode® Blue (Pierce) por um mínimo de uma hora e depois descolorido com água Milli-Q. O gel foi fotografado e analisado usando um sistema de documentação de gel UVP GDS8000. A relativa abundância de cadeias pesadas e leves de BAK502G9 em cada amostra foi determinada.

[00191] Os resultados da análise de SDS-PAGE de amostra não-reduzida das formulações CF, TF1A, TF1B e TF1C em cada temperatura são mostrados nas Figuras 23, 25, 27, 29 e 31. As medições de abundância do monômero intacto de BAK502G9 em cada temperatura são também mostradas nas Figuras 24, 26, 28, 30 e 32.

#### (F) Análise de Foco Iselétrico

[00192] Antes da introdução da amostra, o leito de eletroforese foi resfriado e um gel de IEF, pH de 3-10 (Cambrex) foi pré-focado durante 10 minutos em 1 W, 2000 V, 150 mA, usando um sistema de energia Apelex PS9009TX. As amostras foram diluídas para a concentração de 1 mg/mL com um tampão apropriado. Uma máscara de amostra foi colocada sobre a superfície do gel e foram introduzidos 5 µL de cada amostra. O gel foi pré-focado novamente e a máscara de amostra removida. O gel foi então focado por 60 minutos a 25 W, 1500 V, 50 mA. Após a eletroforese, o gel foi fixado com metanol 50% (vol/vol), ácido tricloroacético 6% (peso/volume), ácido 5-sulfossalicílico 3,6% (peso/volume) por 30 minutos, depois, lavado com água e seco em um forno à temperatura de 40-50°C por uma hora. O gel foi tingido por 30 minutos usando PhastGel Blue R (Pharmacia; um comprimido dissolvido em metanol 60% (vol/vol)), lavado com água Milli-Q para remover o excesso de tingimento e depois descolorido por

aproximadamente 3 minutos com ácido acético glacial 9% (vol/vol) e uma solução de etanol 25% (vol/vol). O gel foi seco em um forno à temperatura de 40-50°C por uma hora. O gel seco foi fotografado e analisado usando um sistema de documentação de gel UVP GDS8000. O número e a variação de pI das isoformas em cada amostra foi determinado e os resultados observados nas formulações CF, TF1A, TF1B e TF1C em cada temperatura são mostrados nas Tabelas 21-25, abaixo.

**Tabela 21:** Variação de pI e Número de Isoformas por IEF após Armazenamento à Temperatura de -70°C

Tempo (meses)	Variação de pI (número de isoformas)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	6,75-7,17 (4)	6,74-7,17 (4)	6,71-7,14 (4)	6,69-7,10 (4)
3	6,39-6,76 (4)	6,39-6,74 (4)	6,38-6,73 (4)	NT
6	6,53-6,78 (4)	6,63-6,85 (4)	6,64-6,88 (4)	NT
9	6,60-6,89 (4)	6,60-6,88 (4)	6,60-6,89 (4)	6,61-6,89 (4)
12	6,67-6,93 (4)	6,64-6,91 (4)	6,65-6,96 (4)	6,69-6,99 (4)

**Tabela 22:** Variação de pI e Número de Isoformas por IEF após Armazenamento à Temperatura de +5°C

Tempo (meses)	Variação de pI (número de isoformas)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	6,75-7,17 (4)	6,74-7,17 (4)	6,71-7,14 (4)	6,69-7,10 (4)
3	6,59-6,85 (4)	6,59-6,85 (4)	6,59-6,86 (4)	NT
6	6,66-6,91 (4)	6,65-6,89 (4)	6,68-6,95 (4)	NT
9	6,66-6,94 (4)	6,66-6,94 (4)	6,64-6,90 (4)	6,63-6,89 (4)
12	6,62-6,91 (4)	6,63-6,94 (4)	6,62-6,92 (4)	6,61-6,89 (4)

**Tabela 23:** Variação de pI e Número de Isoformas por IEF após Armazenamento à Temperatura de +25°C

Tempo (meses)	Variação de pI (número de isoformas)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	6,75-7,17 (4)	6,74-7,17 (4)	6,71-7,14 (4)	6,69-7,10 (4)
3	6,59-6,80 (4)	6,62-6,83 (4)	6,61-6,84 (4)	NT
6	6,65-6,90 (4)	6,69-6,98 (4)	6,64-6,93 (4)	NT
9	6,62-6,85 (4)	6,61-6,85 (4)	6,64-6,87 (4)	6,64-6,89 (4)
12	6,62-6,85 (4)	6,61-6,86 (4)	6,61-6,86 (4)	6,62-6,88 (4)

**Tabela 24:** Variação de pI e Número de Isoformas por IEF após Armazenamento à Temperatura de +37°C

Tempo (semanas)	Variação de pI (número de isoformas)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	6,65-6,95 (4)	6,65-6,93 (4)	6,63-6,92 (4)	6,64-6,93 (4)
1	6,47-6,77 (4)	6,60-6,84 (4)	6,63-6,88 (4)	NT
2	6,57-6,78 (4)	6,56-6,79 (4)	6,58-6,82 (4)	NT
4	6,62-6,84 (4)	6,68-6,95 (4)	6,69-6,98 (4)	NT
8	6,61-6,86 (5)	6,20-6,85 (7)	6,28-6,89 (7)	6,26-6,91(7)

**Tabela 25:** Variação de pI e Número de Isoformas por IEF após Armazenamento à Temperatura de +45°C

Tempo (dias)	Variação de pI (número de isoformas)			
	CF	TF1A	TF1B	TF1C
0	6,65-6,95 (4)	6,65-6,93 (4)	6,63-6,92 (4)	6,64-6,93 (4)
1	6,61-6,84 (4)	6,64-6,88 (4)	6,64-6,89 (4)	NT
2	6,60,6,85 (4)	6,56-6,78 (4)	6,62-6,85 (4)	NT
5	6,63-6,91 (4)	6,65-6,95 (4)	6,64-6,95 (4)	6,64-6,93 (4)

NT = Não Testado

### Resumo dos Resultados da Análise de Estabilidade

#### Estabilidade à Temperatura de -70°C

[00193] As formulações CF e TF1A se mostraram estáveis por 12 meses à temperatura de -70°C. Os perfis analíticos foram similares em

0 e 12 meses, exceto quanto ao % de IgG intacto medido por SDS-PAGE de amostra não-reduzida, que diminuiu de 95,9% no t=0 para 89,9% em 12 meses para a CF, e de 96,2% no t=0 para 89,2% em 12 meses para a TF1A. Mediante o procedimento de HPLC, após 12 meses, a percentagem de monômero para ambas as formulações CF e TF1A foi de 100%. Ambas as formulações CF e TF1A exibiram 4 faixas no ensaio de IEF após 12 meses. Os resultados indicaram que as formulações CF e TF1A são comparáveis nessa temperatura.

#### Estabilidade à Temperatura de 5°C

[00194] As formulações CF e TF1A se mostraram estáveis por 12 meses à temperatura de 5°C. Os perfis analíticos foram similares em 0 e 12 meses, exceto quanto ao % de IgG intacto medido por SDS-PAGE de amostra não-reduzida, que diminuiu de 95,9% no t=0 para 89,5% em 12 meses para a CF, e de 96,2% no t=0 para 88,9% em 12 meses para a TF1A. Mediante o procedimento de HPLC, após 12 meses, a percentagem de monômero para ambas as amostras de formulações CF e TF1A foi de 100%. Ambas as formulações CF e TF1A exibiram 4 faixas no ensaio de IEF após 12 meses. Os resultados indicaram que as formulações CF e TF1A são comparáveis nessa temperatura.

#### Estabilidade à Temperatura de 25°C

[00195] As formulações CF e TF1A se mostraram estáveis por 12 meses à temperatura de 25°C. O % de IgG intacto medido por SDS-PAGE de amostra não-reduzida diminuiu de 95,9% no t=0 para 89,1% em 12 meses para a CF, e de 96,2% no t=0 para 87,5% em 12 meses para a TF1A. Ocorreu também uma faixa menor de alto peso molecular (> 220 kDa) em ambas as formulações no gel de SDS-PAGE de amostra não-reduzida que não foi detectada no t=0. Mediante o procedimento de HPLC, após 12 meses, a percentagem de monômero para ambas as amostras de formulações CF e TF1A foi de 98,9 e 96,42%, respectivamente. Ambas as amostras de formulações CF e TF1A

exibiram 4 faixas no ensaio de IEF após 12 meses. Os resultados indicaram que as formulações CF e TF1A são comparáveis nessa temperatura.

Estabilidade à Temperatura de 37°C

[00196] As formulações CF e TF1A se mostraram estáveis por 4 semanas à temperatura de 37°C, mas falharam no atendimento à especificação projetada para alguns parâmetros após 8 semanas, notadamente, quanto à pureza, mediante SDS-PAGE de amostra não-reduzida (ambas as formulações) e % de monômero mediante GF-HPLC (somente a formulação TF1A; resultado da linha marginal). Os resultados indicaram que a formulação CF é mais estável que TF1A nessa temperatura durante um período de 8 semanas.

Estabilidade à Temperatura de 45°C

[00197] As formulações CF e TF1A se mostraram estáveis por 5 dias à temperatura de 45°C, embora tenham ocorrido pequenas mudanças nos perfis analíticos depois desse período (algumas adicionais faixas menores no ensaio de SDS-PAGE e géis de IEF). Os resultados indicaram que as formulações CF e TF1A são comparáveis nessa temperatura durante um período de 5 dias.

## REIVINDICAÇÕES

1. Composição farmacêutica, **caracterizada** pelo fato de compreender um anticorpo de IL-13, tampão de acetato de sódio 50 mM, cloreto de sódio 85mM e 0,01% (peso/peso) de Polissorbato 80 tamponados para um pH de 4,5 a 6,0 com dito tampão de acetato de sódio.

2. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizada** pelo fato de que o anticorpo de IL-13 é um anticorpo monoclonal de IL-13 humano.

3. Composição farmacêutica, de acordo com a reivindicação 1 ou reivindicação 2, **caracterizada** pelo fato de que o anticorpo de IL-13 está presente na composição farmacêutica numa quantidade entre 1 e 200 mg/mL.

4. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, **caracterizada** pelo fato de que o anticorpo IL-13 compreende um conjunto de regiões de determinação de complementaridade (CDRs) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que

HCDR1 possui a sequência de aminoácidos NYGLS (SEQ ID NO: 1);

HCDR2 possui a sequência de aminoácidos WISANNGDTNYGQEFQG (SEQ ID NO: 2);

HCDR3 possui a sequência de aminoácidos DSSSSWARWFFDL (SEQ ID NO: 9);

LCDR1 possui a sequência de aminoácidos GGNIIGSKLVH (SEQ ID NO: 10);

LCDR2 possui a sequência de aminoácidos DDGDRPS (SEQ ID NO: 5); e

LCDR3 possui a sequência de aminoácidos QVWDTGSDPVV (SEQ ID NO: 12).

5. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, **caracterizada** pelo fato de que o anticorpo IL-13 compreende uma região variável da cadeia pesada (VH) tendo a sequência de aminoácidos:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYGLSWVR  
QAPGQGLEWMGWISANNGDTNYGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMEL  
RSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLTVSS (SEQ ID  
NO: 15);

e uma região variável da cadeia leve (VL) tendo a sequência de aminoácidos:

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPG  
QAPVLVIYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC  
QVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 16).

6. Composição farmacêutica, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 5, **caracterizada** pelo fato de ser tamponada para um pH de 5,2 a 5,7.

7. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, **caracterizada** pelo fato de ser tamponada para um pH de  $5,5 \pm 0,1$ .

8. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, **caracterizada** pelo fato de compreender 50 mg/mL de um anticorpo IL-13.

9. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, **caracterizada** pelo fato de compreender 100 mg/mL de um anticorpo IL-13.

10. Composição farmacêutica, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, **caracterizada** pelo fato de compreender 150 mg/mL de um anticorpo IL-13.

11. Processo para purificação de um anticorpo de IL-13, o qual compreende uma ou mais etapas de separação cromatográfica,

**caracterizado** pelo fato de que cada uma das ditas etapas de separação compreende a eluição com um tampão de eluição que compreende um ou mais excipientes farmacologicamente aceitáveis, tamponados para um pH de 3,5 a 7,0 com um tampão de acetato.

12. Processo, de acordo com a reivindicação 11, **caracterizado** pelo fato de que as etapas de separação cromatográfica são selecionadas de cromatografia por afinidade e cromatografia por troca de íons.

13. Processo, de acordo com a reivindicação 12, **caracterizado** pelo fato de que a separação cromatográfica é realizada mediante cromatografia por afinidade com a Proteína A, seguido de cromatografia por troca de cátion e seguida por cromatografia por troca de anion.

14. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 13, **caracterizado** pelo fato de que os ditos um ou mais excipientes farmacologicamente aceitáveis compreendem um sal inorgânico.

15. Processo, de acordo com a reivindicação 14, **caracterizado** pelo fato de que o sal inorgânico é cloreto de sódio, presente no tampão de eluição numa quantidade entre 10 e 200mM.

16. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 15, **caracterizado** pelo fato de que o tampão de acetato é acetato de sódio, presente no tampão de eluição numa quantidade entre 1 e 100mM.

17. Processo, de acordo com qualquer uma das reivindicações 11 a 16, **caracterizado** pelo fato de que o tampão de eluição compreende acetato de sódio 50mM e cloreto de sódio 85mM tamponados para um pH de  $5,5 \pm 0,1$ .

18. Uso de uma composição farmacêutica contendo um anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 to

10, **caracterizado** pelo fato de ser na fabricação de um medicamento para o tratamento de um distúrbio correlacionado a IL-13.

19. Uso, de acordo com a reivindicação 18, **caracterizado** pelo fato de que o distúrbio correlacionado à IL-13 é selecionado de asma, dermatite atópica, rinite alérgica, fibrose, doença pulmonar obstrutiva crônica, escleroderma, doença inflamatória do intestino e linfoma de Hodgkin.

20. Uso, de acordo com a reivindicação 19, **caracterizado** pelo fato de que o distúrbio correlacionado à IL-13 é dermatite atópica.

21. Composição farmacêutica contendo um anticorpo, conforme definido em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, **caracterizada** pelo fato de ser para uso no tratamento de um distúrbio relacionado à IL-13.

22. Composição farmacêutica contendo um anticorpo, de acordo com a reivindicação 21, **caracterizada** pelo fato de que o distúrbio relacionado à IL-13 é selecionado do grupo que consiste em asma, dermatite atópica, rinite alérgica, fibrose, doença pulmonar obstrutiva crônica, escleroderma, doença inflamatória do intestino e linfoma de Hodgkin.

23. Composição farmacêutica contendo um anticorpo para uso, de acordo com a reivindicação 22, **caracterizada** pelo fato de que o distúrbio correlacionado à IL-13 é dermatite atópica.

24. Processo, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que anticorpo IL-13 é um anticorpo monoclonal humano.

25. Processo, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo IL-13 compreende um conjunto de regiões de determinação de complementaridade (CDRs) HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 e LCDR3, em que

HCDR1 possui a sequência de aminoácidos NYGLS (SEQ ID

NO: 1);

HCDR2 possui a sequência de aminoácidos WISANNGDTNYGQEFQG (SEQ ID NO: 2);

HCDR3 possui a sequência de aminoácidos DSSSSW ARWFFDL (SEQ ID NO: 9);

LCDRI possui a sequência de aminoácidos GGNIIGSKLVH (SEQ ID NO: 10);

LCDR2 possui a sequência de aminoácidos DDGDRPS (SEQ ID NO: 5); e

LCDR3 possui a sequência de aminoácidos QVWDTGSDPVV (SEQ ID NO: 12).

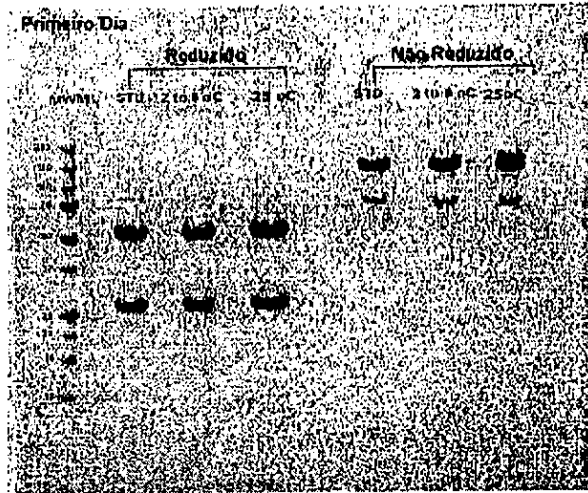
26. Processo, de acordo com a reivindicação 17, **caracterizado** pelo fato de que o anticorpo IL-13 compreende uma região variável da cadeia pesada (VH) tendo a sequência de aminoácidos:

QVQLVQSGAEVKKPGASVKV SCKASGYTFTNYGLSWVR  
QAPGQGLEWMGWISANNGDTNYGQEFQGRVTMTTDTSTSTAYMEL  
RSLRSDDTAVYYCARDSSSSWARWFFDLWGRGTLVTVSS (SEQ ID  
NO: 15);

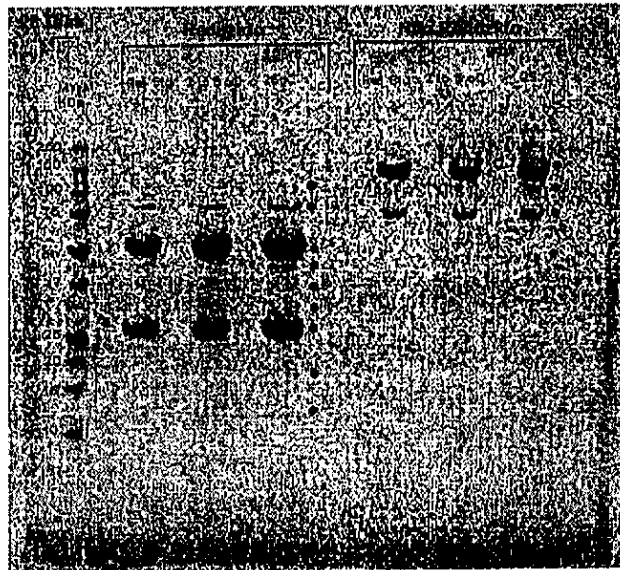
e uma região variável da cadeia leve (VL) tendo a sequência de aminoácidos:

SYVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNIIGSKLVHWYQQKPG  
QAPVLVIYDDGDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC  
QVWDTGSDPVVFGGGTKLTVL (SEQ ID NO: 16).

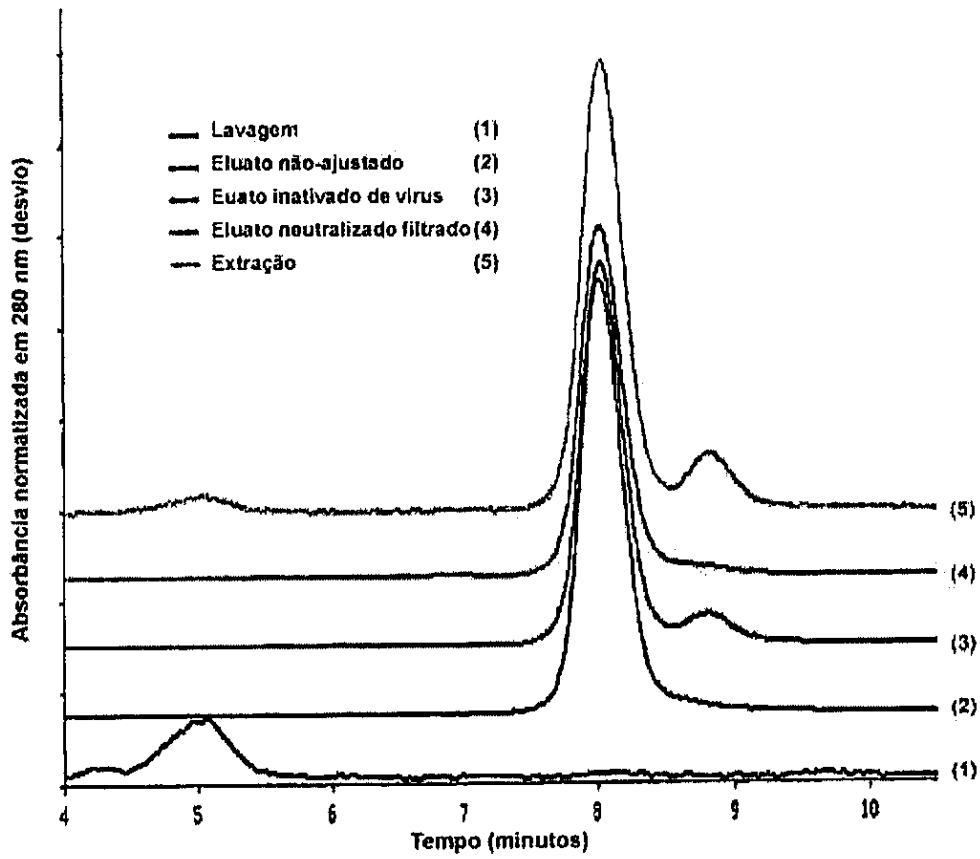
**Figura 1:** Resultados da Análise de SDS-PAGE de 28 dias no Dia Um



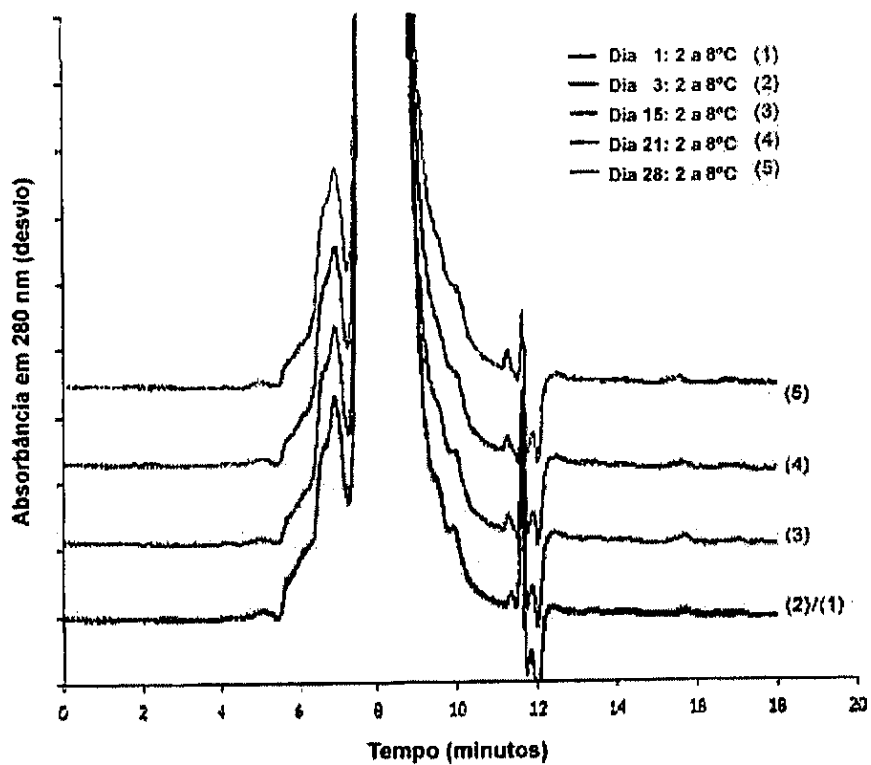
**Figura 2:** Resultados da Análise de SDS-PAGE de 28 dias no Dia Vinte e Um



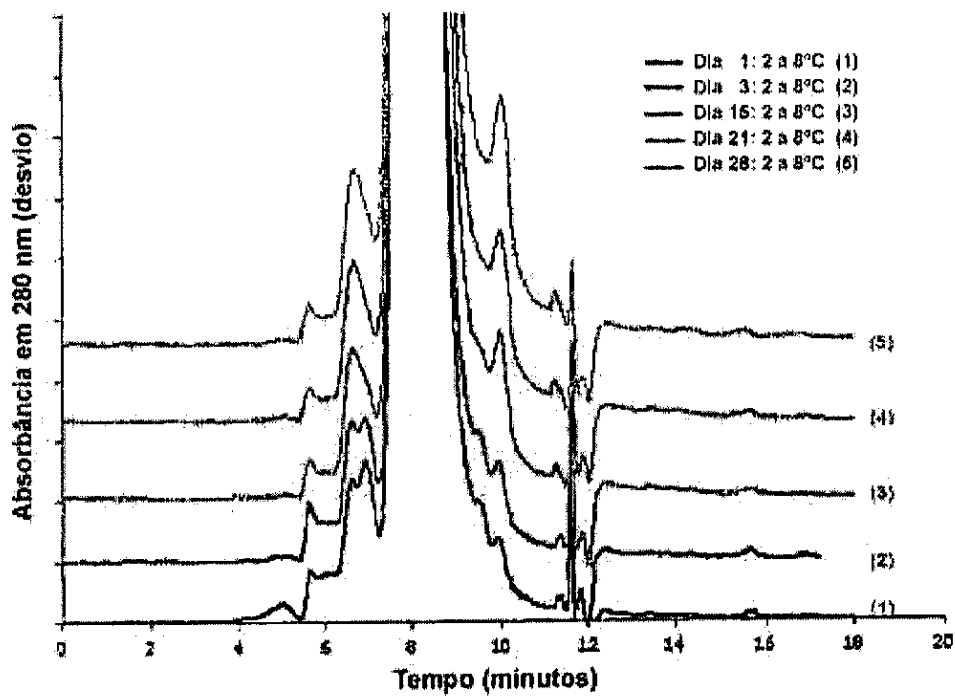
**Figura 3:** Cromatogramas do Dia Um, resultantes da Análise de GP-HPLC de 28 dias de Frações de Proteína A



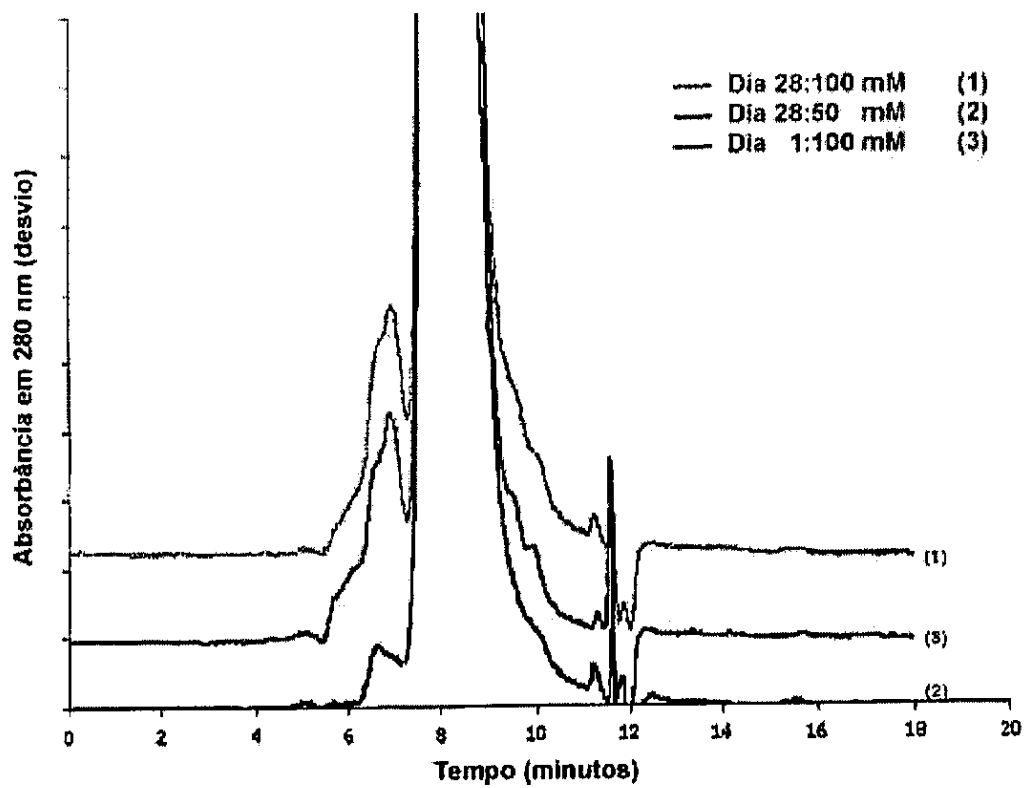
**Figura 4:** Ampliação de Cromatogramas da Análise de GP-HPLC de 28 dias de Eluatos Armazenados à Temperatura de 2 a 8°C

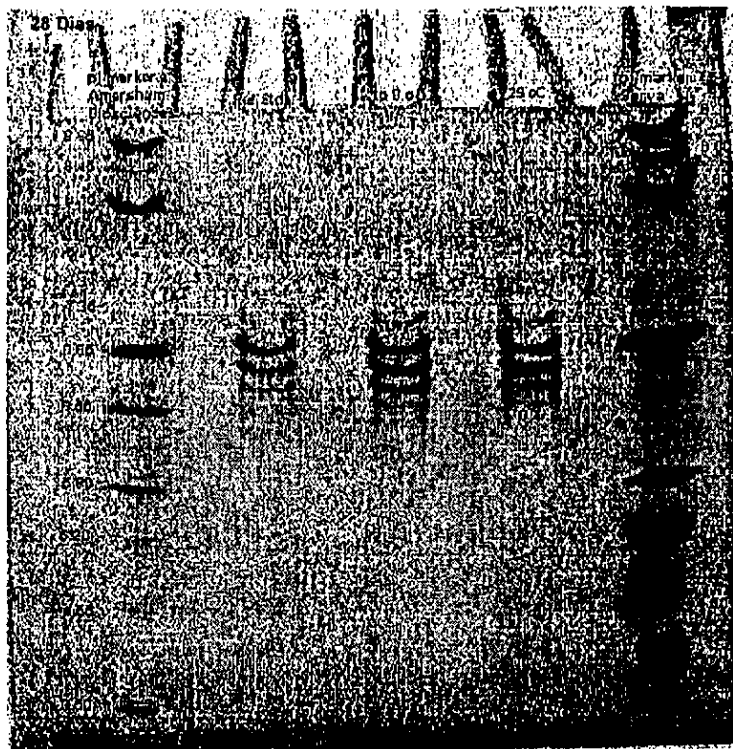
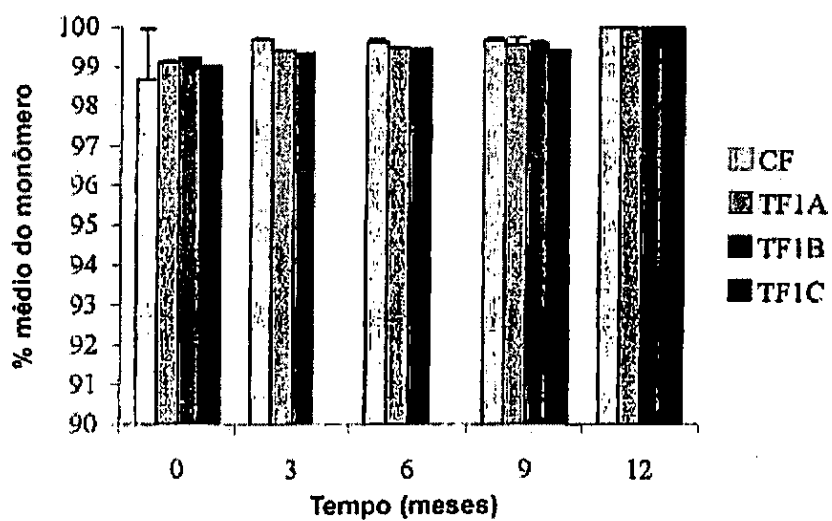


**Figura 5:** Ampliação de Cromatogramas da Análise de GP-HPLC de 28 dias de Eluatos Armazenados à Temperatura de 2 a 8°C

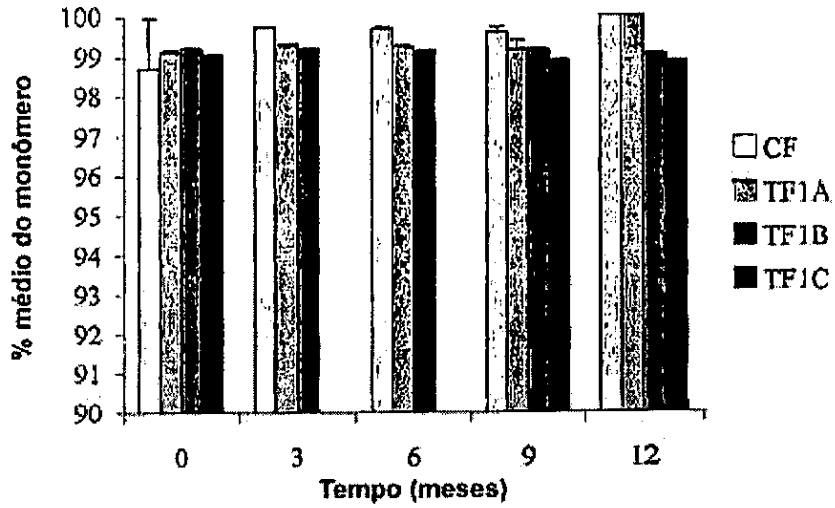


**Figura 6:** Ampliação de Cromatogramas da Análise de GP-HPLC de 28 dias de Eluatos Neutralizados com Hidróxido de sódio a 100 mM ou 50 mM

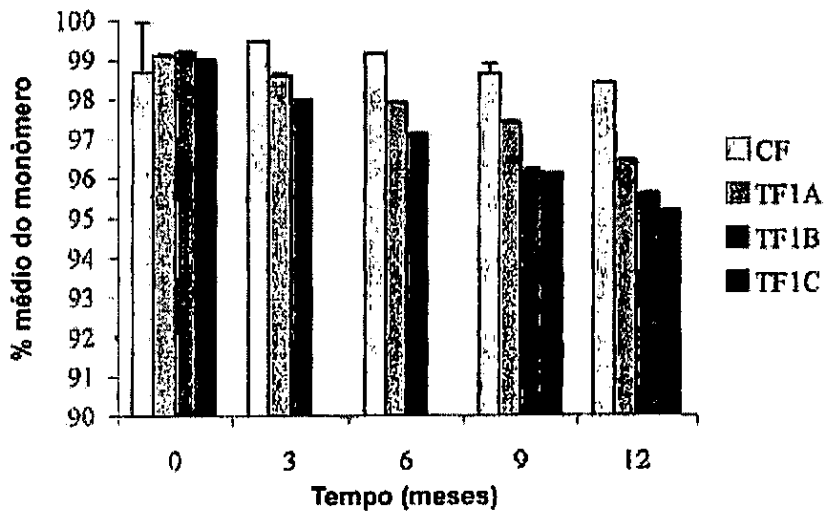


**Figura 7:** Análise de IEF de 28 Dias no Dia Vinte e Oito**Figura 8:** Análise de HPLC por Filtração de Gel de um Período de 12 Meses, com o Material Armazenado à Temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ 

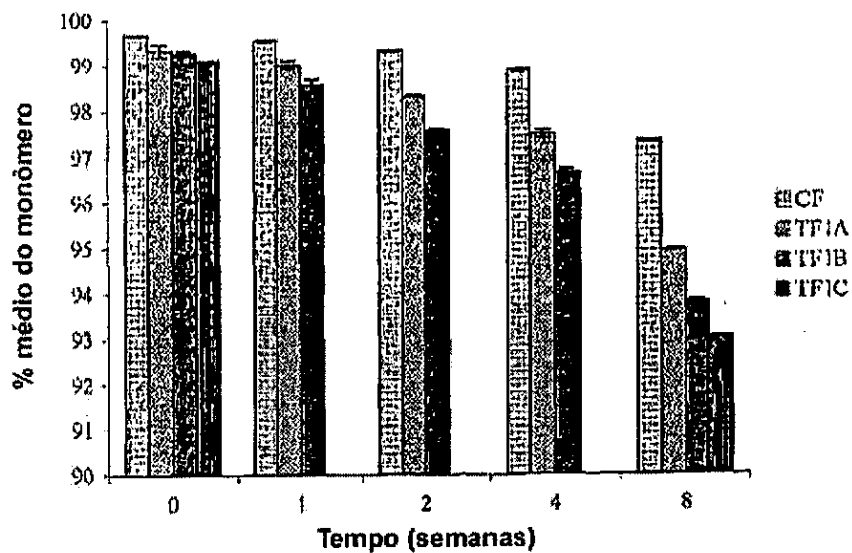
**Figura 9:** Análise de HPLC por Filtração de Gel de um Período de 12 Meses, com o Material Armazenado à Temperatura de +5°C



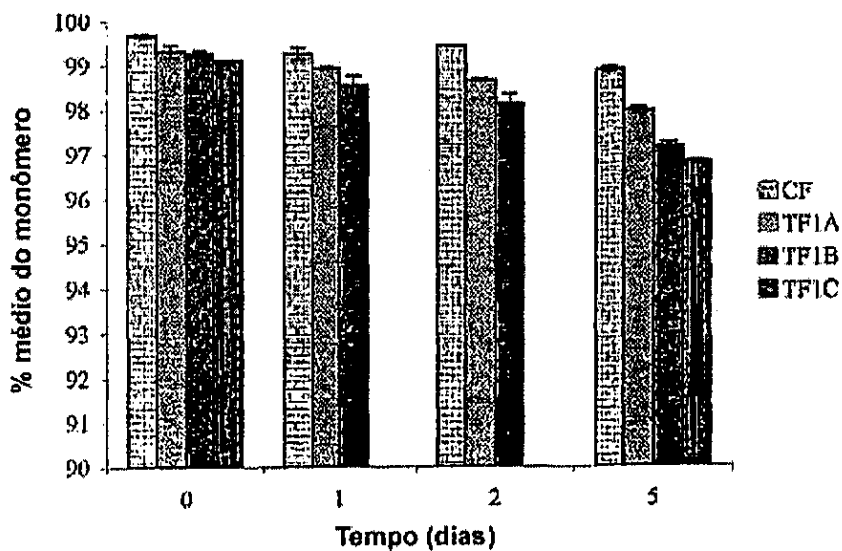
**Figura 10:** Análise de HPLC por Filtração de Gel de um Período de 12 Meses, com o Material Armazenado à Temperatura de +25°C



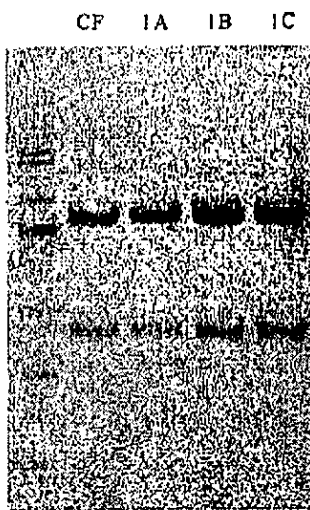
**Figura 11:** Análise de HPLC por Filtração de Gel de um Período de 8 Semanas, com o Material Armazenado à Temperatura de +37°C



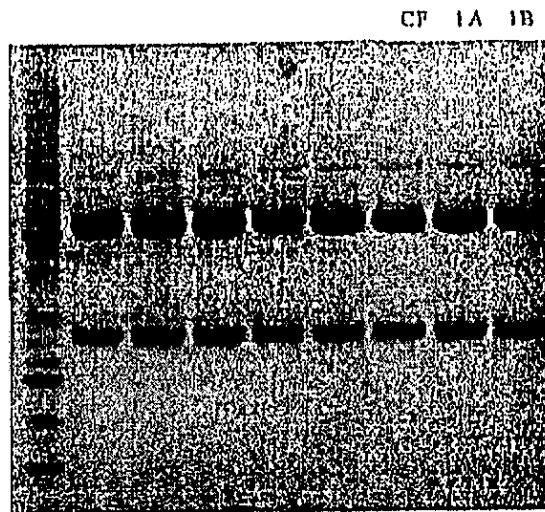
**Figura 12:** Análise de HPLC por Filtração de Gel de um Período de 5 Dias, com o Material Armazenado à Temperatura de +45°C



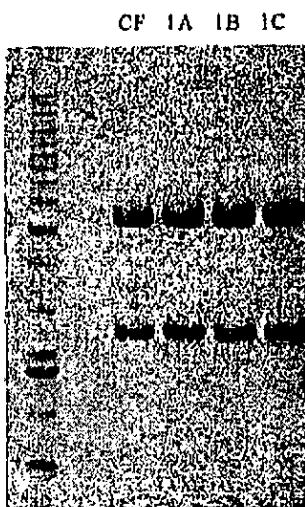
**Figura 13:** Análise de SDS-PAGE de Amostras Reduzidas no Período de 0, 6 e 12 Meses, com o Material Armazenado à Temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$



**Tempo = 0**

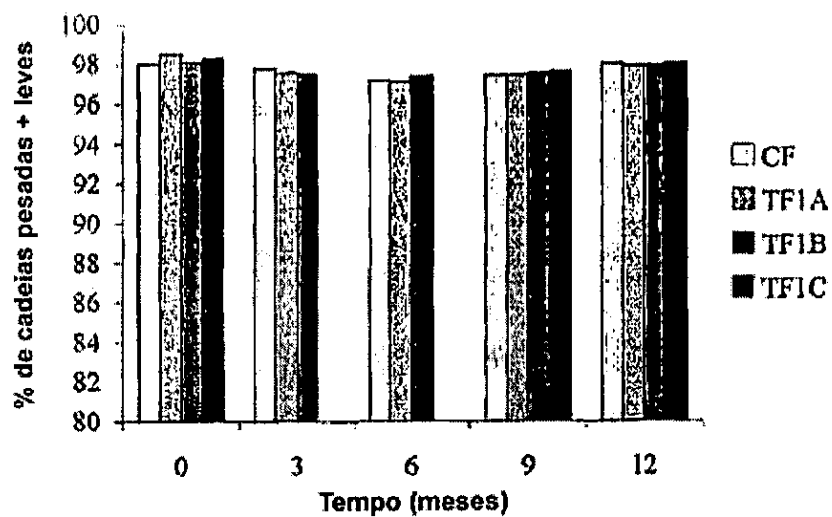


**6 Meses à  $-70^{\circ}\text{C}$**



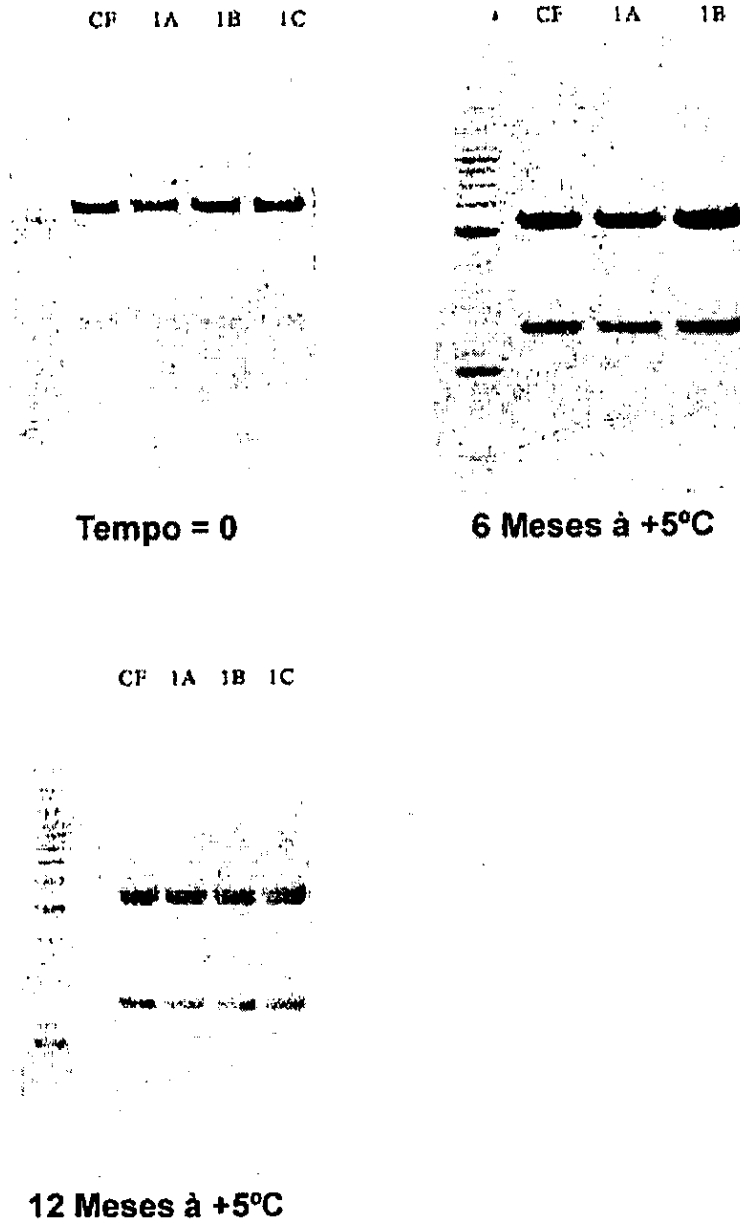
**12 Meses à  $-70^{\circ}\text{C}$**

**Figura 14:** Percentagem Abundante de Cadeias Pesadas e Leves de BAK502G9, após Análise de SDS-PAGE de Amostra Reduzida, com o Material Armazenado à Temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ .

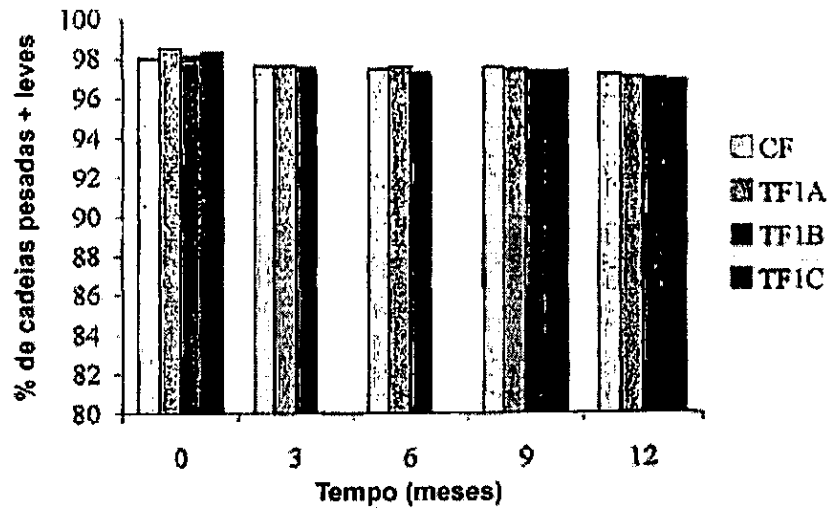


96  
R1

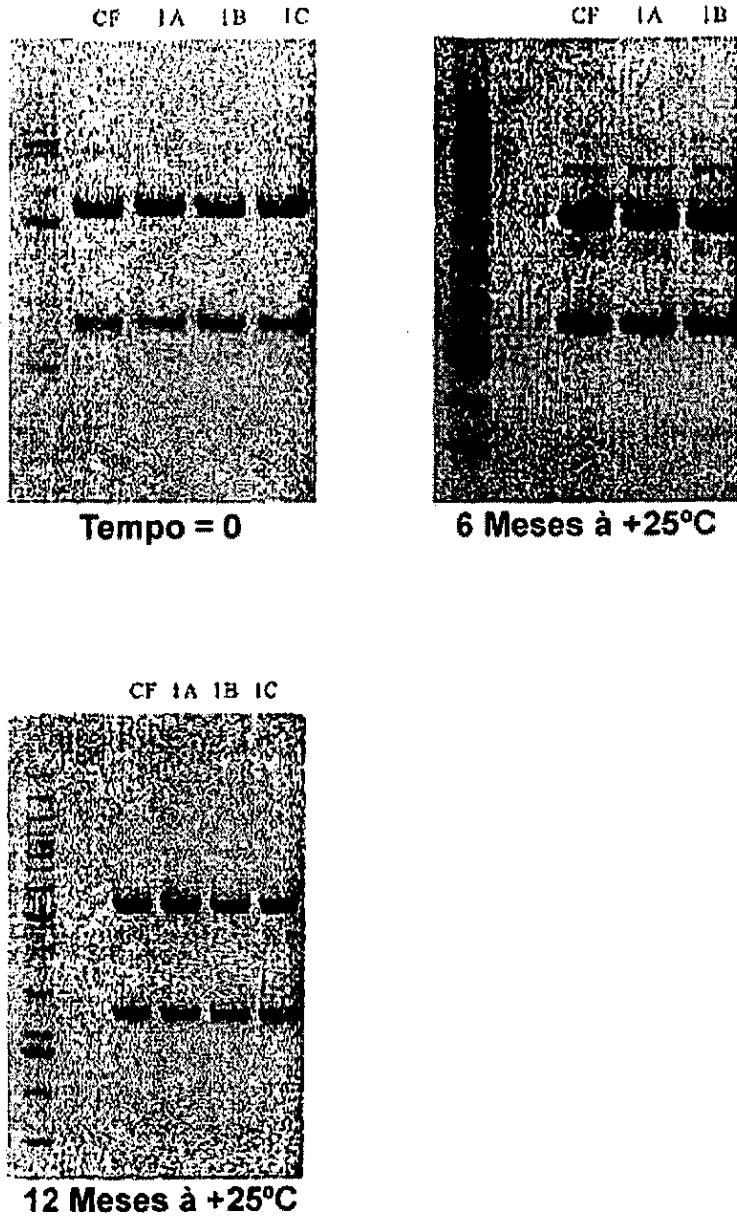
**Figura 15:** Análise de SDS-PAGE de Amostras Reduzidas no Período de 0, 6 e 12 Meses, com o Material Armazenado à Temperatura de +5°C



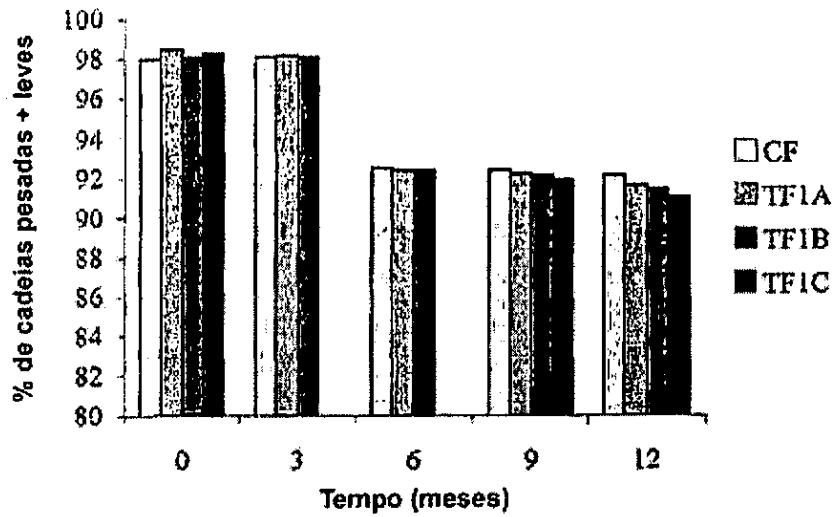
**Figura 16:** Percentagem Abundante de Cadeias Pesadas e Leves de BAK502G9, após Análise de SDS-PAGE de Amostra Reduzida, com o Material Armazenado à Temperatura de +5°C.



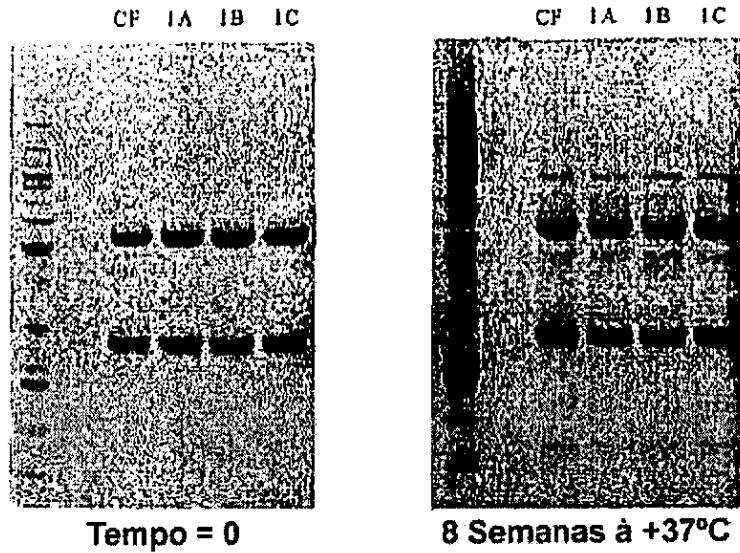
**Figura 17:** Análise de SDS-PAGE de Amostras Reduzidas no Período de 0, 6 e 12 Meses, com o Material Armazenado à Temperatura de +25°C



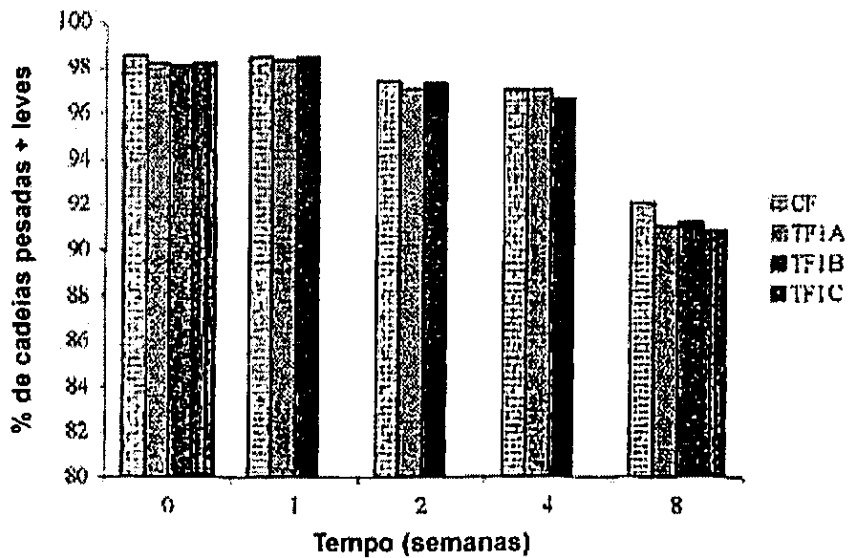
**Figura 18:** Percentagem Abundante de Cadeias Pesadas e Leves de BAK502G9, após Análise de SDS-PAGE de Amostra Reduzida, com o Material Armazenado à Temperatura de +25°C.



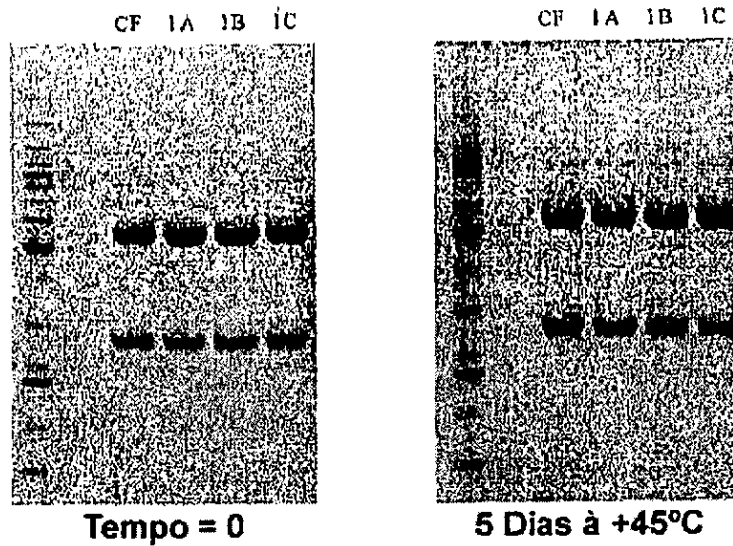
**Figura 19:** Análise de SDS-PAGE de Amostras Reduzidas no Período de 0 e 8 Semanas, com o Material Armazenado à Temperatura de +37°C



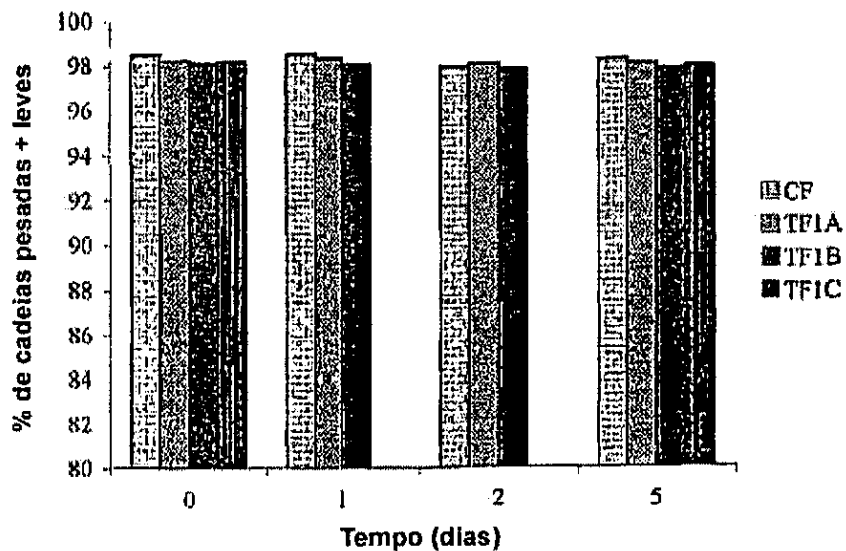
**Figura 20:** Percentagem Abundante de Cadeias Pesadas e Leves de BAK502G9, após Análise de SDS-PAGE de Amostra Reduzida, com o Material Armazenado à Temperatura de +37°C.



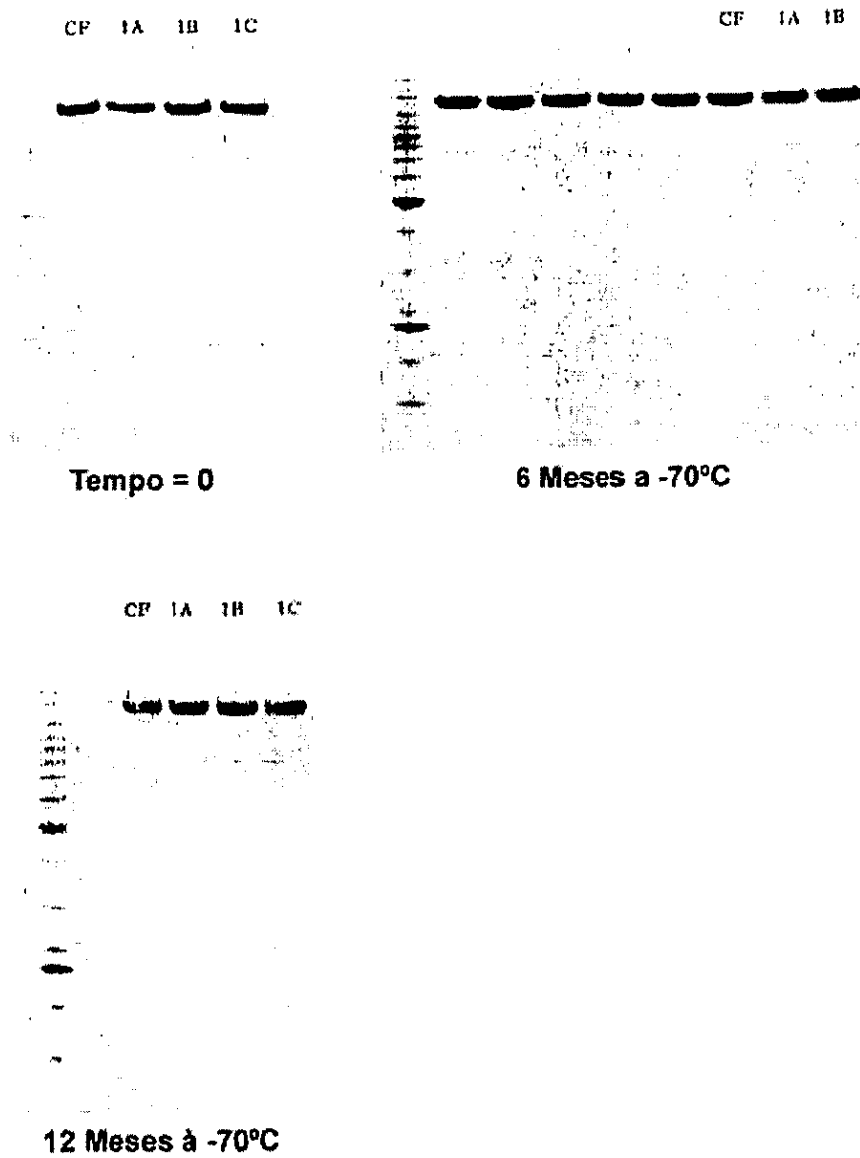
**Figura 21:** Análise de SDS-PAGE de Amostras Reduzidas no Período de 0 e 5 Dias, com o Material Armazenado à Temperatura de +45°C



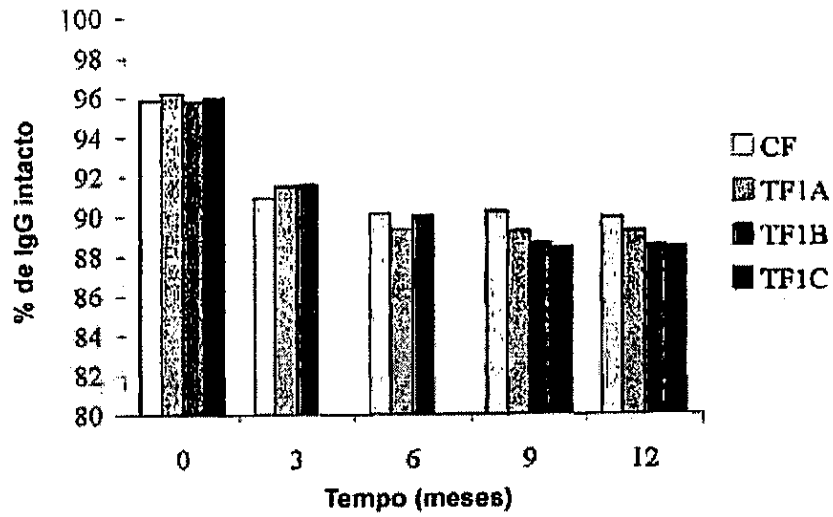
**Figura 22:** Percentagem Abundante de Cadeias Pesadas e Leves de BAK502G9, após Análise de SDS-PAGE de Amostra Reduzida, com o Material Armazenado à Temperatura de +45°C.



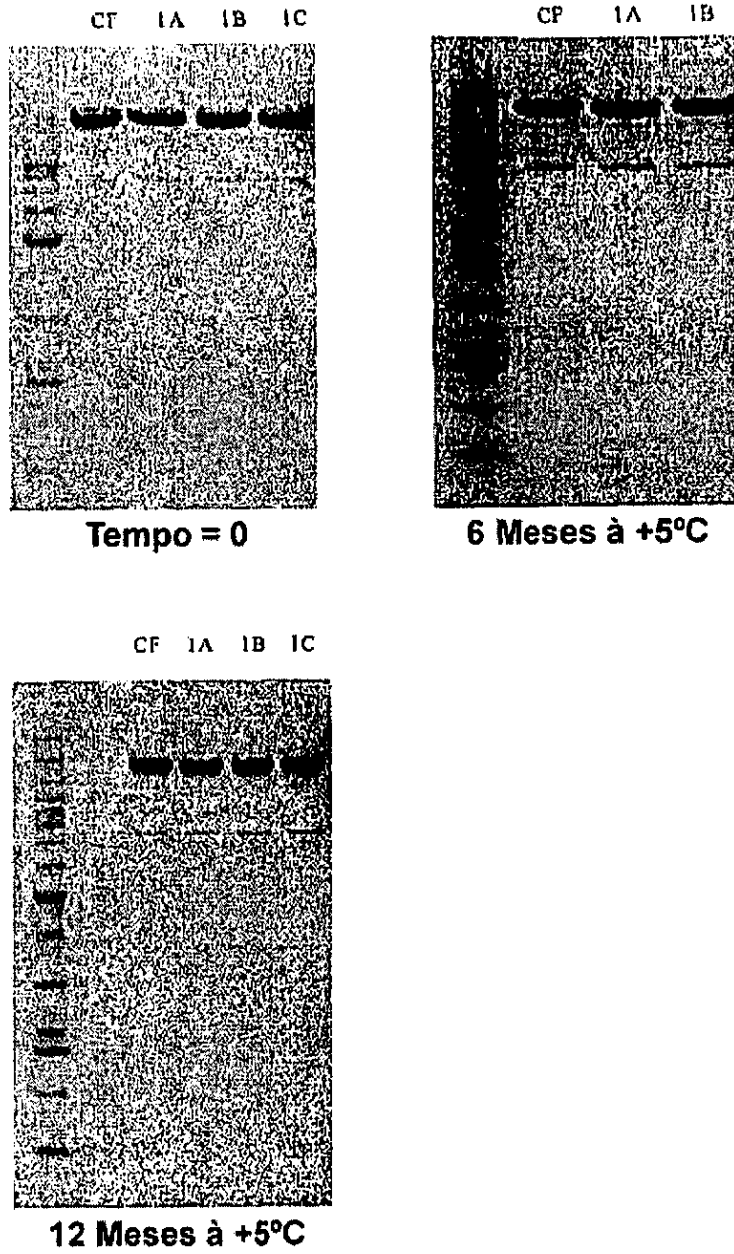
**Figura 23:** Análise de SDS-PAGE de Amostras Não-Reduzidas no Período de 0, 6 e 12 Meses, com o Material Armazenado à Temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$



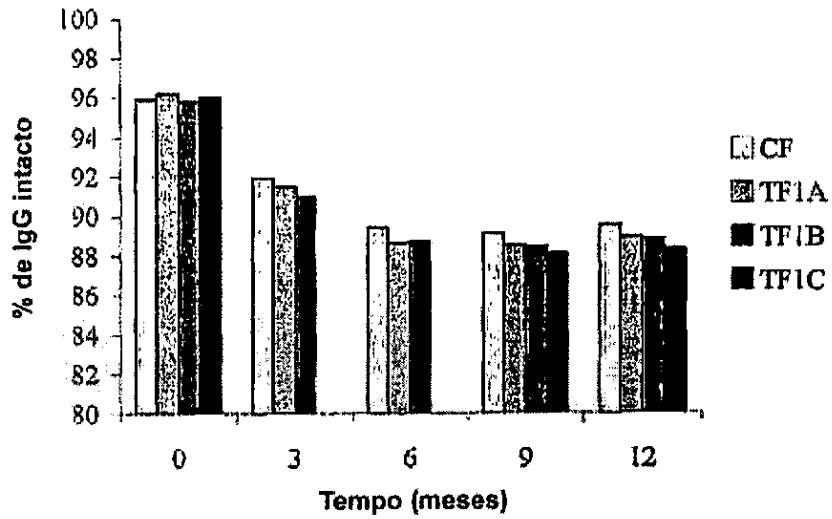
**Figura 24:** Percentagem Abundante de Monômero Intacto de BAK502G9, após Análise de SDS-PAGE de Amostras Não-Reduzidas, com o Material Armazenado à Temperatura de  $-70^{\circ}\text{C}$ .



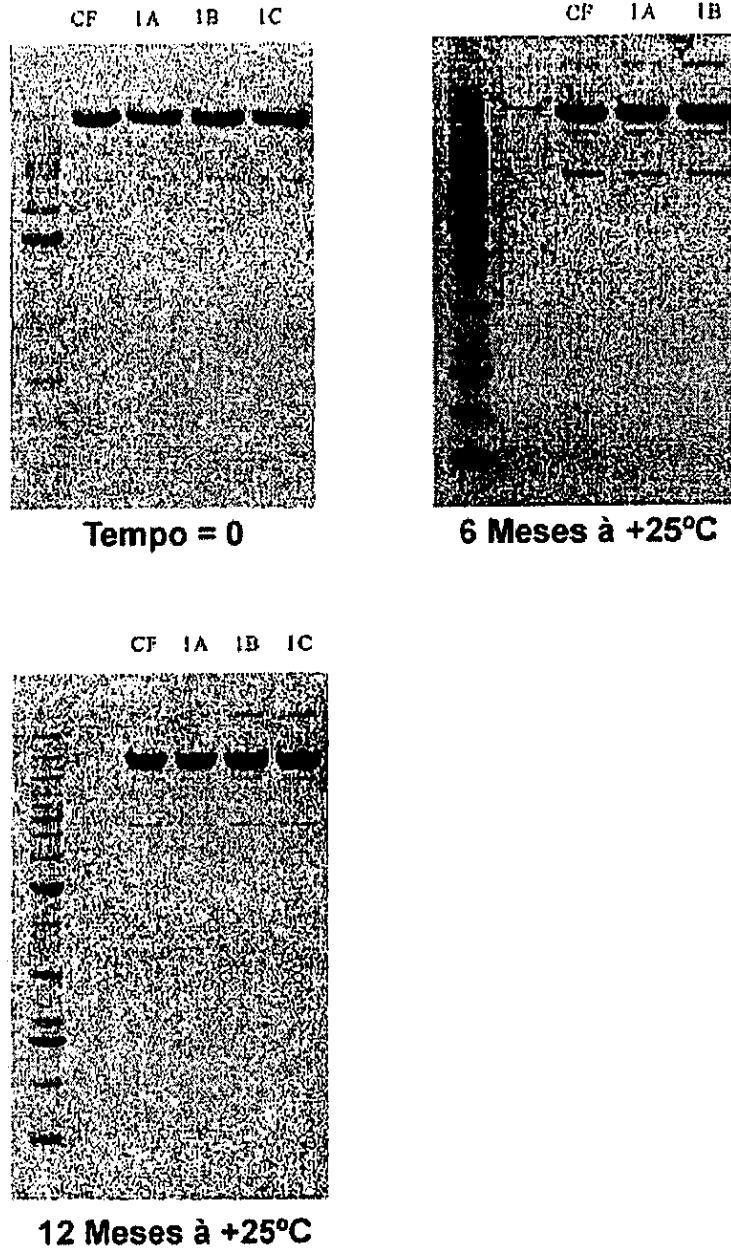
**Figura 25:** Análise de SDS-PAGE de Amostras Não-Reduzidas no Período de 0, 6 e 12 Meses, com o Material Armazenado à Temperatura de +5°C



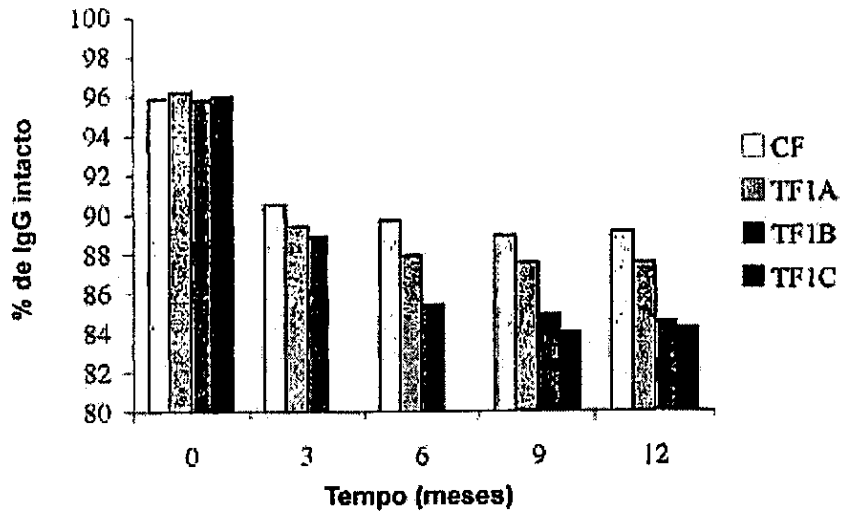
**Figura 26:** Percentagem Abundante de Monômero Intacto de BAK502G9, após Análise de SDS-PAGE de Amostras Não-Reduzidas, com o Material Armazenado à Temperatura de +5°C.



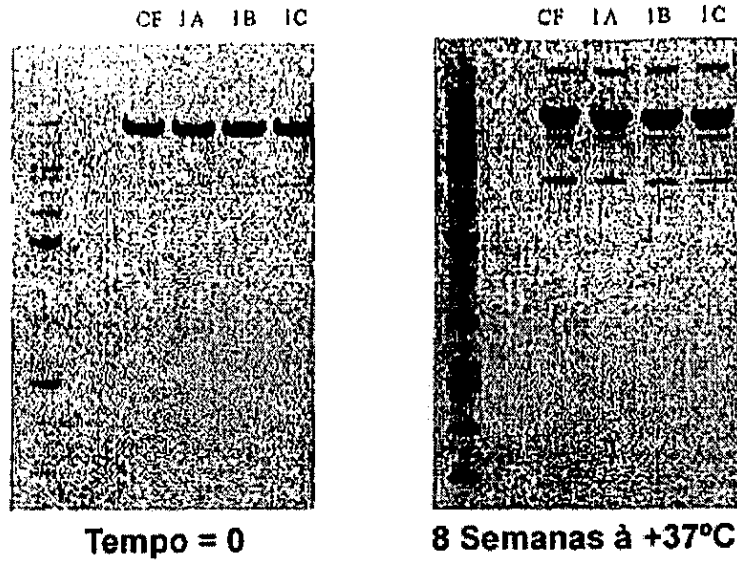
**Figura 27:** Análise de SDS-PAGE de Amostras Não-Reduzidas no Período de 0, 6 e 12 Meses, com o Material Armazenado à Temperatura de +25°C



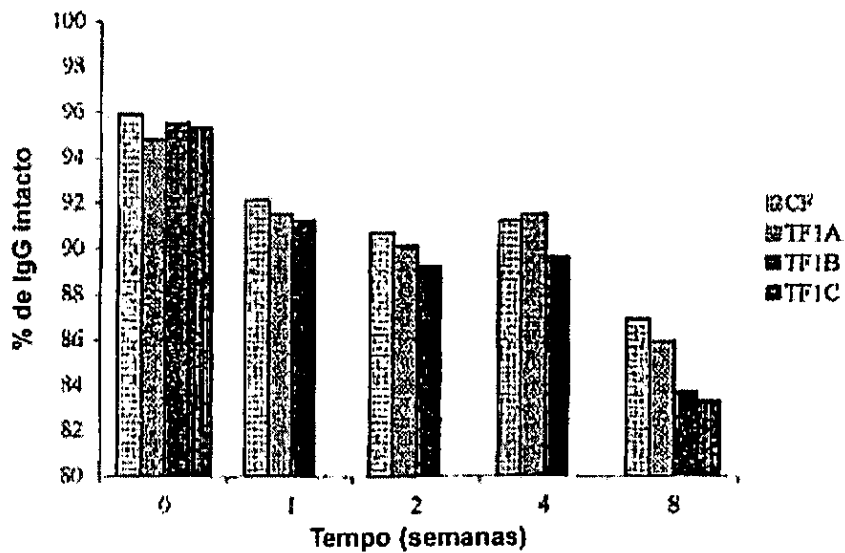
**Figura 28:** Percentagem Abundante de Monômero Intacto de BAK502G9, após Análise de SDS-PAGE de Amostras Não-Reduzidas, com o Material Armazenado à Temperatura de +25°C.



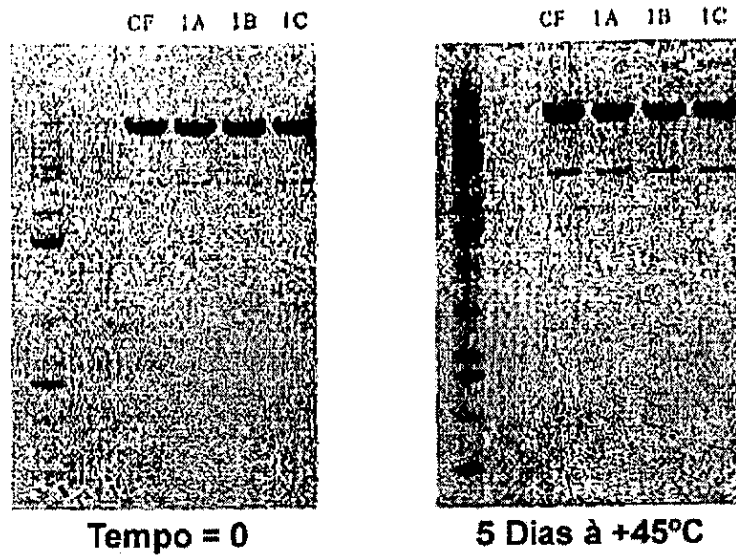
**Figura 29:** Análise de SDS-PAGE de Amostras Não-Reduzidas no Período de 0 e 8 Semanas, com o Material Armazenado à Temperatura de +37°C



**Figura 30:** Percentagem Abundante de Monômero Intacto de BAK502G9, após Análise de SDS-PAGE de Amostra Não-Reduzida, com o Material Armazenado à Temperatura de +37°C.



**Figura 31:** Análise de SDS-PAGE de Amostras Não-Reduzidas no Período de 0 e 5 Dias, com o Material Armazenado à Temperatura de +45°C



**Figura 32:** Percentagem Abundante de Monômero Intacto de BAK502G9, após Análise de SDS-PAGE de Amostra Não-Reduzida, com o Material Armazenado à Temperatura de +45°C.

