



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

(21) **PI 0713266-2 A2**

(22) Data de Depósito: 12/06/2007
(43) Data da Publicação: 17/04/2012
(RPI 2154)



(51) *Int.Cl.:*
B01D 37/00

(54) Título: MÉTODOS PARA REDUZIR OU IMPEDIR SEPARAÇÃO DE FASE LÍQUIDA-LÍQUIDA EM SOLUÇÕES DE PROTEÍNA DE CONCENTRAÇÃO ALTA

(30) Prioridade Unionista: 12/06/2006 US 60/812760

(73) Titular(es): Wyeth

(72) Inventor(es): Angela Kantor, Li Li, Nicholas W. Warne

(74) Procurador(es): Dannemann, Siemsen, Bigler & Ipanema Moreira

(86) Pedido Internacional: PCT US2007013747 de 12/06/2007

(87) Publicação Internacional: WO 2007/146268de 21/12/2007

(57) Resumo: MÉTODOS PARA REDUZIR OU IMPEDIR SEPARAÇÃO DE FASE LÍQUIDA-LÍQUIDA EM SOLUÇÕES DE PROTEÍNA DE CONCENTRAÇÃO ALTA. A presente invenção refere-se a métodos de formular proteínas em concentrações altas nas soluções de proteína, em que as soluções de proteína carecem ou têm separação de fase líquida-líquida reduzida, são descritos. Tais soluções de proteína são substancialmente claras e substancialmente homogêneas. Adicionalmente, métodos de concentrar e purificar proteínas usando separação de fase líquida-líquida são fornecidos.

Relatório Descritivo da Patente de Invenção para "**MÉTODOS PARA REDUZIR OU IMPEDIR SEPARAÇÃO DE FASE LÍQUIDA-LÍQUIDA EM SOLUÇÕES DE PROTEÍNA DE CONCENTRAÇÃO ALTA**".

REFERÊNCIA CRUZADA PEDIDOS DE PATENTE RELACIONADOS

5 Este pedido de patente reivindica o benefício do Pedido de Patente Provisório U. S. N° 60/812.760, depositado em 12 de junho de 2006, os conteúdos deste são incorporados aqui por referência.

CAMPO DA INVENÇÃO

10 A presente invenção refere-se em geral ao campo de formulações de proteína.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

15 A disponibilidade da proteína derivada de biotecnologia e fármacos de peptídeo tem criado opções novas para o tratamento e prevenção de numerosas doenças. Terapia com base em proteína, especialmente terapia baseada em anticorpo monoclonal, se tornou um método importante para tratar doenças tais como câncer, doenças alérgicas, asma, e artrite reumatóide.

20 Terapia com base em anticorpo é tipicamente administrada em um paciente em intervalos regulares, e requer doseamento de vários mg/kg através de injeção. Injeção subcutânea é uma rota preferida de administração destas terapias. Por causa dos volumes pequenos usados para injeção subcutânea (usualmente 1,5 ml), para terapias de anticorpo de dose alta, esta rota de administração requer formulações de proteína de concentração alta.

25 Um dos desafios em usar as soluções de proteína de concentração alta é o desenvolvimento de opalescência (isto é, nebulosidade) em soluções de proteína acima de uma concentração de proteína particular. Este fenômeno pode criar soluções não-homogêneas e pode afetar o processamento da solução de proteína. Além disso, opalescência de uma solução
30 pode ter consequências comerciais negativas. Desse modo, é desejável obter uma solução de proteína clara para facilidade de manipulação durante o processamento, e para uma aparência mais atraente do produto de fármaco

final.

Consequentemente, há uma necessidade para desenvolver métodos para obter soluções de proteína de concentração alta que não são opalescentes (isto é, turvas).

5 SUMÁRIO DA INVENÇÃO

A invenção refere-se a métodos para formular soluções de proteína de concentração alta. Mais especificamente, a invenção refere-se aos métodos para reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida de soluções de proteína formuladas em concentrações altas da proteína. Desse modo, a invenção em geral fornece soluções de proteína de concentração alta que tem opalescência reduzida e, portanto são visivelmente claras. Como debatido aqui, uma solução visivelmente clara facilita a facilidade de manipulação durante o processamento, e é mais atraente como um produto comercializado. Além disso, a invenção fornece métodos de concentrar e purificar proteínas usando separação de fase líquida-líquida das soluções de proteína.

Em um aspecto, a invenção fornece métodos para determinar uma concentração na qual para reformular uma proteína em uma solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida a fim de reduzir ou impedir a separação de fase líquida-líquida da solução de proteína. Mais especificamente, os métodos para reduzir e/ou impedir separação de fase líquida-líquida inclui manter ou ajustar a solução para uma temperatura desejada. Por exemplo, um método compreende permitir a solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida sofrer separação de fase líquida-líquida em fases líquidas superior e inferior. A concentração da proteína na fase superior e inferior da solução de proteína que sofreu separação de fase líquida-líquida é depois medida. Uma concentração de proteína que é maior que a concentração de proteína da fase inferior da solução de proteína é selecionada para reformular a proteína. Formulação de uma solução de proteína usando uma concentração determinada desta maneira reduz ou impede a separação de fase líquida-líquida na solução de proteína na temperatura desejada. Em certas modalidades, a concentração de proteína na qual

para formular uma proteína em uma solução de proteína em uma temperatura desejada é selecionada para ser cerca de 0,5% a cerca de 40% mais alta que a concentração da proteína na fase inferior. Em outras modalidades, a concentração de proteína na qual para formular uma proteína em uma solução de proteína em uma temperatura desejada é selecionada para ser cerca de 0,5% a cerca de 5%, cerca de 5% a cerca de 10%, cerca de 10% a cerca de 20%, cerca de 20% a cerca de 30%, cerca de 30% a cerca de 40%, cerca de 5% a cerca de 20%, cerca de 5% a cerca de 30%, ou cerca de 5% a cerca de 40% mais alta que a concentração da proteína na fase inferior.

Em outros aspectos da invenção, os métodos para determinar uma concentração de proteína na qual para reformular uma proteína em uma solução de proteína que exhibe separação de fase líquida-líquida a fim de reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida da solução de proteína em uma temperatura desejada incluem construir uma curva de separação de fase para a solução de proteína, e selecionar uma concentração que está fora da curva de separação de fase na temperatura desejada. Uma concentração que está fora da curva de separação de fase na temperatura desejada permite reformulação da proteína na solução de proteína a fim de reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida na solução de proteína na temperatura desejada. Em certas modalidades deste aspecto, a curva de separação de fase é construída para representar em gráfico a concentração das duas fases líquidas coexistentes em equilíbrio da solução de proteína em duas ou mais temperaturas diferentes nas quais a solução de proteína exhibe separação de fase líquida-líquida. Em certas modalidades, pelo menos uma das duas ou mais temperaturas diferentes é a temperatura desejada.

Em um outro aspecto da invenção, os métodos para determinar uma concentração na qual para reformular uma proteína em uma solução de proteína a fim de reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida na solução de proteína em uma temperatura desejada incluem fornecer pelo menos uma primeira solução de proteína tendo uma concentração de proteína e uma primeira temperatura na qual a primeira solução de proteína exhibe separação de fase líquida-líquida, e pelo menos uma segunda solução de pro-

teína na concentração da primeira solução de proteína e uma segunda temperatura na qual a segunda solução de proteína exhibe separação de fase líquida-líquida. Estes métodos também envolvem permitir as primeira e segunda soluções de proteína sofrerem separação de fase líquida-líquida em uma fase superior e uma inferior. A concentração das proteínas nas fases superior e inferior das primeira e segunda soluções de proteína é medida e usada para a construção de uma curva de separação de fase. Esta curva de separação de fase especifica a concentração das fases superior e inferior em equilíbrio das primeira e segunda soluções de proteína nas primeira e segunda temperaturas. Uma concentração de proteína que está fora da curva de separação de fase na temperatura desejada é selecionada para reformular a proteína na solução de proteína a fim de reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida na solução de proteína na temperatura desejada. Em certas modalidades deste aspecto, uma terceira solução de proteína tendo a mesma concentração de proteína da primeira solução de proteína e uma terceira temperatura é permitida sofrer separação de fase líquida-líquida e as concentrações de suas camadas superior e inferior são incluídas na construção da curva de separação de fase. Em outras modalidades, uma quarta solução de proteína tendo a mesma concentração de proteína da primeira solução de proteína e uma quarta temperatura é permitida sofrer separação de fase líquida-líquida e as concentrações de suas camadas superior e inferior são incluídas na construção da curva de separação de fase. Em outra modalidade, uma quinta solução de proteína tendo a mesma concentração de proteína da primeira solução de proteína e uma quinta temperatura é permitida sofrer separação de fase líquida-líquida e as concentrações de suas camadas superior e inferior são incluídas na construção da curva de separação de fase. Como pode ser apreciado pelos ensinamentos aqui, as soluções de proteína adicionais podem ser incluídas na construção da curva de separação de fase usando os métodos descritos aqui.

Em outro aspecto da invenção, um método para determinar uma concentração na qual para reformular uma proteína em uma solução de proteína a fim de reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida na solu-

ção de proteína em uma temperatura desejada inclui fornecer a proteína em uma primeira solução de proteína em uma primeira concentração, fornecer a proteína em uma segunda solução de proteína em uma segunda concentração, e fornecer a proteína em uma terceira solução de proteína a uma terceira concentração, em que as primeira, segunda, e terceira soluções de proteína estão em uma temperatura na qual as primeira, segunda, e terceira soluções não exibem separação de fase líquida-líquida. Os métodos também compreendem esfriar as primeira, segunda, e terceira soluções na temperatura de ponto de nuvem das primeira, segunda, e terceira soluções, e construir uma curva de separação de fase para representar em gráfico as temperaturas de ponto de nuvem das primeira, segunda, e terceira soluções de proteína contra as primeira, segunda, e terceira concentrações. Uma concentração que está fora da curva de separação de fase na temperatura desejada é determinada para ser a concentração na qual para reformular a proteína na solução de proteína a fim de reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida na solução de proteína na temperatura desejada.

Em outro aspecto da invenção, os métodos para formular uma proteína em uma solução de proteína em que a solução de proteína não exibe separação de fase líquida-líquida em uma temperatura desejada incluem formular a proteína na solução de proteína a uma concentração que está fora de uma curva de separação de fase para a solução de proteína na temperatura desejada.

Em ainda outro aspecto da invenção, os métodos para reformular uma proteína em uma solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida em uma temperatura desejada em que a solução de proteína reformulada não exibe separação de fase líquida-líquida na temperatura desejada incluem submeter a solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida sofrer separação de fase líquida-líquida em uma fase superior e uma líquida inferior. A concentração das fases superior e inferior da solução de proteína é depois medida. A proteína é reformulada em uma solução em uma concentração que é mais alta que a concentração da fase inferior da solução de proteína. Isto reduz ou impede a separação de fase líquida-

líquida na solução de proteína reformulada na temperatura desejada.

Em ainda um outro aspecto da invenção, os métodos para formular uma proteína em uma solução de proteína de forma que a solução de proteína não exibe separação de fase líquida-líquida a uma concentração desejada incluem armazenar a solução de proteína em uma temperatura que é acima da temperatura na qual separação de fase líquida-líquida ocorre e que está fora de uma curva de separação de fase para a solução de proteína.

Em outro aspecto da invenção, os métodos para obter uma solução de proteína que não exibe separação de fase líquida-líquida em uma temperatura desejada de uma solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida na temperatura desejada incluem permitir a solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida sofrer separação em fases superior e inferior na temperatura desejada. A fase inferior da solução de proteína é removida. Esta fase inferior é uma solução de proteína que não exibe separação de fase líquida-líquida na temperatura desejada.

A invenção também fornece métodos para obter uma solução de proteína de concentração mais alta de uma solução de proteína de concentração mais baixa que exibe separação de fase líquida-líquida. Os métodos em geral compreendem permitir a solução de proteína original separar em fases superior e inferior, e separar a fase inferior da fase superior. A fase inferior é uma solução de proteína tendo uma concentração mais alta da proteína que a solução de proteína de concentração mais baixa.

Em outro aspecto da invenção, um método para concentrar uma proteína em uma solução desejada inclui formular a proteína em qualquer solução, em que a solução de proteína exibe separação de fase líquida-líquida. Separação de fase líquida-líquida é facilitada na solução de proteína, assim formando uma fase superior e inferior na solução de proteína. A fase inferior é separada da fase superior. Esta fase inferior tem uma concentração mais alta da proteína que a solução de proteína original. Uma troca de tampão é depois conduzida para transferir a proteína da solução de proteína e para dentro da solução desejada.

"Proteína" como aqui usado inclui proteínas, peptídeos, fragmentos de proteína, proteínas conjugadas, e polipeptídeos contendo aminoácidos de ocorrência não-natural. Uma proteína de acordo com a invenção pode ser um receptor, um ligante, um fator de transcrição, uma enzima, um fator de coagulação, uma proteína de sinalização, e um anticorpo. Proteínas podem também ser um anticorpo policlonal ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo, ou um anticorpo monoclonal ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo.

A temperatura desejada para uma solução de proteína pode ser a temperatura na qual a solução de proteína é para ser processada, fabricada, armazenada, ou administrada. Além disso, separação de fase líquida-líquida pode ser alcançada mediante separação por gravidade ou centrifugação.

A menos que do contrário definido, todos termos técnicos e científicos aqui usados têm o mesmo significado que comumente entendido por alguém versado na técnica ao qual esta invenção pertence. Embora métodos e materiais similares ou equivalentes aos descritos aqui possam ser usados na prática ou testagem da presente invenção, métodos e materiais adequados são descritos abaixo. Todas as publicações, pedidos de patente, patentes, e outras referências mencionadas aqui são incorporados por referência em sua totalidade. Além disso, os materiais, métodos, e exemplos são ilustrativos apenas e não intencionados ser limitativos.

Outras características e vantagens da invenção serão evidentes dos desenhos, descrição detalhada, e das reivindicações.

BREVE DESCRIÇÃO DOS DESENHOS

Figura 1 é um gráfico que descreve a relação inversa entre a solubilidade relativa de uma proteína quando medida por precipitação de PEG e a opalescência quando medida por absorvância a 500 nm. Todas as proteínas neste experimento foram formuladas a 90 mg/ml em 10 mM de Histidina em pH 6,0.

Figura 2 é uma ilustração do fenômeno de separação de fase líquida-líquida usando o anticorpo de anti-A1 (70 mg/ml em 10 mM Tris pH

8,0 a 5°C) e anticorpo monoclonal de anti-B1 (50 mg/ml em 20 mM tampão de succinato pH 6,0 a 5°C). Separação de fase líquida-líquida é observada nos tubos na esquerda.

Figura 3 é uma representação esquemática do procedimento experimental envolvido no método de extinção de temperatura para construir um diagrama de fase para anticorpo de anti-A1 formulado a 70 mg/ml em 10 mM Tris pH 8.

Figura 4 é um diagrama de fase para anticorpo de anti-A1 formulado a 70 mg/ml em 10 mM Tris pH 8 que foi construído usando o método de extinção de temperatura. A região que é considerada "além ou fora do" diagrama de fase encontra-se sombreada com linhas oblíquas. A região considerada estar "dentro ou sob" o diagrama de fase encontra-se preenchida.

Figura 5 é um diagrama de fase para anticorpo de anti-A1 que foi construído usando o método de ponto de nuvem. A região que é considerada "além ou fora do" diagrama de fase encontra-se sombreada com linhas oblíquas. A região considerada está "dentro ou sob" o diagrama de fase encontra-se preenchida.

Figura 6 fornece uma correlação de um diagrama de fase com a aparência de quatro formulações de anticorpo de anti-A1 formuladas em concentrações diferentes em 10 mM Tris pH 8 em uma temperatura fixa de 10°C. As concentrações de limite de fase inferior e superior a 10°C estão indicadas no diagrama por asteriscos. Esta figura mostra que as formulações de proteína formulada usando concentrações "fora ou além do" diagrama de fase são claras, enquanto que as formulações tendo concentrações que caem "dentro ou no" diagrama de fase são opalescentes.

Figura 7 fornece uma comparação da concentração de excipientes nas fases superior e inferior de uma formulação de anticorpo de anti-A1 formulada a 59 mg/ml em 10 mM Tris pH 8,0 que sofreu separação de fase líquida-líquida. A amostra "pós-diálise" corresponde à formulação de proteína antes da separação de fase líquida-líquida.

Figura 8 fornece uma comparação do tamanho (SEC-HPLC) e carga (CEX-HPLC) das proteínas na fase superior e inferior de uma formula-

ção de anticorpo de anti-A1 formulada a 59 mg/ml em 10 mM Tris pH 8,0 que sofreu separação de fase líquida-líquida.

Figura 9 fornece uma comparação da estrutura secundária de anti-A1 nas fases superior e inferior de uma formulação de anticorpo de anti-A1 formulada a 59 mg/ml em 10 mM Tris pH 8,0 que sofreu separação de fase líquida-líquida, usando espectro de amida I de FTIR.

Figura 10 fornece uma comparação da estrutura terciária das proteínas nas fases superior e inferior de uma formulação de anticorpo de anti-A1 formulada a 59 mg/ml em 10 mM Tris pH 8,0 que sofreu separação de fase líquida-líquida, usando fluorescência com uma cubeta de ângulo de 45°.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

Há uma demanda crescente para alcançar concentrações de proteína altas para terapêuticas com base em proteína. Porém, por causa do fenômeno de separação de fase líquida-líquida em certas soluções de proteína formuladas em concentrações de proteína altas, opalescência (isto é, nebulosidade da solução de proteína) é um problema principal para os formuladores de proteína. Métodos descritos aqui fornecem processos novos para formular proteínas em concentrações altas reduzindo ou impedindo a separação de fase líquida-líquida em uma temperatura desejada. Desse modo, estes métodos rendem soluções de proteína tendo opalescência reduzida. Os métodos descritos aqui usam separação de fase líquida-líquida e/ou diagramas de fase para determinar as concentrações que são adequadas para formular uma proteína em um tampão/solução de interesse, para o uso em uma temperatura desejada de modo que as soluções de concentração de proteína altas resultantes tenham separação de fase líquida-líquida reduzida e sejam visivelmente claras. Os métodos descritos aqui também utilizam separação de fase líquida-líquida e curvas de separação de fase para determinar as temperaturas que são adequadas para formular uma proteína em um tampão/solução de interesse, para uso em uma concentração fixa de modo que as soluções de proteína resultantes tenham separação de fase líquida-líquida reduzida e sejam visivelmente claras. Além disso, a invenção

fornece métodos para concentrar soluções de proteína, e purificar proteínas.

RELAÇÃO ENTRE SOLUBILIDADE E OPALESCÊNCIA

A solubilidade de uma proteína, em uma solução de proteína, está relacionada à opalescência da solução de proteína. Por "opalescência" é significado uma nebulosidade ou turvação detectável de uma solução de proteína. Foi descoberto pelos inventores que uma relação inversa existe entre solubilidade e opalescência, especialmente em concentrações de proteína altas. Mais especificamente, solubilidade diminuída de uma proteína em uma solução de proteína correlata com opalescência aumentada da solução de proteína em concentrações altas da proteína na solução de proteína. Esta informação é útil para um formulador em determinar como formular uma proteína em concentração alta. Por "concentração alta" é significado uma concentração de proteína maior que cerca de 50 mg/ml (por exemplo, 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, 200 mg/ml, 300 mg/ml, 400 mg/ml, 500 mg/ml, e assim por diante). Como usado ao longo deste pedido de patente, o termo "cerca de" significa um valor numeral que é por volta de $\pm 20\%$ do valor citado. Se uma solução de proteína particular estiver turva, o formulador pode depois encontrar métodos alternativos para formular a proteína a fim de reduzir ou impedir a nebulosidade da solução de proteína. Por exemplo, a solubilidade de uma proteína de interesse em concentrações altas pode ser testada em vários tampões/soluções para determinar a solubilidade da proteína naquele tampão. Se a solubilidade for baixa em um tampão/solução particular, é provável que a solução de proteína será opalescente. Conseqüentemente, o formulador pode selecionar um tampão/solução diferente na qual a proteína em concentrações altas é mais solúvel, assim permitindo o formulador alcançar uma formulação de proteína clara.

Métodos de determinar a solubilidade de uma proteína em uma solução de proteína são bem conhecidos na técnica. Pedido de Patente Provisório U. S. N° 60/801.862, incorporado por referência aqui, descreve um método novo de prognosticar a solubilidade relativa de uma proteína usando precipitação de polietileno glicol.

Opalescência pode em geral ser determinada através de visuali-

zação simples por olho (isto é, se uma solução for turva ou turbida), difração de luz em ângulo reto, ou fluorescência. Em alguns casos, porém, a opalescência não é detectável ao olho humano. Nestes casos, e em casos onde uma leitura quantitativa for desejada, a opalescência pode ser determinada usando métodos mais sensíveis tais como espectrofotometria por exemplo, espectrofotometria automatizada usando um espectrofotômetro de luz visível (com medições na faixa de 400-600 nm, por exemplo, 500 nm), ou meios equivalentes para detectar absorvância de luz das amostras. Outros métodos para ensaiar opalescência incluem turbidimetria fotoelétrica (por exemplo, turbidimetria automatizada).

OPALESCÊNCIA E SEPARAÇÃO DE FASE LÍQUIDA-LÍQUIDA

Separação de fase líquida-líquida pode levar à opalescência de uma solução de proteína. Por "separação de fase líquida-líquida", também conhecida como separação de fase binário-líquida e co-acervação, é significado um fenômeno pelo qual uma solução de proteína separa-se em duas fases líquidas coexistentes de concentrações de proteína desiguais em uma temperatura menor que a temperatura crítica para a separação de fase. Separação de fase líquida-líquida é usualmente observada em soluções de proteína tendo uma concentração alta de proteína; tais soluções de proteína são opalescentes.

Vários fatores desempenham um papel na separação de fase líquida-líquida. Estes incluem, mas não são limitados a, a temperatura da solução de proteína, a concentração da(s) proteína(s) na solução de proteína, pH da solução ou tampão, a resistência iônica da solução ou tampão, e a autointeração da proteína e propriedades de solubilidade. Com respeito à temperatura, separação de fase líquida-líquida é observada quando a temperatura da solução está abaixo da temperatura crítica para separação de fase. Por "temperatura crítica para separação de fase" é significado a temperatura na qual uma solução de proteína tem o potencial para sofrer separação de fase líquida-líquida. Com respeito à concentração, as soluções de proteína de concentração alta também são mais prováveis de exibir separação de fase. Com respeito ao pH, se o pH de uma solução de proteína for-

mulada em uma concentração de proteína alta estiver perto do ponto isoelétrico da proteína (pI), a separação de fase líquida-líquida é provável de ocorrer na solução de proteína. Por fim, a resistência iônica aumentada em uma solução de proteína formulada em uma concentração de proteína alta favorece a separação de fase líquida-líquida.

5 Separação de fase líquida-líquida pode ser facilitada misturando uma solução de proteína de concentração alta e permitindo a solução de proteína repousar. Separação de gravidade leva à separação de uma fase líquida superior e uma fase líquida inferior separada por um menisco estreito. Além da separação por gravidade, um método alternativo para facilitar a separação das duas fases é centrifugação (por exemplo, em 4.000 Xg). Velocidade de sedimentação é maior em temperatura mais baixa devido a uma diferença maior na densidade para a mesma solução de proteína, entre as duas fases. A fase inferior pode ser separada da fase superior por quaisquer meios conhecidos ao artesão normalmente versado, por exemplo, usando uma pipeta de Pasteur.

10

15

 A fase superior e a fase inferior de uma solução de proteína que sofreu separação de fase líquida-líquida têm concentrações de proteína diferentes. A fase inferior tem uma concentração de proteína mais alta que a fase superior. A concentração de proteína na fase superior e inferior pode ser determinada por qualquer método conhecido na técnica, incluindo, mas não limitado a, medição da absorvância de UV intrínseca da proteína (a 280 nm), ensaio de Lowry, ensaio de cobre/bicinconínico de Smith, e ensaio de tintura de Bradford.

20

25 Para determinar se uma proteína desconhecida quando formulada em uma concentração alta específica em um tampão/solução de escolha em uma temperatura desejada sofrerá separação de fase líquida-líquida, a proteína é formulada na concentração específica no tampão/solução desejada, misturada e incubada na temperatura desejada. Se a solução de proteína na misturada estiver turva, é uma primeira indicação que separação de fase líquida-líquida é provável de ocorrer. Claro que, separação por gravidade ou centrifugação serão facilmente evidentes se a solução de proteína separar

30

em fases líquidas superior e inferior.

CONSTRUÇÃO DE UM DIAGRAMA DE FASE

Se uma solução de proteína sofrer separação de fase líquida-líquida em um tampão/solução desejada em uma temperatura desejada, é necessário encontrar métodos para evitar este fenômeno. Isto é especialmente importante para formulações farmacêuticas visto que a separação de fase líquida-líquida cria soluções não-homogêneas que são também turvas na aparência. Os métodos descritos aqui fornecem uma solução para este problema. Em algumas modalidades, estes métodos relacionam ao uso de um diagrama de fase.

No contexto do pedido de patente imediato, um diagrama de fase, também conhecido como uma curva de separação de fase ou uma curva de coexistência, é um mapa que indica o comportamento da fase (isto é, se uma solução de proteína existe em uma fase ou duas fases) como uma função da concentração de uma proteína em uma solução de proteína, e a temperatura da solução de proteína. O diagrama de fase especifica as duas concentrações das fases líquidas que coexistem em equilíbrio em uma temperatura dada. Diagramas de fase são usualmente alcançados por um dos dois métodos: (i) o método de extinção de temperatura, ou (ii) o método de temperatura de ponto de nuvem.

MÉTODO DE EXTINÇÃO DE TEMPERATURA

Em um exemplo não-limitativo deste método para construir um diagrama de fase, várias amostras de uma solução de proteína contendo a mesma concentração alta de uma proteína (por exemplo, cerca de 50-100 mg/ml) são esfriadas de uma temperatura na qual a solução de proteína não exibe separação de fase líquida-líquida para diminuir as temperaturas. A temperatura na qual a solução de proteína não exibe separação de fase líquida-líquida pode ser determinada empiricamente. Usualmente, quanto mais alta a temperatura, menor a chance de uma solução de proteína exibir separação de fase líquida-líquida. Tipicamente, pode-se iniciar em temperatura ambiente, e se separação de fase for observada para a solução de proteína de interesse naquela temperatura, pode-se mover para temperaturas

mais altas. Uma vez a temperatura na qual separação de fase não é observada ocorrer é identificada, todas as soluções de proteína são trazidas para aquela temperatura de suas temperaturas existentes. Estas amostras são depois esfriada para várias temperaturas inferiores diferentes nas quais se-
5 separação de fase líquida-líquida ocorre. As amostras podem ser incubadas em uma câmara de temperatura controlada durante cerca de 30 minutos e depois visualmente verificadas se a solução está turva ou clara. As amostras turvas são depois deixadas equilibrar em fases superior e inferior mediante separação por gravidade ou centrifugação. As alíquotas das amostras das
10 fases superior e inferior de cada solução de proteína são tiradas e a concentração de proteína nestas amostras são medidas. Um diagrama de fase é construído para representar em gráfico a concentração das fases superior e inferior de cada uma das soluções de proteína na temperatura particular das soluções de proteína nas quais a solução exibe separação de fase líquida-
15 líquida. Tipicamente, a temperatura é representada em gráfico no eixo geométrico y e a concentração de proteína no eixo geométrico x. Uma ilustração não-limitativa deste método para construir um diagrama de fase é fornecida no Exemplo 3.

MÉTODO DE PONTO DE NUVEM

20 Em um exemplo não-limitativo deste método, uma ou mais soluções de proteína de concentração de proteína conhecida e em uma temperatura na qual as soluções de proteína não são opalescentes são colocadas em um espectrofotômetro de difração de luz e a temperatura é depois lentamente diminuída. A temperatura na qual a solução de proteína não é mais
25 opalescente pode ser determinada empiricamente. Por exemplo, pode-se iniciar em temperatura ambiente e pode mover para temperaturas mais altas, conforme necessário, até que se obtenha uma solução que não seja turva em uma concentração dado. A intensidade de difração de luz para as soluções de proteína é monitorada em cada temperatura. O princípio de separação
30 de fase nas soluções de proteína é detectado pelo desaparecimento do feixe transmitido devido à múltipla difração extensiva do feixe incidente. Isto corresponde à solução que se fica turva. A temperatura na qual separação

de fase começa, e desse modo opalescência começa é a temperatura de ponto de nuvem, T_{nuvem} . A T_{nuvem} de cada solução de proteína é depois representada em gráfico contra a concentração daquela solução de proteína para obter um diagrama de fase com base em temperatura de ponto de nuvem. Tipicamente, a temperatura é representada em gráfico no eixo geométrico y e a concentração no eixo geométrico x. Uma ilustração não-limitativa deste método é fornecida no Exemplo 4.

INTERPRETANDO UM DIAGRAMA DE FASE

O diagrama de fase para separação de fase líquida-líquida de uma solução de proteína de concentração alta se assemelha a uma parábola invertida. O membro ascendente e o membro descendente da curva vêm juntos no ponto mais superior na curva definindo a temperatura crítica (T_c). A temperatura crítica representa a temperatura na qual separação de fase pode começar a ocorrer desde que a concentração da proteína em uma solução de proteína esteja na faixa apropriada. Na região fora da curva de separação de fase (isto é, fora da parábola invertida) a solução de proteína é homogênea e em uma fase simples. Na região sob a curva, ocorre separação de fase líquida-líquida, e sedimentação da fase de densidade alta leva à separação macroscópica em duas camadas transparentes com concentração de proteína alta na fase líquida do fundo e baixa concentração de proteína na fase líquida superior.

MÉTODOS PARA DETERMINAR UMA CONCENTRAÇÃO PARA FORMULAR UMA SOLUÇÃO DE PROTEÍNA TENDO OPALESCÊNCIA REDUZIDA

O pedido de patente refere-se em parte aos métodos para determinar uma concentração na qual para reformular uma proteína em um tampão/solução em que a solução de proteína resultante não apresenta, ou exhibe, separação de fase líquida-líquida reduzida em uma(s) temperatura(s) desejada(s). O pedido de patente também refere-se em parte aos métodos para determinar uma concentração na qual para formular uma proteína em um tampão/solução de forma que a solução de proteína é substancialmente clara (isto é, opalescência reduzida) em uma(s) temperatura(s) desejada(s). Estes métodos são úteis em determinar uma concentração nova na qual pa-

ra reformular uma proteína em um tampão/solução, quando a solução de proteína originalmente formulada exibir separação de fase líquida-líquida em uma(s) temperatura(s) desejada(s).

Em geral, estes métodos envolvem determinar uma concentração de uma proteína para formulação em uma tampão/solução, é para ser
5 uma concentração que esteja fora do diagrama de fase para a solução de proteína em uma(s) temperatura(s) desejada(s). Se a solução de proteína for formulada usando uma concentração de proteína que esteja fora e à esquerda (solução de proteína de concentração mais baixa), ou fora e à direita
10 da curva (solução de proteína de concentração mais alta) em uma temperatura desejada, a solução de proteína não exibirá separação de fase líquida-líquida ou opalescência naquelas concentrações na temperatura desejada. Por "temperatura desejada" é significado a temperatura na qual a proteína será usada, manuseada ou armazenada. Exemplos não-limitativos de uma
15 temperatura desejada incluem a temperatura na qual uma solução de proteína é ser fabricada, processada, armazenada, ou administrada a um sujeito.

Tipicamente quando formuladores formularem soluções de proteína de concentração de proteína crescente, eles não tentam aumentar a concentração de uma solução de proteína além de uma concentração na
20 qual opalescência ou separação de fase líquida-líquida começa. Aqui, os inventores descobriram de modo surpreendente e inesperadamente que contanto que a concentração de proteína seja aumentada além ou fora do diagrama de fase em uma temperatura desejada, a nebulosidade ou separação de fase líquida-líquida pode ser reduzida ou até mesmo desaparecida.
25 Esta é uma descoberta extremamente importante para formuladores que tentam formular formulações de proteína de concentração alta (por exemplo, anticorpo monoclonal) para uso em terapia.

Porém, não é necessário que um diagrama de fase seja preparado para a solução de proteína praticar os métodos descritos aqui, se for
30 conhecido a priori que uma solução de proteína é necessária em uma temperatura desejada. Este método pode ser usado, por exemplo, quando um formulador formula uma proteína em um tampão/solução em uma certa con-

centração e descobre que a solução formulada sofre separação de fase líquida-líquida, ou fica opalescente, na temperatura desejada. Nesta circunstância, o formulador pode determinar as concentrações da fase inferior e/ou superior da solução de proteína que sofreu separação de fase líquida-líquida. Para obter uma solução de proteína de concentração alta que não 5
exibe separação de fase na temperatura desejada, pode-se selecionar uma concentração que seja maior que a concentração da fase inferior (isto é, a fase tendo a concentração de proteína mais alta). Para obter uma solução de proteína de concentração baixa que não exiba separação de fase líquida-líquida na temperatura desejada, pode-se selecionar uma concentração que 10
seja inferior que a concentração da fase superior. Se estiver apenas interessado em formular uma solução de proteína de concentração alta, é suficiente que a concentração da camada inferior da solução de proteína que sofreu separação de fase líquida-líquida seja medida. Se a proteína for formulada a 15
uma concentração mais alta que a concentração da camada inferior para o uso na temperatura na qual a separação de fase ocorreu, a formulação de proteína resultante exibe separação de fase líquida-líquida reduzida ou nenhuma e ficará substancialmente clara na temperatura desejada. Em certas modalidades, a concentração de proteína é selecionada para ser cerca de 20
0,5% a cerca de 5%, cerca de 5% a cerca de 10%, cerca de 10% a cerca de 20%, cerca de 20% a cerca de 30%, cerca de 30% a cerca de 40%, cerca de 5% a cerca de 20%, cerca de 5% a cerca de 30%, ou cerca de 5% a cerca de 40% mais alta que a concentração da proteína na fase inferior.

Em outro aspecto, os métodos referem-se em determinar uma 25
concentração na qual para reformular uma proteína em uma solução de proteína construindo um diagrama de fase. O diagrama de fase pode ser preparado por qualquer método incluindo, mas não limitado a, a método de extinção de temperatura e o método de ponto de nuvem.

Se o método de extinção de temperatura for usado para a construção de um diagrama de fase, pelo menos duas soluções de proteína tendo a mesma concentração de proteína e que sofrem separação de fase em 30
duas temperaturas diferentes são usadas. Em algumas modalidades, pelo

menos três soluções de proteína tendo a mesma concentração de proteína e que sofrem separação de fase em três temperaturas diferentes são usadas. Em outras modalidades, pelo menos quatro soluções de proteína tendo a mesma concentração de proteína e que sofrem separação de fase em quatro temperaturas diferentes são usadas. Em ainda outras modalidades, pelo menos cinco soluções de proteína tendo a mesma concentração de proteína e que sofrem separação de fase em cinco temperaturas diferentes são usadas. Qualquer variação do método de extinção de temperatura descrito acima pode ser usada para a construção do diagrama de fase para as soluções de proteína.

Se o método de ponto de nuvem for usado para a construção de um diagrama de fase, pelo menos duas soluções de proteína tendo concentrações de proteína diferentes da mesma proteína são usadas. Em algumas modalidades, pelo menos três soluções de proteína tendo concentrações de proteína diferentes da mesma proteína são usadas. Em outras modalidades, pelo menos quatro soluções de proteína tendo concentrações de proteína diferentes da mesma proteína são usadas. Em ainda outras modalidades, pelo menos cinco soluções de proteína tendo concentrações de proteína diferentes da mesma proteína são usadas.

Independente do método usado, o diagrama de fase permitirá para o formulador selecionar uma concentração de proteína na qual uma solução de proteína terá uma probabilidade reduzida de exibir separação de fase líquida-líquida em uma temperatura desejada ou faixa de temperaturas. Especificamente, o formulador olhará a temperatura ou faixa de temperaturas na qual a formulação é para ser usada, armazenada, processada, e/ou fabricada e com base naquela temperatura seleciona uma concentração que esteja fora do diagrama de fase para aquela temperatura. Em certas modalidades, a concentração de proteína é selecionada para ser cerca de 0,5% a cerca de 5%, cerca de 5% a cerca de 10%, cerca de 10% a cerca de 20%, cerca de 20% a cerca de 30%, cerca de 30% a cerca de 40%, cerca de 5% a cerca de 20%, cerca de 5% a cerca de 30%, ou cerca de 5% a cerca de 40% mais alta que a concentração mais alta da proteína na curva de separação

de fase que corresponde à temperatura desejada (isto é, a concentração de limite de fase superior). Selecionando uma concentração que está fora do diagrama de fase para várias temperaturas diferentes de interesse para uma solução de proteína dada, pode-se formular uma proteína em um tampão/solução que não exibe separação de fase líquida-líquida para aquela faixa de temperaturas. Isto é particularmente útil onde uma solução de proteína dada necessita ser armazenada, usada, processada, ou fabricada em temperaturas diferentes.

MÉTODOS DE FORMULAR SOLUÇÕES DE PROTEÍNA TENDO OPALESCÊNCIA REDUZIDA

Os métodos descritos aqui são úteis para formular proteínas em concentrações altas em que a solução de proteína resultante exibe opalescência reduzida ou nenhuma. Em uma modalidade específica, os métodos são úteis em circunstâncias onde uma proteína deve ser formulada em um tampão/solução específica e em que a proteína exibe separação de fase líquida-líquida naquele tampão/solução em uma concentração específica e na temperatura desejada. Em outra modalidade específica, os métodos do pedido de patente presente são úteis onde é necessário reformular uma proteína de um tampão/solução para outro tampão/solução, e em que a proteína quando formulada no tampão/solução nova exibe separação de fase líquida-líquida. Em tais casos, usando as concentrações identificadas de um diagrama de fase para as soluções de proteína que mostram separação de fase líquida-líquida, pode-se formular uma proteína em um tampão/solução de modo que a solução de proteína não exiba separação de fase líquida-líquida em uma temperatura desejada.

Para formular proteínas em tampões/soluções em concentrações altas para o uso em uma temperatura fixa, é suficiente que a concentração de proteína esteja fora ou além da curva de separação de fase para aquela solução de proteína na temperatura desejada. As proteínas podem ser formuladas em qualquer concentração mais alta que a concentração mais alta na curva para a temperatura desejada. Em geral, as proteínas são formuladas a uma concentração que é entre cerca de 0,5% a cerca de 5%,

cerca de 5% a cerca de 10%, cerca de 10% a cerca de 20%, cerca de 20% a
cerca de 30%, cerca de 30% a cerca de 40%, cerca de 5% a cerca de 20%,
cerca de 5% a cerca de 30%, ou cerca de 5% a cerca de 40% mais alta que
5 a concentração mais alta da proteína na curva de separação de fase corres-
pondente na temperatura desejada (isto é, a concentração de limite de fase
superior).

Se a solução de proteína começa a ficar viscosa ou mostra si-
gnais de agregação, à medida que a concentração da proteína em uma for-
mulação de proteína aumenta, qualquer método para reduzir viscosidade
10 e/ou reduzir agregação pode ser empregado para reduzir a viscosidade e/ou
agregação da solução de proteína (por exemplo, Pedidos de Patente Provi-
sórios U. S. Nos. 60/752.660 e 60/784.130, ambos destes são incorporados
por referência aqui). Em algumas modalidades, para reduzir a viscosidade
de uma solução de proteína de concentração alta, pode-se adicionar entre
15 cerca de 0,5 mM a 25 mM de cloreto de cálcio ou cloreto de magnésio (por
exemplo, cerca de 0,5 mM a cerca de 5 mM, cerca de 2 mM a cerca de 10
mM, cerca de 5 mM a cerca de 10 mM, cerca de 10 mM a cerca de 15 mM,
cerca de 15 mM a cerca de 20 mM, cerca de 13 mM a cerca de 25 mM) para
a formulação de proteína. Em outras modalidades, para reduzir agregação
20 de uma solução de proteína de concentração alta, pode-se adicionar entre
cerca de 1 mM a cerca de 145 mM de metionina (por exemplo, cerca de 1
mM a cerca de 5 mM, cerca de 5 mM a cerca de 10 mM, cerca de 10 mM a
cerca de 20 mM, cerca de 20 mM a cerca de 50 mM, cerca de 50 mM a cer-
ca de 100 mM, cerca de 100 mM a cerca de 140 mM). Em modalidades adi-
25 cionais, de cloreto de cálcio/cloreto de magnésio e metionina podem ser adi-
cionados nas faixas definidas acima a uma formulação de proteína de con-
centração alta.

Para reformulação de uma proteína em uma concentração fixa
em uma solução de proteína, a fim de reduzir ou impedir separação de fase
30 líquida-líquida na solução de proteína, pode-se usar um diagrama de fase
novamente. Neste caso, aumentaria a temperatura para ficar acima da tem-
peratura mais alta no diagrama de fase que corresponde à concentração

desejada. Em certas modalidades, a temperatura é aumentada em cerca de 1°C, cerca de 2°C, cerca de 3°C, cerca de 4°C, cerca de 5°C, cerca de 6°C, cerca de 7°C, cerca de 8°C, cerca de 9°C, cerca de 10°C, entre cerca de 0,5°C a cerca de 5°C, entre cerca de 0,5°C a cerca de 10°C, ou entre cerca de 5°C a cerca de 10°C, acima da temperatura mais alta no diagrama de fase que corresponde à concentração desejada.

A invenção também refere-se a métodos de obter uma solução de proteína que não apresente ou mostre separação de fase líquida-líquida reduzida de uma solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida. Método em geral envolve facilitar a separação de fase líquida-líquida da solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida e separar a fase inferior da solução de proteína. Separação de fase líquida-líquida pode ser facilitada, por exemplo, mediante separação por gravidade ou centrifugação. A fase inferior pode ser separada da fase superior por qualquer método conhecido na técnica, incluindo usando uma pipeta de Pasteur. A fase inferior da solução de proteína é uma solução de proteína que não apresenta ou mostra separação de fase líquida-líquida reduzida comparada à solução de proteína original.

MÉTODOS DE CONCENTRAR PROTEÍNAS

O pedido de patente também refere-se aos métodos de concentrar proteínas. Em uma modalidade, um método de obter uma solução de proteína de concentração mais alta de uma solução de proteína de concentração mais baixa que exibe separação de fase líquida-líquida é fornecido. O método envolve facilitar a separação de fase líquida-líquida da solução de proteína original e separar a fase inferior da fase superior. A fase inferior é uma solução de proteína tendo uma concentração mais alta da proteína que a solução de proteína de concentração mais baixa original.

Este método pode ser adaptado para concentrar uma proteína de uma solução de proteína de concentração mais baixa em um tampão/solução completamente novo. O método compreende as etapas esboçadas acima, mas também inclui uma etapa de troca de tampão para transferir a proteína para o tampão/solução novo. Os métodos de conduzir troca

de tampão podem ser executados usando qualquer método conhecido na técnica, incluindo, mas não limitado a, métodos com base em membrana tais como diálise, ultrafiltração, e diafiltração.

Se, sob concentração, a solução de proteína começar a ficar viscosa ou mostra sinais de agregação, quaisquer métodos para reduzir a viscosidade e/ou reduzir a agregação podem ser empregados para reduzir a viscosidade e/ou agregação da solução de proteína (por exemplo, Pedido de Patente Provisório U. S. Nos. 60/752.660 e 60/784.130). Em algumas modalidades, para reduzir a viscosidade de uma solução de proteína de concentração alta, pode-se adicionar entre cerca de 0,5 mM a 25 mM de cloreto de cálcio ou cloreto de magnésio (por exemplo, cerca de 0,5 mM a cerca de 5mM, cerca de 2 mM a cerca de 10 mM, cerca de 5 mM a cerca de 10 mM, cerca de 10 mM a cerca de 15 mM, cerca de 15 mM a cerca de 20 mM, cerca de 13 mM a cerca de 25 mM) para a formulação de proteína. Em outras modalidades, para reduzir a agregação de uma solução de proteína de concentração alta, pode-se adicionar entre cerca de 1 mM a cerca de 145 mM de metionina (por exemplo, cerca de 1 mM a cerca de 5 mM, cerca de 5 mM a cerca de 10 mM, cerca de 10 mM a cerca de 20 mM, cerca de 20 mM a cerca de 50 mM, cerca de 50 mM a cerca de 100 mM, cerca de 100 mM a cerca de 140 mM). Em modalidades adicionais, cloreto de cálcio/cloreto de magnésio e metionina podem ser adicionados nas faixas definidas acima a uma formulação de proteína de concentração alta. Métodos de medir viscosidade e agregação são bem conhecidos a alguém de habilidade na técnica.

MÉTODOS DE PURIFICAR PROTEÍNAS

25 Separação de fase líquida-líquida pode também ser utilizada para purificar uma proteína desejada de uma mistura de outras proteínas. Tal purificação é com base na escolha cuidadosa das condições de separação de fase com base na proteína de interesse. Se a condição de separação de fase escolhida (por exemplo, pH, resistência iônica) for única para a proteína de interesse, mas não o resto da mistura de proteína da qual a proteína é para ser purificada, então apenas a proteína de interesse separará a fase sob as condições de separação de fase escolhidas, e a camada do fun-

do rica em proteína pode ser colhida como uma solução de proteína pura.

5 Separação de fase líquida-líquida é particularmente útil para purificar anticorpos ou fragmentos de ligação de antígeno dos mesmos. Isto é porque ao contrário da maioria das proteínas tendo um ponto isoelétrico (pI) de menos que 7 (frequentemente muito inferior que 7), a maioria dos anticorpos tem um pI de entre cerca de 8 e 9. Por causa destes pIs altos, os anticorpos podem ser separados em fase de outras proteínas usando um tampão tendo um pH que esteja perto de seu pI. Desse modo, os anticorpos serão encontrados em concentrações altas na camada inferior enquanto as proteínas restantes estarão na camada superior. Por exemplo, no processo de purificar anticorpo de anti-A1, a solução de proteína contendo anti-A1 e outras proteínas dos restos das células e meios de cultura pode ter o tampão trocado para um tampão de pH 8,0, que é a condição de separação de fase ótima para o anticorpo de anti-A1. Sob estas condições, anti-A1 se depositará em duas fases e a camada de concentração alta do fundo pode ser colhida como anticorpo de anti-A1 purificado.

10

15

Claro que, que os procedimentos acima para purificação podem também ser usados para proteínas, diferente dos anticorpos, que têm pontos isoelétricos altos.

20 Se uma condição de tampão puder causar mais que uma proteína a sofrer separação de fase em um tampão tendo um pH de cerca de 8-10, então é possível purificar duas ou mais proteínas simultaneamente de uma mistura de outras proteínas. Até mesmo se apenas uma proteína simples for desejada, este procedimento fornecerá uma proteína que é purificada mais que a mistura de proteína original. Como observado acima, separação de fase líquida-líquida pode ser alcançada por gravidade ou pode ser facilitada através de centrifugação.

25

PROTEÍNAS

30 Os métodos descritos aqui são em geral úteis para qualquer proteína. "Proteína" como aqui usado inclui proteínas, peptídeos, fragmentos de proteína, proteínas conjugadas, e polipeptídeos contendo aminoácidos de ocorrência não-natural. As proteínas podem ser obtidas de qualquer fonte,

por exemplo, proteínas recombinantes segregadas, proteínas isoladas de fontes naturais, proteínas recombinantes não-segregadas, ou proteínas sintéticas. Em certas modalidades, as proteínas incluem, mas não são limitadas a, anticorpos, fragmentos de anticorpo de ligação de antígeno, moléculas de
5 ligação de ligante, receptores solúveis, ligantes, fatores de coagulação, proteínas de sinalização, e fatores de transcrição.

O termo "anticorpo", como aqui usado, inclui anticorpos policlonais, anticorpos monoclonais, composições de anticorpo com especificidades de polipeptídeo, anticorpos biespecíficos, diacorpos, ou outras prepara-
10 ções purificadas de anticorpos e anticorpos recombinantes. Os anticorpos podem ser anticorpos inteiros, por exemplo, de qualquer isótipo (IgG, IgA, IgE, IgM, etc.), ou fragmentos dos mesmos, que ligam à proteína de interesse. Anticorpos podem ser fragmentados usando técnicas convencionais e os fragmentos triados para ligar ao antígeno de interesse. Preferivelmente, um
15 fragmento de anticorpo compreende a região de ligação de antígeno e/ou variável de um anticorpo intacto. Desse modo, o termo fragmento de anticorpo inclui segmentos de porções proteoliticamente clivadas ou recombinantemente preparadas de uma molécula de anticorpo da qual é capaz de seletivamente ligar uma certa proteína. Exemplos não-limitativos de tais frag-
20 mentos proteolíticos e/ou recombinantes incluem Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, e anticorpos de cadeia simples (scFv) contendo um domínio V[L] e/ou V[H] unido por um ligador de peptídeo. O scFv pode ser covalente ou não-covalentemente ligado para formar anticorpos tendo dois ou mais sítios de ligação.

25 Em algumas modalidades o anticorpo é um anticorpo monoclonal humanizado. O termo "anticorpo monoclonal humanizado", como aqui usado, é um anticorpo monoclonal de uma fonte não-humana (recipiente) que foi alterado para conter pelo menos um ou mais dos resíduos de aminoácido encontrados no anticorpo monoclonal humano equivalente (doador).
30 Um "anticorpo monoclonal completamente humanizado" é um anticorpo monoclonal que foi alterado para conter todos os resíduos de aminoácido encontrados na região de ligação de antígeno do anticorpo monoclonal huma-

no equivalente. Anticorpos humanizados podem também compreender resíduos que não são encontrados ou no anticorpo recipiente ou no anticorpo doador. Estas modificações podem ser feitas também para refinar e otimizar a funcionalidade do anticorpo. O anticorpo humanizado pode também opcionalmente compreender pelo menos uma porção de uma região constante de imunoglobulina humana (Fc).

Em certas modalidades, a proteína a ser formulada, concentrada e/ou purificada não inclui lizozima, γ -cristalinas, β -lactoglobulina, taumatina, concanavalina A, e catalase.

Concentrações de proteína adequadas para o uso nos métodos descritos aqui incluem, mas não são limitados a, 5 mg/ml a cerca de 50 mg/ml, cerca de 50 mg/ml a cerca de 100 mg/ml, cerca de 100 mg/ml a cerca de 200 mg/ml, cerca de 200 mg/ml a cerca de 300 mg/ml, e cerca de 300 mg/ml a cerca de 500 mg/ml.

EXEMPLOS

A invenção é também ilustrada pelos exemplos a seguir. Os exemplos são providos para propósitos ilustrativos apenas. Eles não serão interpretados como limitando o escopo ou conteúdo da invenção de forma alguma.

EXEMPLO 1

DETERMINAÇÃO DA RELAÇÃO ENTRE SOLUBILIDADE E OPALESCÊNCIA

Para testar se uma relação existe entre solubilidade e opalescência, 11 anticorpos monoclonais diferentes formulados a 90 mg/ml em 10 mM Histidina pH 6,0 foram estudados. Estas soluções de anticorpo foram testadas para solubilidade e opalescência. Solubilidade foi avaliada através de precipitação de PEG como descrito no Pedido de Patente Provisório U. S. N° 60/801.862. Opalescência foi medida medindo a absorbância da solução de anticorpo a 500 nm. Os dados destes estudos que são mostrados na Figura 1 indicam que quanto mais baixa a solubilidade da proteína, maior a opalescência da solução de proteína.

Desse modo, há uma relação inversa entre solubilidade e opa-

lescência em concentrações de proteína altas.

EXEMPLO 2

SEPARAÇÃO DE FASE LÍQUIDA-LÍQUIDA

Anticorpo monoclonal de anti-A1 foi formulado em 70 mg/ml em
5 10 mM Tris pH 8,0 a 5°C. O pH desta solução de proteína está perto do pI do anticorpo. Quando a solução de proteína foi misturada ela pareceu turva; porém, quando foi deixada repousar, a separação de fase líquida-líquida ocorreu, resultando em uma fase superior e inferior (vide, Figura 2, painel superior).

10 Anticorpo monoclonal de anti-B1 foi formulado a 50 mg/ml em 20 mM succinato pH 6,0 a 5°C. Quando esta solução foi misturada, a solução ficou turva; porém, quando foi permitida repousar, separação de fase líquida-líquida ocorreu, resultando em uma fase superior e inferior (vide, Figura 2, painel de fundo).

15 Um fenômeno de separação de fase líquida-líquida similar foi observado quando um anticorpo de anti-C1 formulado a 90 mg/ml em 10 mM Tris pH 9.0 a 5°C foi misturado e deixado repousar (dados não mostrados).

Desse modo, separação de fase líquida-líquida é observada em
várias proteínas em concentração alta. As propriedades de pH, resistência
20 iônica e de solubilidade podem contribuir para a separação de fase observada. Como visto neste exemplo, soluções de proteína que exibem separação de fase líquida-líquida são opalescentes.

EXEMPLO 3

CONSTRUÇÃO DE UM DIAGRAMA DE FASE PARA UMA SOLUÇÃO DE 25 PROTEÍNA DE ANTI-A1 PELO MÉTODO DE EXTINÇÃO DE TEMPERATURA

Cinco amostras de anticorpo de anti-A1 monoclonal, cada uma
destas foi formulada a 70 mg/ml em 10 mM Tris pH 8,0, foram esfriadas de
temperatura ambiente para 16°C, 15°C, 10°C, 5°C, e 0°C, respectivamente,
30 e deixadas sofrer uma separação dirigida por gravidade macroscópica até que duas camadas líquidas claras fossem alcançadas através de sedimentação por gravidade. Alíquotas das camadas superior e inferior foram isola-

das de cada amostra, e a concentração de cada camada foi medida por espectroscopia UV-vis (280 nm). A concentração das camadas superior e inferior foi representada em gráfico contra a temperatura da solução de proteína para obter um diagrama de fase (vide, Figura 4).

5 Solução de proteína de anti-A1 sofreu uma separação de fase líquida-líquida quando esfriada para uma temperatura crítica neste tampão. Na região sob a curva, separação de fase líquida-líquida ocorre, e a sedimentação da fase de alta densidade leva à separação macroscópica em duas camadas transparentes, com fase de concentração de proteína alta ao
10 fundo e fase de concentração de proteína baixa no topo. As duas fases líquidas com concentrações de proteína diferentes coexistem em equilíbrio em uma temperatura dada.

EXEMPLO 4

15 CONSTRUÇÃO DE UM DIAGRAMA DE FASE PARA UMA SOLUÇÃO DE PROTEÍNA DE ANTI-A1 PELO MÉTODO DE PONTO DE NUVEM

Quatro amostras de anticorpo de anti-A1 formuladas a 200 mg/ml, 50 mg/ml, 30 mg/ml e 10 mg/ml em 10 mM Tris pH 8,0 foram preparadas. Estas quatro soluções foram colocadas em um espectrofotômetro de difração de luz a 30°C. Nesta temperatura, todas estas soluções ficaram
20 claras. Quando estas soluções foram lentamente esfriadas, a separação de fase começou em cada solução em uma temperatura particular (T_{nuvem}). Este fenômeno foi marcado pelo desaparecimento do feixe transmitido devido à múltipla difração extensiva do feixe incidente. Abaixo desta temperatura de T_{nuvem} , a solução ficou opaca. Para cada uma das soluções, a temperatura
25 de ponto de nuvem foi representada em gráfico contra a concentração da solução de proteína para alcançar um diagrama de fase para a solução de proteína.

É notável que tanto o método de extinção de temperatura (Exemplo 3) quanto o método de ponto de nuvem de construir diagramas de
30 fase parecem dar resultados substancialmente similares.

EXEMPLO 5

PROGNOSTICANDO OPALESCÊNCIA USANDO UM DIAGRAMA DE FASE

Para determinar se um diagrama de fase pode ser usado para determinar se uma solução de proteína dada é opalescente (isto é, turva) ou clara, quatro amostras de solução de proteína de anti-A1 diferentes foram preparadas em concentrações diferentes em 10 mM Tris pH 8,0 (isto é, a mesma proteína e tampão usados nos experimentos para criar o diagrama de fase) que caem em regiões diferentes do diagrama de fase (isto é, dentro ou fora da curva de separação de fase).

Como mostrado na Figura 5, o diagrama de fase correlata bem com a ocorrência de opalescência. A solução de proteína fica clara e permanece em uma fase simples fora da curva de separação de fase, mas volta a ficar turva e separa-se em duas camadas sob separação por gravidade sob a curva de separação de fase. O diagrama de fase demonstra que em uma temperatura fixa de 10°C, a solução de anti-A1 começa a ficar opaca à medida que a concentração alcança acima de 18 mg/ml, mas inesperadamente clareia à medida que a concentração continua aumentando acima de 180 mg/ml.

Portanto, para uma solução de proteína tendo uma tendência para opalescência devido à separação de fase líquida-líquida, uma solução clara em concentração de proteína alta a uma certa temperatura é alcançável contanto que a concentração esteja além da curva de separação de fase.

EXEMPLO 6

ANÁLISE DAS PROPRIEDADES DAS FASES SUPERIOR E INFERIOR DE UMA SEPARAÇÃO DE FASE LÍQUIDA-LÍQUIDA

Anti-A1 formulado a 59 mg/ml em 10 mM Tris pH 8,0 foi deixado sofrer separação de fase líquida-líquida, e as alíquotas das fases superior e inferior foram isoladas e usadas para analisar as propriedades a seguir: (i) componentes de tampão, (ii) espécies de peso molecular alto, (iii) espécies ácidas, (iv) estrutura secundária, e (v) a estrutura terciária das proteínas em ambas as fases.

Uma análise dos componentes de tampão indicou que a concentração de Tris e o íon de cloreto em ambas as fases foi substancialmente idêntica (vide. Figura 7).

Uma análise das espécies de peso molecular alto através de cromatografia líquida de desempenho alto-exclusão por tamanho não indicou nenhuma diferença significativa na fase superior e inferior (vide, Figura 8, painel superior).

5 Similarmente, uma análise das espécies acídicas através de cromatografia líquida de desempenho alto-troca de cátion em ambas as fases não mostrou nenhuma diferença significativa (vide, Figura 8, painel inferior).

10 A estrutura secundária de anti-A1 de ambas as fases como caracterizado por espectro de amida I de FTIR foi substancialmente similar (vide, Figura 9).

Por fim, a estrutura terciária de anti-A1 de ambas as fases como caracterizado por fluorescência usando uma cubeta de ângulo 45° também não mostrou nenhuma diferença significativa (vide. Figura 10).

15 Considerados juntos, estes dados sugerem que a fase superior e inferior de uma solução de proteína que sofre separação de fase líquida-líquida são substancialmente similares. Desse modo, as diferenças em estrutura secundária ou terciária da proteína, propriedades físicoquímicas ou conteúdo de excipiente não são a causa subjacente para separação de fase
20 líquida-líquida.

OUTRAS MODALIDADES

É para ser entendido que embora a invenção tenha sido descrita junto com a descrição detalhada da mesma, a descrição anterior é intencionalmente ilustrar e não limitar o escopo da invenção que é definido pelo escopo
25 das reivindicações em anexo. Outros aspectos, vantagens, e modificações estão dentro do escopo das reivindicações a seguir.

REIVINDICAÇÕES

1. Método para determinar uma concentração na qual para reformular uma proteína em uma solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida a fim de reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida da solução de proteína em uma temperatura desejada, compreendendo:

(a) permitir a solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida sofrer separação de fase líquida-líquida em uma fase líquida superior e inferior;

(b) medir a concentração da proteína na fase superior e inferior da solução de proteína que sofreu separação de fase líquida-líquida; e

(c) selecionar uma concentração de proteína que é maior que a concentração de proteína da fase inferior para reformular a proteína a fim de reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida na solução de proteína na temperatura desejada.

2. Método para determinar uma concentração de proteína na qual para reformular uma proteína em uma solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida a fim de reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida da solução de proteína em uma temperatura desejada, compreendendo:

(a) construir uma curva de separação de fase para a solução de proteína; e

(b) selecionar uma concentração que está fora da curva de separação de fase na temperatura desejada, em que uma concentração que está fora da curva de separação de fase na temperatura desejada é a concentração na qual para reformular a proteína na solução de proteína a fim de reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida na solução de proteína na temperatura desejada.

3. Método da reivindicação 2, em que a curva de separação de fase é construída pelo método de extinção de temperatura ou o método de ponto de nuvem.

4. Método da reivindicação 2, em que a construção da curva de

separação de fase para a solução de proteína compreende representar em gráfico a concentração das duas fases líquidas coexistentes em equilíbrio da solução de proteína em pelo menos duas ou mais temperaturas diferentes nas quais a solução de proteína exibe separação de fase líquida-líquida, em que pelo menos uma das duas ou mais temperaturas diferentes é a temperatura desejada.

5
10 5. Método para determinar uma concentração na qual para reformular uma proteína em uma solução de proteína a fim de reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida na solução de proteína em uma temperatura desejada, compreendendo:

(a) fornecer uma primeira solução de proteína tendo uma concentração de proteína e uma primeira temperatura na qual a primeira solução de proteína exibe separação de fase líquida-líquida;

15 (b) fornecer uma segunda solução de proteína na concentração da primeira solução de proteína e uma segunda temperatura na qual a segunda solução de proteína exibe separação de fase líquida-líquida;

(c) permitir as soluções de proteína de (a) e (b) sofrerem separação de fase líquida-líquida em uma fase superior e uma inferior;

20 (d) medir a concentração das proteínas na fase superior e inferior das primeira e segunda soluções de proteína;

(e) construir uma curva de separação de fase que especifica a concentração das fases superior e inferior em equilíbrio das primeira e segunda soluções de proteína nas primeira e segunda temperaturas; e

25 (f) determinar uma concentração que está fora da curva de separação de fase na temperatura desejada,

em que uma concentração que está fora da curva de separação de fase na temperatura desejada é a concentração na qual para reformular a proteína na solução de proteína a fim de reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida na solução de proteína na temperatura desejada.

30 6. Método da reivindicação 5, adicionalmente compreendendo:

(a) fornecer uma terceira solução de proteína na concentração da primeira solução de proteína e uma terceira temperatura na qual a se-

gunda solução de proteína exibe separação de fase líquida-líquida;

(b) permitir as primeira, segunda, e terceira soluções de proteína sofrerem separação de fase líquida-líquida em uma fase superior e uma inferior;

5 (c) medir a concentração das proteínas na fase superior e inferior das primeira, segunda, e terceira soluções de proteína;

(d) construir uma curva de separação de fase que especifica a concentração das fases superiores e inferiores em equilíbrio das primeira, segunda, e terceira soluções de proteína nas primeira, segunda, e terceira
10 temperaturas; e

(e) determinar uma concentração que está fora da curva de separação de fase na temperatura desejada, em que uma concentração que está fora da curva de separação de fase na temperatura desejada é a concentração na qual para reformular a proteína na solução de proteína a fim de
15 reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida na solução de proteína na temperatura desejada.

7. Método para determinar uma concentração na qual para reformular uma proteína em uma solução de proteína a fim de reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida na solução de proteína em uma temperatura desejada, compreendendo:
20

(a) fornecer a proteína em uma primeira solução de proteína em uma primeira concentração;

(b) fornecer a proteína em uma segunda solução de proteína em uma segunda concentração;

25 (c) fornecer a proteína em uma terceira solução de proteína em uma terceira concentração;

em que as primeira, segunda, e terceira soluções de proteína estão em uma temperatura em que as primeira, segunda, e terceira soluções ficam substancialmente claras;

30 (d) esfriar as primeira, segunda, e terceira soluções para temperatura de ponto de nuvem das primeira, segunda, e terceira soluções; e

(e) construir uma curva de separação de fase representando em

gráfico as temperaturas de ponto de nuvem das primeira, segunda, e terceira soluções de proteína contra as primeira, segunda, e terceira concentrações, em que uma concentração que está fora da curva de separação de fase na temperatura desejada é a concentração na qual para reformular a proteína na solução de proteína a fim de reduzir ou impedir separação de fase líquida-líquida na solução de proteína na temperatura desejada.

8. Método de qualquer uma das reivindicações 1-7, em que a proteína é selecionada do grupo que consiste em um receptor, um ligante, um fator de transcrição, uma enzima, e um anticorpo.

9. Método de qualquer uma das reivindicações 1-7, em que a proteína é um anticorpo policlonal ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo.

10. Método da reivindicação 9, em que a proteína é um anticorpo monoclonal ou um fragmento de ligação de antígeno do mesmo.

11. Método de qualquer uma das reivindicações 1-7, em que a temperatura desejada é a temperatura na qual a solução de proteína é para ser processada, fabricada, armazenada, ou administrada.

12. Método de qualquer uma das reivindicações 1-7, em que a concentração de proteína na qual para reformular a proteína na solução de proteína é selecionada para ser cerca de 5% a cerca de 40% mais alta que a concentração da proteína na fase inferior.

13. Método de qualquer uma das reivindicações 1-7, em que separação de fase líquida-líquida é alcançada mediante separação por gravidade ou centrifugação.

14. Método para formular uma proteína em uma solução de proteína de forma que a solução de proteína não exibe separação de fase líquida-líquida em uma temperatura desejada, compreendendo formular a proteína na solução de proteína em uma concentração que está fora de uma curva de separação de fase para a solução de proteína na temperatura desejada.

15. Método para formular uma proteína em uma solução de proteína de forma que a solução de proteína não exibe separação de fase líquida-líquida em uma concentração desejada, compreendendo armazenar a

solução de proteína em uma temperatura que está acima da temperatura na qual separação de fase líquida-líquida ocorre e que está fora de uma curva de separação de fase para a solução de proteína na concentração de proteína desejada.

5 16. Método para reformular uma proteína em uma solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida em uma temperatura desejada de forma que a solução de proteína reformulada não apresenta ou exibe separação de fase líquida-líquida reduzida na temperatura desejada, compreendendo:

10 (a) submeter a solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida a passar por separação de fase líquida-líquida em uma fase líquida superior e uma inferior;

 (b) medir a concentração da fase superior e da inferior da solução de proteína; e

15 (c) reformular a proteína em uma concentração que é mais alta que a concentração da fase inferior da solução de proteína.

 17. Método para obter uma solução de proteína que não apresenta ou exibe separação de fase líquida-líquida reduzida em uma temperatura desejada de uma solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida na temperatura desejada, compreendendo:

20 (a) permitir a solução de proteína que exibe separação de fase líquida-líquida sofrer separação em uma fase superior e inferior na temperatura desejada; e

 (b) remover a fase inferior da solução de proteína;

25 em que a fase inferior é uma solução de proteína que não apresenta ou exibe separação de fase líquida-líquida reduzida na temperatura desejada.

 18. Método para obter uma solução de proteína de concentração mais alta de uma solução de proteína de concentração inferior que exibe separação de fase líquida-líquida, compreendendo:

30 (a) permitir a solução de proteína original separar em uma fase superior e inferior; e

 (b) separar a fase inferior da fase superior,

em que a fase inferior é uma solução de proteína tendo uma concentração mais alta da proteína que a solução de proteína de concentração inferior.

19. Método para concentrar uma proteína em uma solução desejada, compreendendo:

5 (a) formular a proteína em qualquer solução em que a solução de proteína exibe separação de fase líquida-líquida;

(b) facilitar a separação de fase líquida-líquida na solução de proteína assim formando uma fase superior e inferior;

10 (c) separar a fase inferior da fase superior, em que a fase inferior tem uma concentração mais alta da proteína que a solução de proteína original, e

(d) conduzir uma troca de tampão para transferir a proteína da solução de proteína concentrada alta para a solução desejada.

15 20. Método da reivindicação 18 ou 19, adicionalmente compreendendo adicionar entre cerca de 0,5 mM a cerca de 25 mM de cloreto de cálcio ou cloreto de magnésio à fase inferior.

21. Método da reivindicação 18 ou 19, adicionalmente compreendendo adicionar entre cerca de 1 mM a cerca de 145 mM de metionina à fase inferior.

20 22. Método da reivindicação 18 ou 19, adicionalmente compreendendo adicionar entre cerca de 0,5 mM a cerca de 25 mM de cloreto de cálcio ou cloreto de magnésio, e entre cerca de 1 mM a cerca de 145 mM de metionina à fase inferior.

mAbs a 90 mg/ml em 10 mM Histidina, pH 6,0

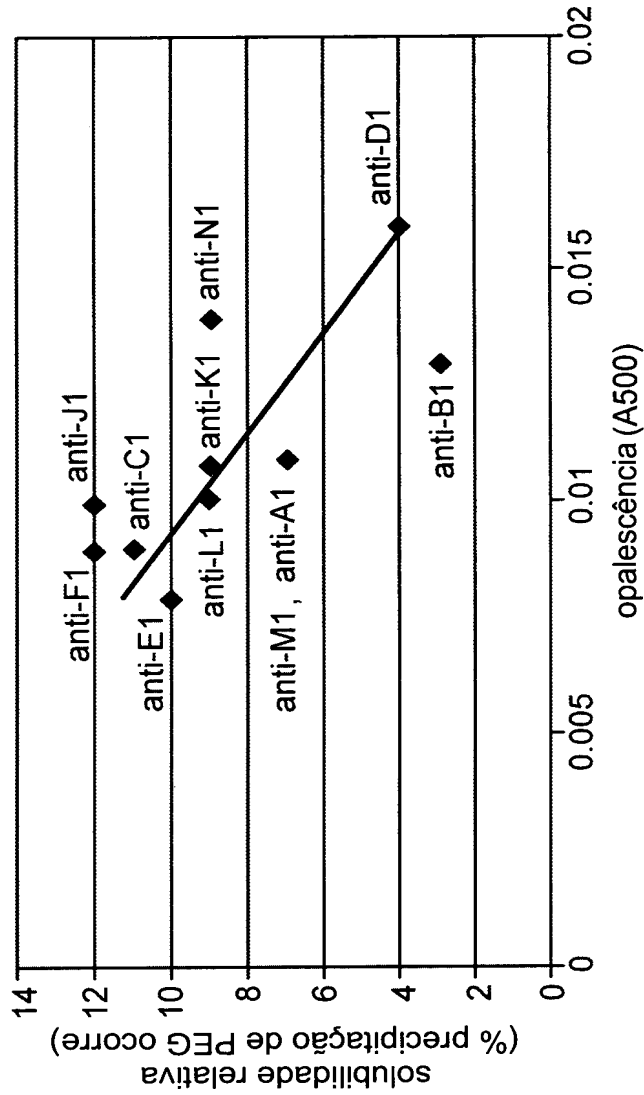


FIG. 1

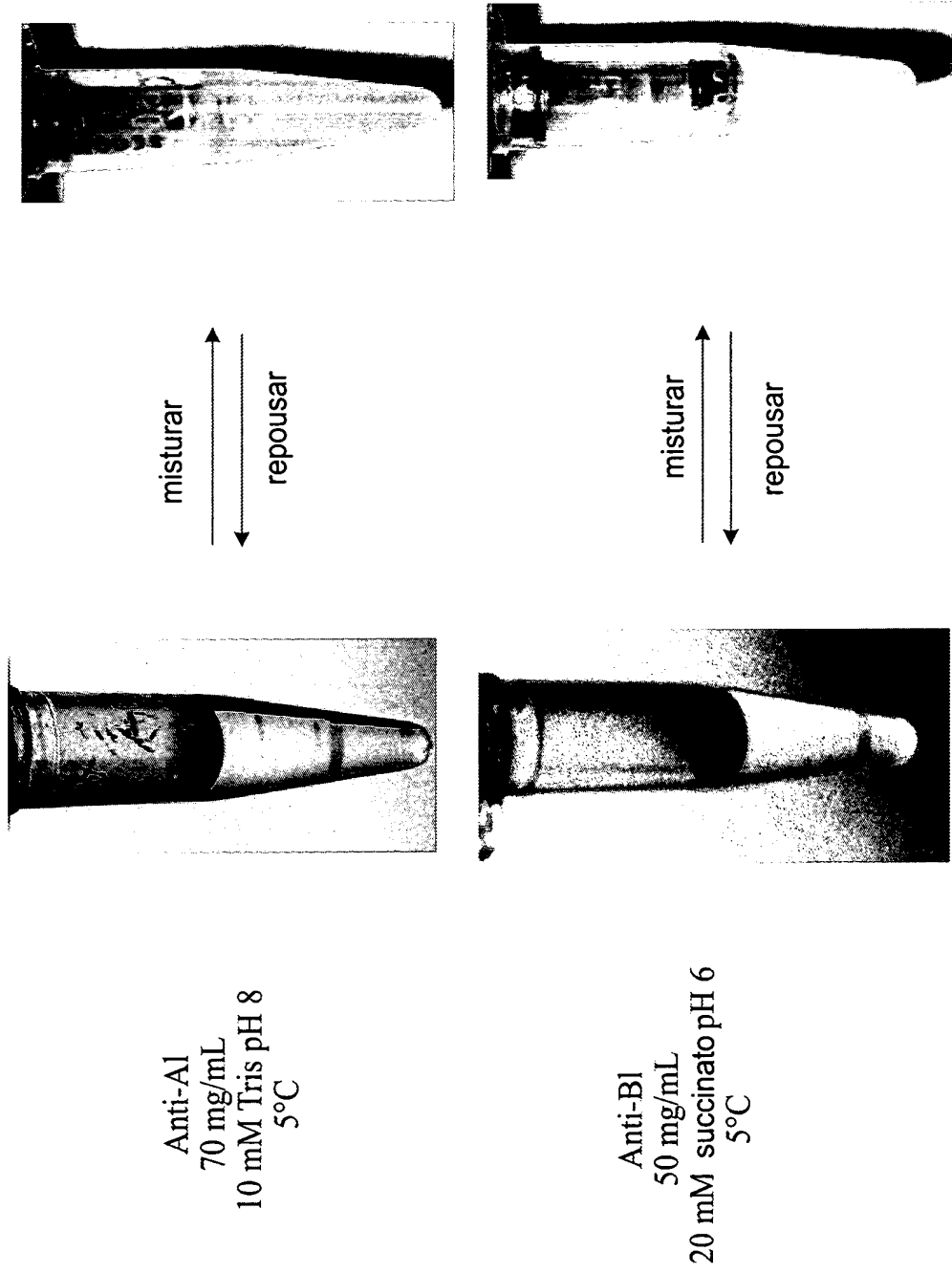
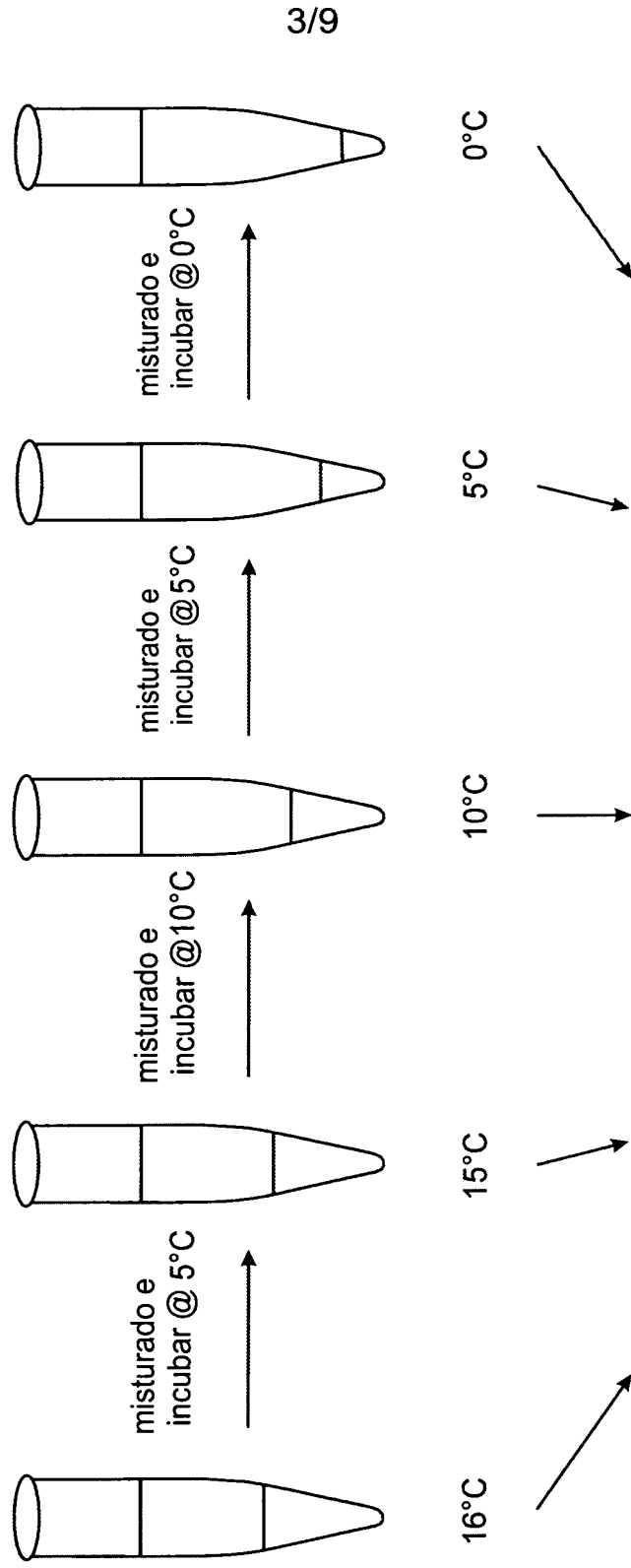


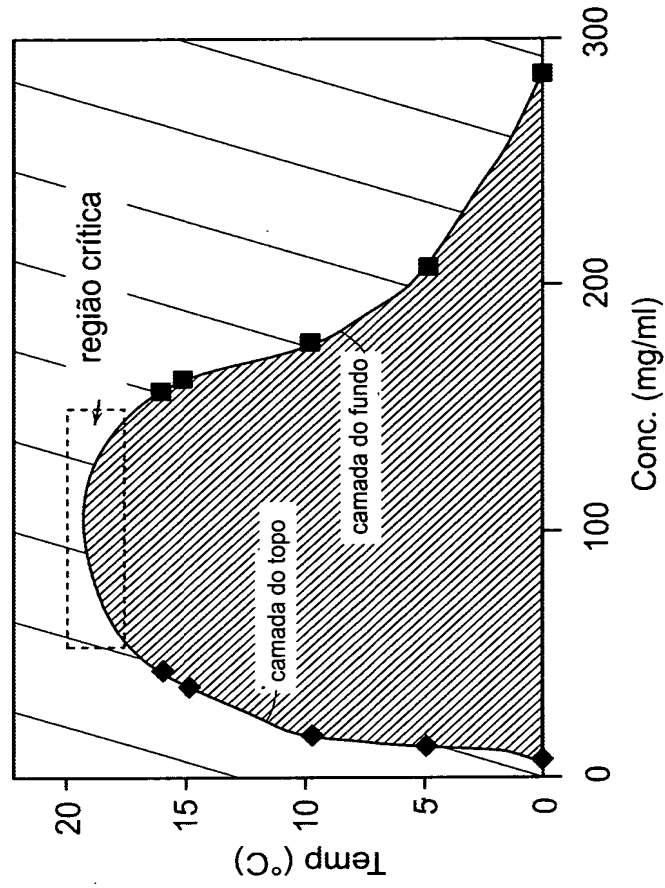
FIG. 2

70 mg/ml Anti-A1 em 10 mM Tris pH 8,0



retirar as amostras para medição da concentração

FIG. 3



70 mg/ml Anti-A1 em 10 mM Tris pH 8,0

Temp (°C)	topo (mg/mL)	fundo (mg/mL)
16	46	157
15	40	164
10	18	179
5	15	212
0	8	290

FIG. 4

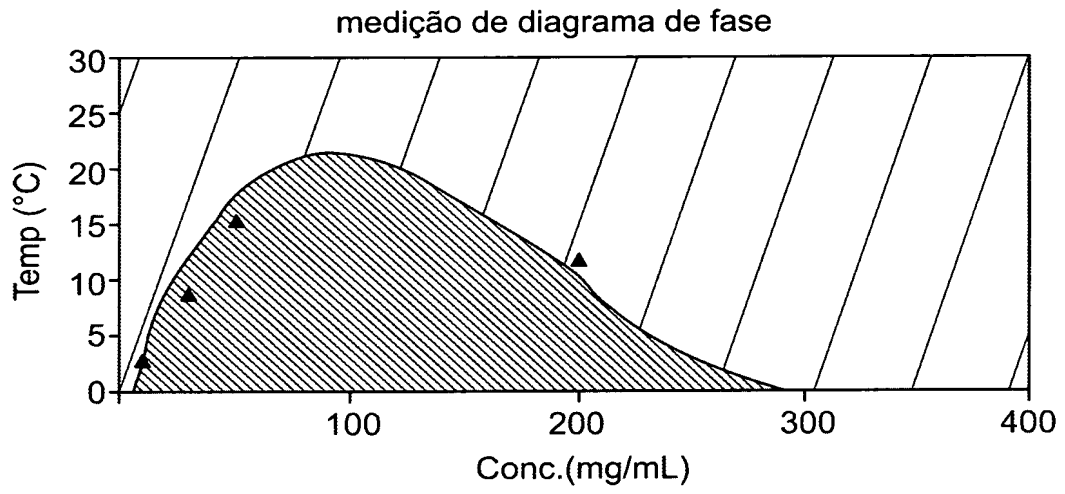


FIG. 5

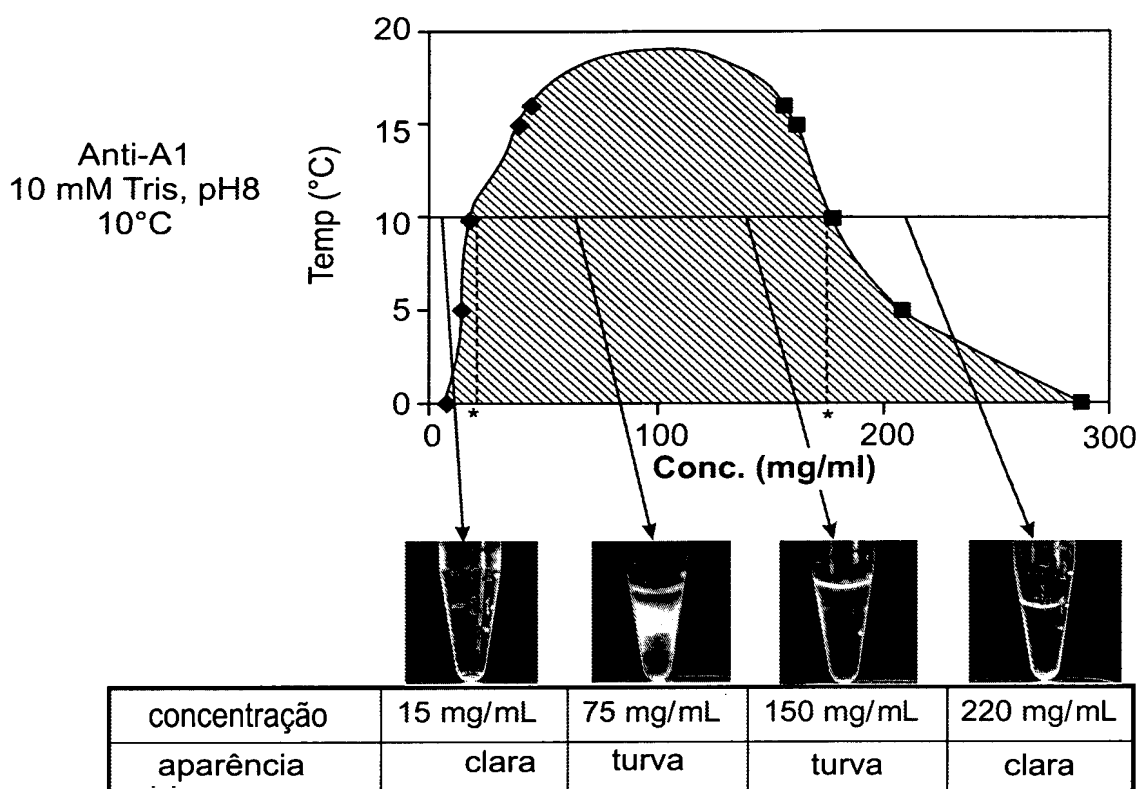


FIG. 6

	[Anti-A1]	[Cl ⁻¹]	[Tris]
tampão (10mM Tris, pH8)		5mM	9mM
pós-diálise	59 mg/mL	5mM	9mM
fase do topo	16 mg/mL	5mM	10 mM
fase do fundo	196 mg/mL	6mM	8 mM

FIG. 7

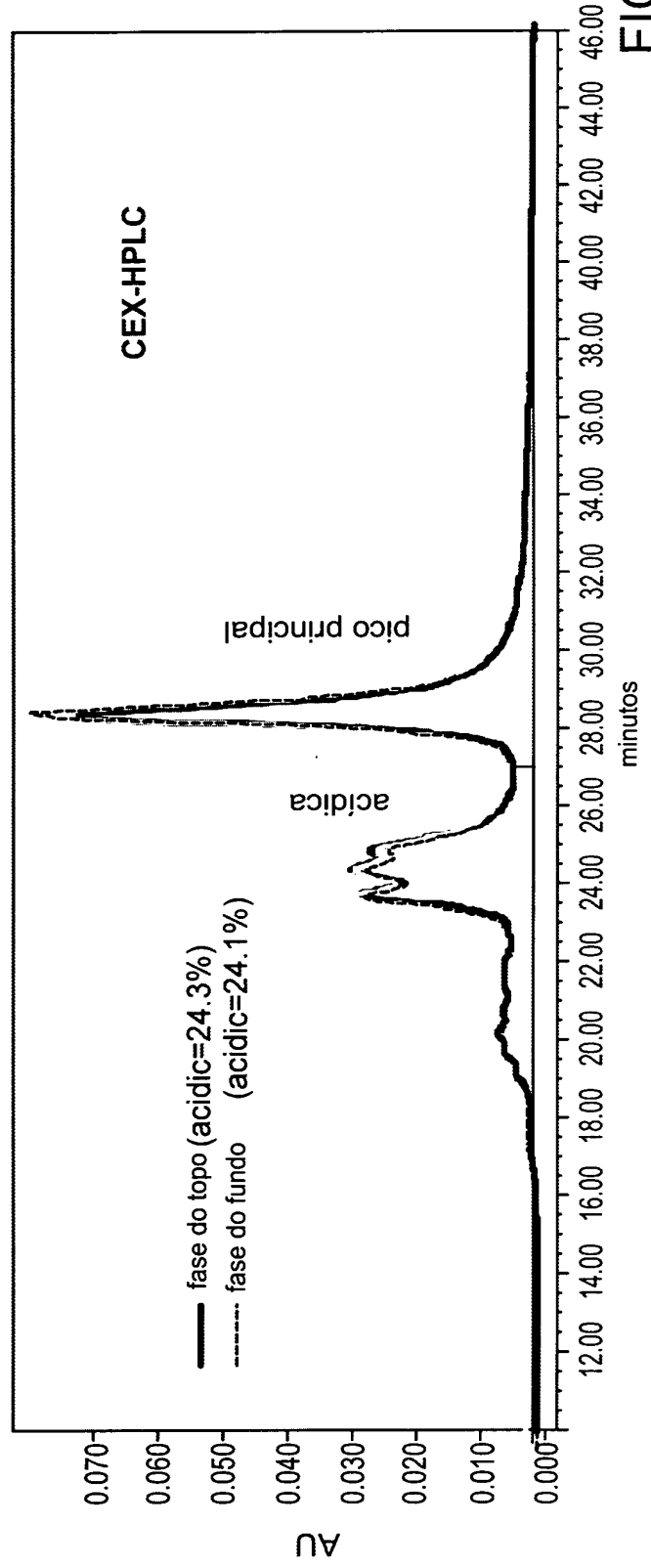
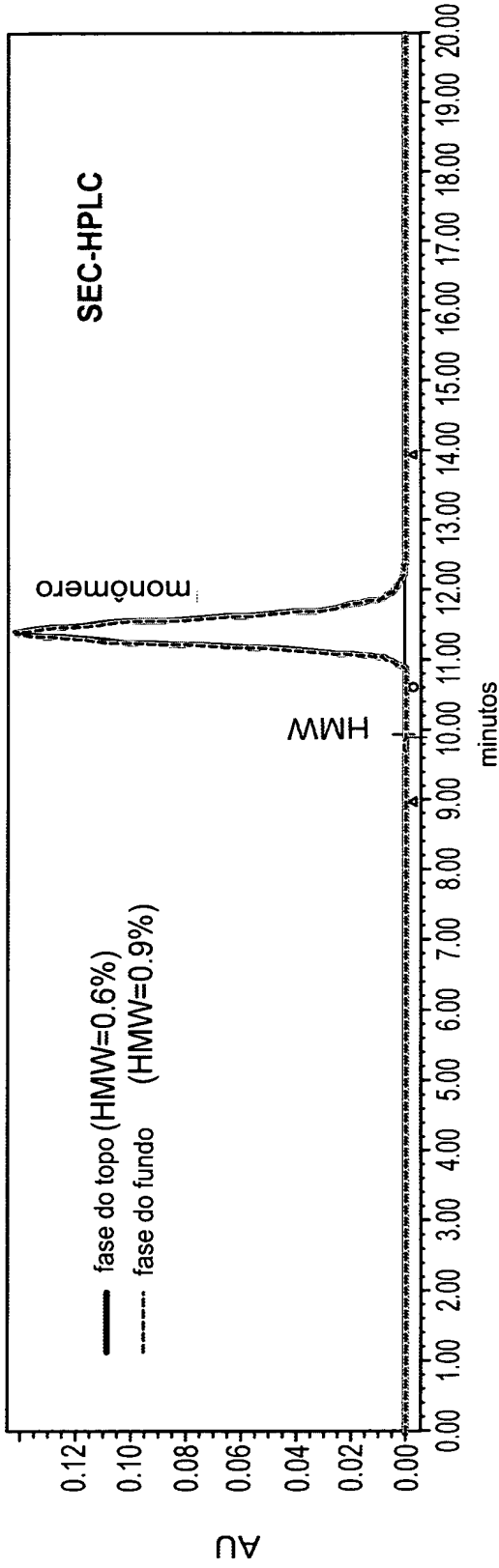


FIG. 8

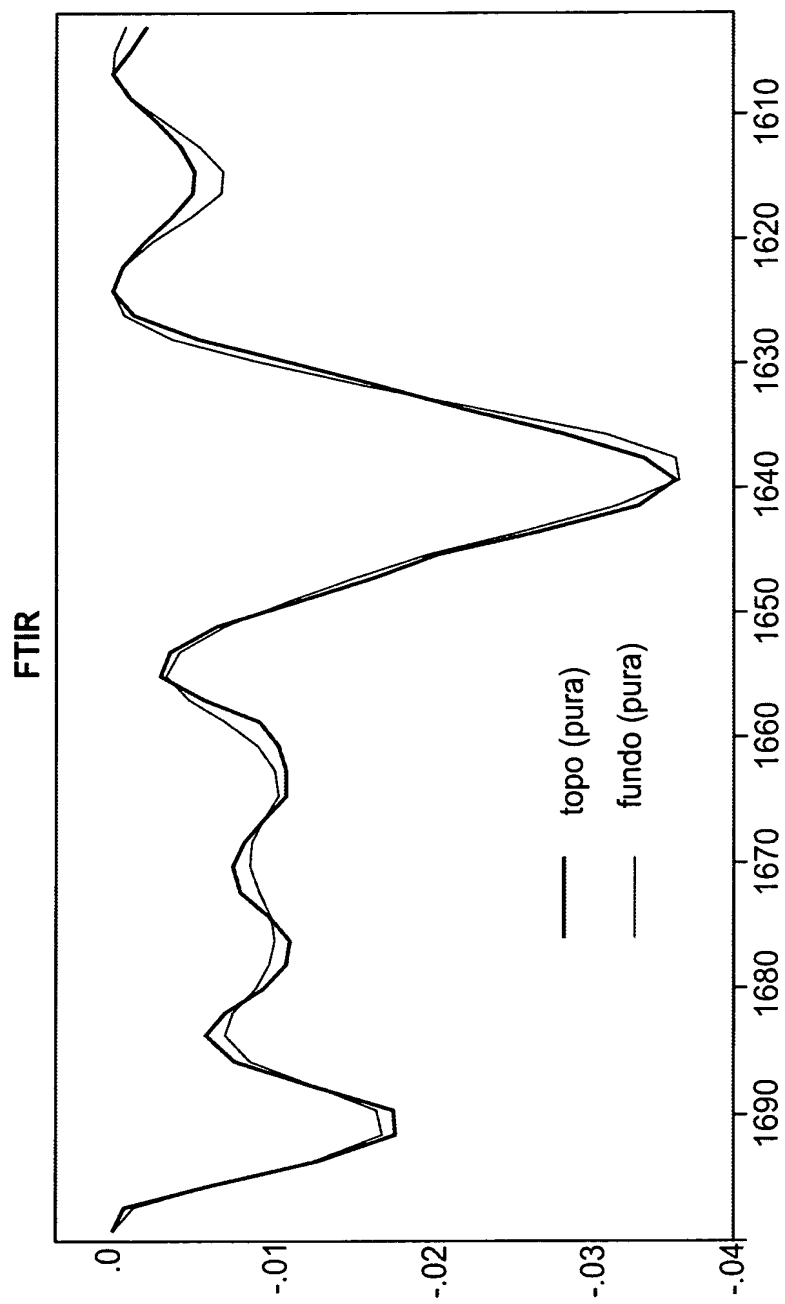


FIG. 9

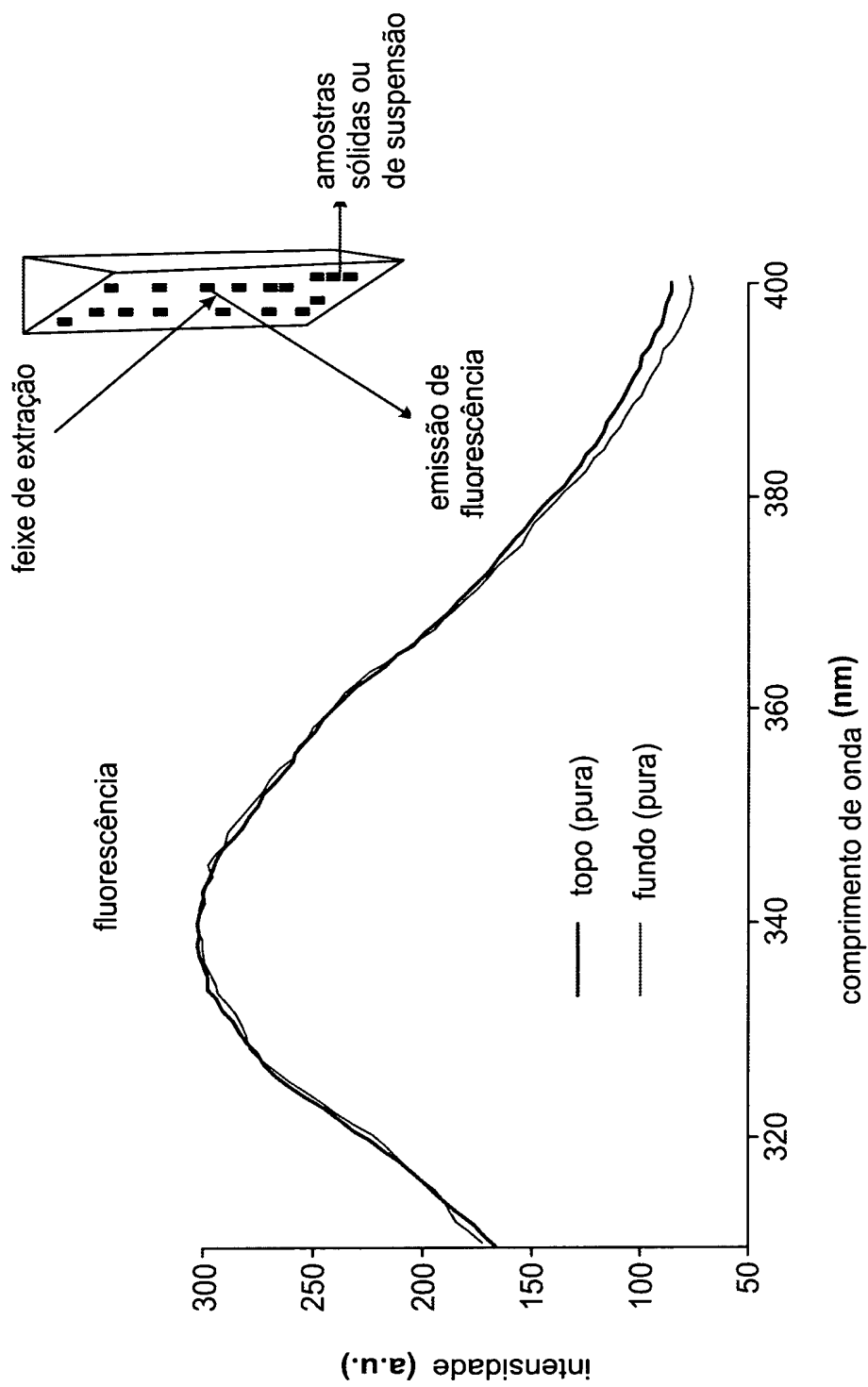


FIG. 10

RESUMO

Patente de Invenção: **"MÉTODOS PARA REDUZIR OU IMPEDIR SEPARAÇÃO DE FASE LÍQUIDA-LÍQUIDA EM SOLUÇÕES DE PROTEÍNA DE CONCENTRAÇÃO ALTA"**.

- 5 A presente invenção refere-se a métodos de formular proteínas em concentrações altas nas soluções de proteína, em que as soluções de proteína carecem ou têm separação de fase líquida-líquida reduzida, são descritos. Tais soluções de proteína são substancialmente claras e substancialmente homogêneas. Adicionalmente, métodos de concentrar e purificar
- 10 proteínas usando separação de fase líquida-líquida são fornecidos.