

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 985 395**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2011 E 21159453 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2024 EP 3892292**

54 Título: **Formulaciones líquidas que contienen anticuerpos estabilizados**

30 Prioridad:

20.01.2010 JP 2010010060

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

05.11.2024

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
5-1, 5-chome Ukima, Kita-ku
Tokyo 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**IGAWA, TOMOYUKI y
MORIYAMA, CHIFUMI**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 985 395 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulaciones líquidas que contienen anticuerpos estabilizados

Campo técnico

5 La presente invención se refiere a formulaciones que contienen anticuerpos, en particular a las formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados y estables.

Antecedentes de la técnica

10 En los últimos años, existe una demanda creciente para que se desarrollen formulaciones autoinyectables que contienen anticuerpos para la inyección subcutánea según las necesidades médicas. El diseño de formulaciones que contienen anticuerpos para la inyección subcutánea hace necesario aumentar la concentración del anticuerpo en la solución administrada, ya que las dosis únicas de anticuerpo son muy altas (de aproximadamente 100 a 200 mg) y el volumen de inyección para la inyección subcutánea está por lo general limitado.

15 Las soluciones que contienen anticuerpos muy concentrados tienden a formar soluciones muy viscosas por sí mismas debido a las interacciones intermoleculares y a las características macromoleculares de las proteínas. Adicionalmente, el fenómeno de la degradación, tal como la agregación, se vuelve problemático cuando las proteínas se almacenan como soluciones muy concentradas y, por lo tanto, debe evitarse esta degradación. En particular, las soluciones que contienen anticuerpos muy concentrados tienden a formar agregados durante la congelación y descongelación, o cuando se conservan en condiciones de líquido o en congelación durante un largo tiempo (Documentos no de patentes 1 y 2).

20 Hasta la fecha, tales formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados se preparan por lo general mediante el método convencional de concentración por liofilización (Documento de Patente 1), que es un método para estabilizar las formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados. En el método, se obtienen formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados mediante la liofilización de una solución de anticuerpos de una concentración relativamente baja y la disolución en un volumen de agua más pequeño que el volumen anterior a la liofilización. En este caso, el aumento de la viscosidad de las formulaciones disueltas se convierte en un problema porque debe añadirse un crioprotector, tal como azúcar, para obtener las formulaciones liofilizadas.

25 En este aspecto, este problema puede evitarse cuando se prepara una formulación líquida sin liofilización. Sin embargo, como se describe anteriormente, las formulaciones líquidas que contienen anticuerpos muy concentrados tienden a formar agregados. No obstante, tales formulaciones están muy solicitadas porque las formulaciones líquidas que contienen anticuerpos son más fáciles de manipular que las formulaciones liofilizadas y pueden formularse con facilidad en formulaciones para jeringuillas precargadas.

30 Se han realizado diversos estudios para estabilizar las formulaciones líquidas que contienen anticuerpos muy concentrados (documentos no de patentes 1 a 4). Se ha descrito que el tampón histidina y arginina son útiles como tamponante y estabilizante, respectivamente, en las formulaciones líquidas que contienen anticuerpos (documentos de patente 2, 3, 4, 5 y 6). El tampón de histidina se usa comúnmente en forma de sal de ácido clorhídrico. Recientemente, se ha informado que histidina-acetato muestra un efecto de estabilización más alto que histidina-clorhidrato y, por lo tanto, el ácido acético es útil a modo de contraión en el tampón de histidina (documento de patente 6). En otro orden de cosas, la arginina como estabilizante se ha usado por lo general en forma de arginina-clorhidrato. Sin embargo, en algunos casos no se obtiene suficiente estabilidad cuando se usa el ácido clorhídrico o el ácido acético a modo de contraión para la histidina o para la arginina. Por lo tanto, se necesitan mejores contraiones.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

45 Documento de patente 1: WO 1997/004801
 Documento de patente 2: WO 2008/121615
 Documento de patente 3: WO 2009/141239
 Documento de patente 4: WO 2008/071394
 Documento de patente 5: WO 2006/065746
 Documento de patente 6: WO 2006/044908

Documentos no de patentes

50 Documento 1 no de patente: Challenges in the development of high protein concentration formulations, J Pharm. Sci., 2004, 93 (6), 1390-1402
 Documento 2 no de patente: Curr. Opin. Biotechnol. Diciembre de 2009; 20(6): 708-14. Epub 31 de octubre de 2009
 Documento 3 no de patente: Antibody structure, instability and formulation, J. Pharm. Sci. 2007, 96 (1), 1-26

Documento 4 no de patente: Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics, Adv Drug Del Rev, 2006, 58 (5-6), 686-706

Descripción de la invención

[Problemas a solucionar por la invención]

5 Un objeto de la presente invención es proporcionar formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados y estables que son idóneas para la administración subcutánea.

[Medios para solucionar los problemas]

Para conseguir el objeto descrito anteriormente, los presentes inventores llevaron a cabo estudios especializados. Como resultado, los presentes inventores descubrieron que se conseguía un efecto de estabilización significativamente mayor usando un aminoácido ácido, ácido aspártico o ácido glutámico, a modo de contraión en el tampón de histidina o en el tampón de tris(hidroximetil)aminometano, a saber, el tampón de histidina-aspartato o el tampón de histidina-glutamato, o el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-aspartato o el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-glutamato, en comparación con los tampones convencionalmente descritos para las formulaciones farmacéuticas, tales como el tampón de histidina-clorhidrato y el tampón de histidina-acetato. Los presentes inventores también descubrieron que se conseguía un efecto de estabilización significativamente mayor con el uso de arginina-aspartato o arginina-glutamato a modo de estabilizante, a saber, mediante el uso de un aminoácido ácido, ácido aspártico o ácido glutámico, a modo de contraión para un aminoácido básico, tal como la arginina, que se usa a modo de estabilizante en comparación con los estabilizantes convencionalmente descritos para las formulaciones farmacéuticas, tales como arginina-clorhidrato. Por lo tanto, los presentes inventores descubrieron que pueden obtenerse las formulaciones líquidas que contienen anticuerpos muy concentrados y estables cuando se les añade a modo de estabilizante y, como consecuencia de esto, completaron la presente invención.

Específicamente, la presente invención proporciona:

- [1] una formulación líquida que comprende anticuerpos estables que comprende el tampón de histidina-aspartato y arginina-aspartato;
- [2] la formulación de acuerdo con [1], que no comprende sustancialmente el ion cloruro ni el ion acetato;
- [3] la formulación de acuerdo con [1] o [2], que comprende adicionalmente un azúcar;
- [4] la formulación de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [3], en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano;
- [5] la formulación de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [4], en donde el anticuerpo se ha modificado para que tenga un punto isoeléctrico (pI) de 5 a 8;
- [6] la formulación de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], en donde la concentración del anticuerpo es de 50 mg/ml o más;
- [7] la formulación de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [5], en donde la concentración del anticuerpo es de 50 a 250 mg/ml;
- [8] la formulación de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [7], en donde la viscosidad de la formulación líquida es de 30 mPa·s o menos;
- [9] la formulación de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [8], en donde la formulación líquida es estable de 2 °C a 8 °C durante al menos seis meses;
- [10] la formulación de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [9], que no se ha sometido a liofilización durante la preparación de la formulación;
- [11] la formulación de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [10], que se almacena congelada de -30 °C a -10 °C;
- [12] la formulación de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [11], en donde la concentración de histidina es de 5 a 100 mM;
- [13] la formulación de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [12], en donde la concentración de arginina es de 5 a 300 mM;
- [14] la formulación de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [13], en donde el anticuerpo es un anticuerpo contra el receptor de IL-6;
- [15] la formulación de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [14], en donde el tampón comprende sustancialmente solo aminoácido o aminoácidos;
- [16] la formulación de acuerdo con uno cualquiera de [1] a [15], que es para administración subcutánea.

[Efectos de la invención]

La presente invención proporciona formulaciones que contienen anticuerpos que tienen mayor estabilidad. La presente invención también puede proporcionar formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados mediante la supresión de la formación de agregados en las formulaciones líquidas y congeladas. Las formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados de la presente invención se pueden conservar de manera estable en una condición de líquido o congelado durante mucho tiempo. Adicionalmente, las formulaciones de la presente invención tienen una estabilidad mejorada contra el estrés de congelación y descongelación. Además, en términos

de presión osmótica, la estabilización puede conseguirse sin aumentar la presión osmótica, mediante el uso de ácido aspártico y ácido glutámico en vez del ácido clorhídrico y el ácido acético que se usan convencionalmente a modo de contraión para histidina, arginina o tris(hidroximetil)aminometano. Es ventajoso conseguir la estabilización sin aumentar la presión osmótica, cuando uno pretende producir formulaciones estables casi isotónicas, tales como formulaciones para la administración subcutánea (s.c.).

Breve descripción de los dibujos

- La Fig. 1 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante el almacenamiento del Acm1 a 40 °C.
- La Fig. 2 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante el almacenamiento del Acm2 a 40 °C.
- La Fig. 3 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación del Acm1.
- La Fig. 4 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante el almacenamiento del Acm1 a 25 °C.
- La Fig. 5 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante el almacenamiento del Acm1 a 5 °C.
- La Fig. 6 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (de -20 °C a temperatura ambiente) del Acm1.
- La Fig. 7 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa la cantidad (%) de agregados al cabo de tres meses de almacenamiento del Acm1 a -20 °C.
- La Fig. 8 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (de -20 °C a temperatura ambiente) del Acm2.
- La Fig. 9 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa la cantidad (%) de agregados después del almacenamiento del Acm1 a -20 °C.
- La Fig. 10 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa la cantidad (%) de agregados después de la congelación y descongelación (de -20 °C a temperatura ambiente) del Acm1.
- La Fig. 11 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa la cantidad (%) de agregados al cabo de tres meses de almacenamiento del Acm1 a 25 °C.
- La Fig. 12 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante el almacenamiento del Acm2 a 25 °C.
- La Fig. 13 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante el almacenamiento del Acm3 a 25 °C.
- La Fig. 14 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (entre -20 °C y temperatura ambiente) del Acm3.
- La Fig. 15 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante el almacenamiento del Acm4 a 25 °C.
- La Fig. 16 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (entre -20 °C y temperatura ambiente) del Acm4.
- La Fig. 17 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante el almacenamiento de los Acm1, Acm2 y Acm3 a 25 °C.
- La Fig. 18 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (entre -20 °C y temperatura ambiente) de los Acm1, Acm2 y Acm3.
- La Fig. 19 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante el almacenamiento del Acm5 a 25 °C.
- La Fig. 20 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (entre -20 °C y temperatura ambiente) del Acm5.
- La Fig. 21 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante el almacenamiento de los Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5 a 25 °C.
- La Fig. 22 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (entre -20 °C y temperatura ambiente) de los Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5.
- La Fig. 23 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante el almacenamiento de los Acm1, Acm2 y Acm3 a 25 °C.
- La Fig. 24 es una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (entre -20 °C y temperatura ambiente) de los Acm1, Acm2 y Acm3.

Modo de llevar a la práctica la invención

A continuación en el presente documento, la presente invención se describirá más específicamente.

- La presente invención proporciona formulaciones que contienen anticuerpos estables que contienen el tampón de histidina-aspartato y arginina-aspartato. La formulación que contiene anticuerpos de la presente invención hace referencia a una formulación que contiene un anticuerpo como un principio activo y que se prepara en una forma que

permite la administración a animales, tal como un ser humano.

En el presente documento, "formulación que contiene anticuerpos estables" hace referencia a una formulación en la que la agregación de proteínas, tal como un anticuerpo, apenas se forma, en concreto, una formulación en la que la degradación, tal como la formación de agregados solubles e insolubles, apenas se produce durante la conservación en una condición de líquido o en congelación.

La concentración del anticuerpo en una formulación de la presente invención no está particularmente limitada; sin embargo, la formulación contiene preferentemente un anticuerpo muy concentrado. La concentración del anticuerpo es preferentemente de 50 mg/ml o más, más preferentemente de 100 mg/ml o más, incluso más preferentemente de 120 mg/ml o más, aún más preferentemente de 150 mg/ml o más, y todavía más preferentemente de 180 mg/ml o más. El límite superior de la concentración del anticuerpo en una formulación de la presente invención no está particularmente limitado; sin embargo, el límite es por lo general de 250 mg/ml.

Los anticuerpos usados en la presente invención no están particularmente limitados, siempre que se unan a un antígeno de interés. Los anticuerpos podrían ser anticuerpos monoclonales o policlonales; sin embargo, se prefieren los anticuerpos monoclonales ya que pueden producirse de manera estable como anticuerpos homogéneos.

Los anticuerpos monoclonales usados en la presente invención incluyen no solo los procedentes de animales tales como humanos, ratones, ratas, hámsteres, conejos, ovejas, camellos y monos, sino también los anticuerpos recombinantes de genes modificados artificialmente, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos por recombinación génica que son el resultado de modificar artificialmente las regiones constantes del anticuerpo para alterar las propiedades físicas de la molécula de anticuerpo (en concreto, la alteración del punto isoeléctrico (pI), la mejora de la afinidad por el receptor Fc, etc.) con el propósito de mejorar la persistencia de la sangre y la farmacocinética *in vivo*.

La clase de inmunoglobulinas de los anticuerpos usados en la presente invención no está particularmente limitada; y la clase podría ser cualquier clase, incluyendo IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA, IgD, IgE e IgM. Sin embargo, se prefieren la IgG y la IgM.

Los anticuerpos usados en la presente invención también incluyen no solo los anticuerpos enteros, sino también los fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, Fab y F(ab)₂, y minicuerpos (anticuerpos de masa molecular baja), tales como Fv monocatenarios monovalentes o bivalentes que son el resultado de enlazar las regiones variables del anticuerpo a través de un conector, tal como un conector peptídico (scFv, sc(Fv)₂, diacuerpos tales como el dímero de scFv, etc.).

Los anticuerpos descritos anteriormente que se han usado en la presente invención pueden prepararse mediante los métodos conocidos por los expertos en la materia.

Básicamente, pueden prepararse hibridomas productores de anticuerpos monoclonales mediante los métodos convencionales descritos a continuación. Específicamente, la inmunización se lleva a cabo mediante un método de inmunización convencional usando un antígeno deseado o células que expresan el antígeno deseado como un antígeno sensibilizante. Los inmunocitos preparados se fusionan con células parentales conocidas mediante un método convencional de fusión de células. Entre las células fusionadas se seleccionan las células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) mediante los métodos de detección selectiva convencionales. Los hibridomas pueden generarse, por ejemplo, según el método de Milstein *et al.* (Kohler, G y Milstein, C. *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46). Cuando el antígeno tiene poca inmunogenicidad, la inmunización puede realizarse usando el antígeno enlazado a macromoléculas inmunógenas tales como albúmina.

Como alternativa, es posible usar anticuerpos recombinantes de genes producidos usando técnicas de recombinación génica en las que los genes de los anticuerpos se clonan de hibridomas y se insertan en los vectores apropiados, y los vectores resultantes se introducen en hospedadores (véase, por ejemplo, Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, publicado en el Reino Unido por Macmillan Publishers, 1990). Específicamente, los ADNc para las regiones variables de los anticuerpos (regiones V) se sintetizan a partir de los ARNm de los hibridomas mediante el uso de la transcriptasa inversa. Cuando se obtiene un ADN que codifica una región V del anticuerpo de interés, el ADN se enlaza a un ADN que codifica una región constante de anticuerpo (región C) deseada. La construcción resultante se inserta en un vector de expresión. Como alternativa, el ADN que codifica la región V de anticuerpo podría insertarse en un vector de expresión que lleva el ADN de la región C del anticuerpo. La construcción resultante se inserta en un vector de expresión de tal modo que se expresa bajo el control de una región reguladora de la expresión, por ejemplo, potenciador y promotor. A continuación, las células hospedadoras se transforman con el vector de expresión para expresar el anticuerpo.

En la presente invención, los anticuerpos recombinantes de genes modificados artificialmente, tales como anticuerpos quiméricos y humanizados, pueden usarse para reducir la antigenicidad heteróloga contra ser humano. Tales anticuerpos modificados pueden producirse usando métodos conocidos. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo que tiene las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de un anticuerpo de un mamífero no humano, tal como ratón, y las regiones constantes de la cadena pesada y de la cadena ligera de un

anticuerpo humano. El anticuerpo quimérico puede producirse enlazando un ADN que codifica las regiones variables de un anticuerpo de ratón a un ADN que codifica las regiones constantes de un anticuerpo humano, insertando lo ligado en un vector de expresión y, a continuación, introduciendo el vector en el interior de un hospedador para que se exprese.

5 Un anticuerpo humanizado también se denomina un anticuerpo humano remodelado y se obtiene sustituyendo la región determinante de complementariedad (CDR, por sus siglas en inglés) de un anticuerpo humano para la región determinante de complementariedad de un anticuerpo procedente de un mamífero no humano, por ejemplo, ratón. Se conocen las técnicas convencionales de recombinación génica. Específicamente, una secuencia de ADN se diseña para que tenga una CDR de anticuerpo de ratón enlazada a una región marco (FR, por sus siglas en inglés) de anticuerpo humano, y se sintetiza por PCR usando varios oligonucleótidos preparados para tener regiones solapantes en sus extremos. El ADN obtenido se liga a un ADN que codifica una región constante de anticuerpo humano, y, a continuación, se inserta en un vector de expresión. El vector de expresión se introduce en un hospedador para producir el anticuerpo humanizado (véanse la publicación de la solicitud de patente europea n.º EP 239400 y el documento WO 96/02576). La FR del anticuerpo humano enlazada a la CDR se selecciona de tal modo que la región determinante de complementariedad forma un dominio de fijación al antígeno preferida. Los aminoácidos de la región flanqueante de la región variable del anticuerpo pueden sustituirse cuando sea necesario, de tal modo que la región determinante de complementariedad del anticuerpo humano remodelado forme un dominio idóneo de fijación al antígeno (Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856).

20 Se conocen técnicas para sustituir los aminoácidos de los anticuerpos para mejorar la actividad de los anticuerpos, las propiedades físicas, la farmacocinética, la seguridad, etc. Ejemplos de tales técnicas se describen a continuación. Los anticuerpos de la presente invención también incluyen los que tienen tales sustituciones de aminoácidos.

Se han descrito técnicas para sustituir los aminoácidos en las regiones variables de los anticuerpos IgG e incluyen la humanización (Tsurishita N., Hinton P. R., Kumar S., "Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax", *Methods*. Mayo de 2005, 36 (1): 69-83); la maduración de la afinidad para realzar la actividad de fijación a través de la sustitución de aminoácidos en la región determinante de complementariedad (CDR) (Rajpal A., Beyaz N., Haber L., Cappuccilli G., Yee H., Bhatt R. R., Takeuchi T., Lerner R. A., Crea R., "A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries", *Proc. Natl Acad Sci USA*, 14 de junio de 2005, 102 (24): 8466-71); y la mejora de la estabilidad fisicoquímica a través de la sustitución de aminoácidos en región flanqueante (FR) (Ewert S., Honegger A., Pluckthun A., "Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CD grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering", *Methods*. Octubre de 2004; 34 (2): 184-99. Revisión). También se conocen técnicas para reforzar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediante la sustitución de los aminoácidos del dominio Fc del anticuerpo de tipo IgG (Kim S. J., Park Y., Hong H. J., "Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies", *Mol Cells*. 31 de agosto de 2005; 20 (1): 17-29. Revisión). Por otra parte, además de las técnicas para realzar las funciones efectoras, hay informes publicados sobre técnicas para mejorar la semivida del anticuerpo en la sangre mediante la sustitución de aminoácidos en Fc (Hinton P. R., Xiong J. M., Johlfis M. G., Tang M. T., Keller S., Tsurushita N., "An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life", *J Immunol*. 1 de enero de 2006, 176 (1): 346-56; Ghetie V., Popov S., Borvak J., Radu C., Matesoi D., Medesan C., Ober R. J., Ward E.S., "Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis", *Nat. Biotechnol.* Julio de 1997; 15 (7): 637-40). Otra técnica conocida incluye la técnica de sustitución de aminoácidos para controlar el punto isoelectrico (pI) de un anticuerpo con el fin de mejorar la persistencia en la sangre o la farmacocinética *in vivo*, en concreto, una técnica para modificar los restos aminoacídicos expuestos en la superficie de un anticuerpo para controlar el pI del anticuerpo (solicitud de patente internacional WO 07/114319). También se conocen diferentes técnicas para sustituir aminoácidos en las regiones constantes con el fin de mejorar las propiedades físicas de un anticuerpo (solicitud de patente internacional WO 09/41613).

Puede esperarse una reducción de la dosificación del anticuerpo a modo de sustancia farmacéutica o que se extienda el intervalo de administración del anticuerpo cuando se prolonga la semivida o la retención plasmática de un anticuerpo. Las tecnologías prometedoras para conseguir esto incluyen una técnica para hacer disminuir el punto isoelectrico del anticuerpo (documento WO 07/114319). Las formulaciones de la presente invención tienen un efecto muy estabilizante para los anticuerpos con un punto isoelectrico alterado. El anticuerpo con el pI modificado hace referencia a un anticuerpo modificado cuyo pI es más bajo que el del anticuerpo original en una o más, preferentemente dos o más y más preferentemente tres o más. En general, se supone que los anticuerpos naturales (o corrientes) tienen un punto isoelectrico dentro del intervalo de 7,5 a 9,5. Las formulaciones de la presente invención tienen un efecto muy estabilizante para, en particular, los anticuerpos con un punto isoelectrico bajo que apenas existen en la naturaleza. El punto isoelectrico de tales anticuerpos podría ser de 5,0 a 8,0, preferentemente de 5,0 a 7,5, más preferentemente de 5,0 a 7,0, y aún más preferentemente de 5,5 a 6,5. Como se describe en los Ejemplos a continuación, el punto isoelectrico del Acm1, que se produjo a partir de la modificación de la secuencia aminoacídica del Acm2 (punto isoelectrico = 9,3) para controlar el punto isoelectrico, era de 5,8.

También se conocen métodos para obtener anticuerpos humanos. Por ejemplo, los anticuerpos humanos deseados con actividad de fijación al antígeno pueden obtenerse mediante la sensibilización de los linfocitos humanos con un antígeno de interés o con células que expresan un antígeno de interés *in vitro*; y la posterior fusión de los linfocitos sensibilizados con células de mieloma de humano, tales como U266 (véase la solicitud de patente japonesa de

Kokuku con publicación n.º (JP-B) H01-59878 (solicitud de patente japonesa evaluada y aprobada, y publicada por oposición)). Como alternativa, pueden obtenerse también los anticuerpos de humano deseados al inmunizar con un antígeno los animales transgénicos que tienen el repertorio completo de los genes de anticuerpos humanos (véanse los documentos WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735).

5 Adicionalmente, se conocen las técnicas para obtener anticuerpos humanos mediante rondas de criba de una genoteca de anticuerpos humanos. Por ejemplo, las regiones variables de los anticuerpos humanos pueden expresarse como anticuerpos monocatenarios (scFv, por sus siglas en inglés) sobre la superficie de los fagos mediante un método de exposición en fagos y, a continuación, pueden seleccionarse los fagos que se unen al antígeno. Los genes de los fagos seleccionados pueden analizarse para determinar las secuencias de ADN que
10 codifican las regiones variables de los anticuerpos humanos que se unen al antígeno. Cuando se identifican las secuencias de ADN de los scFv que se unen al antígeno, pueden construirse vectores de expresión apropiados que llevan estas secuencias para obtener los anticuerpos humanos. Tales métodos ya se conocen bien. Véanse los documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388. Los anticuerpos usados en la presente invención también incluyen tales anticuerpos humanos.

15 Cuando se aíslan los genes de los anticuerpos y se introducen en los hospedadores apropiados para producir anticuerpos, pueden usarse hospedadores y vectores de expresión en las combinaciones adecuadas. Cuando las células eucariotas se usan a modo de hospedador, pueden usarse células animales, células vegetales y células de hongos. Las células animales incluyen: (1) células de mamífero, tales como células CHO, COS, de mieloma, de riñón de cría de hámster (BHK), HeLa y Vero; (2) células de anfibio, tales como de ovocitos de *Xenopus*; y (3)
20 células de insecto, tales como sf9, sf21 y Tn5. Las células vegetales conocidas incluyen las células procedentes del género *Nicotiana*, tales como *Nicotiana tabacum*, que pueden cultivarse como un callo. Las células de hongos conocidas incluyen las de levadura, tales como el género *Saccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, y las de hongos filamentosos, tales como el género *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus niger*. Cuando se usan células procariotas, pueden usarse sistemas de producción que usan células bacterianas. Las células bacterianas
25 conocidas incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Bacillus subtilis*. Los anticuerpos pueden obtenerse mediante la introducción por transformación de los genes del anticuerpo de interés en el interior de estas células, y a continuación el cultivo *in vitro* de las células transformadas.

Los anticuerpos usados en la presente invención también incluyen fragmentos de anticuerpo, minicuerpos y anticuerpos modificados. Tales fragmentos de anticuerpo y minicuerpos incluyen, por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv o Fv monocatenarios mono-, bi- o multivalentes (scFv, sc(Fv)₂ o similares) que son el resultado de unir Fv de las cadenas ligera y pesada mediante los enlazadores apropiados (Huston S. et al, (1988) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A 85: 5879-5883). En concreto, tales fragmentos de anticuerpo se generan al tratar los anticuerpos con una enzima, tal como la papaína o la pepsina. Como alternativa, se construye el gen que codifica un fragmento de anticuerpo, se inserta en un vector de expresión y se expresa en las células hospedadoras apropiadas (véanse, por ejemplo, Co, M. S et al., J. Immunol. (1994) 152, 2968-2976; Better, M. y Horwitz, A. H. Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. y Skerra, A. Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. y Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137).

Los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos enlazados a polietilenglicol (PEG) o diversas moléculas, tales como agentes citotóxicos (Farmaco. 30 de agosto de 1999; 54 (8): 497-516; Cancer J. Mayo-junio de 2008; 14 (3): 154-69). Los "anticuerpos" de la presente invención también incluyen tales anticuerpos modificados. Tales anticuerpos modificados pueden prepararse mediante la modificación química de los anticuerpos obtenidos. Tales métodos ya están consolidados en este campo.

Los anticuerpos que estarán contenidos en las formulaciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos contra la tromboplastina tisular, anticuerpos contra el receptor de IL-6, anticuerpos contra IL-6, anticuerpos monoclonales contra el antígeno HM1.24, anticuerpos contra el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (anticuerpos anti-PTHrP), anticuerpos contra el glipicano-3, anticuerpos contra el gangliósido GM3, anticuerpos contra el agonista del receptor de la trombopoyetina, anticuerpos a modo de sustituto funcional del factor de coagulación VIII, anticuerpos contra el receptor de IL31, anticuerpos contra HLA, anticuerpos contra AXL, anticuerpos contra CXCR4, anticuerpos contra NR10 y anticuerpos biespecíficos contra el factor IX y el factor X.

50 Los anticuerpos humanizados y remodelados preferidos que se usan en la presente invención incluyen los anticuerpos humanizados contra el receptor de la interleucina 6 (IL-6) (tocilizumab, hPM-1 y MRA) (véase el documento WO 92/19759), anticuerpos monoclonales humanizados contra el antígeno HM1.24 (véase el documento WO 98/14580), anticuerpos humanizados contra el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (anticuerpos anti-PTHrP) (véase el documento WO 98/13388), anticuerpos humanizados contra la tromboplastina tisular (véase el documento WO 99/51743), anticuerpos humanizados IgG1κ contra el glipicano-3 (véase el documento PCT/JP05/013103), y anticuerpos humanizados anti-NR10 (véase el documento WO 2009/072604). Los anticuerpos humanizados particularmente preferidos que se usan en la presente invención son los anticuerpos humanizados contra el receptor de IL-6.

Los anticuerpos de tipo IgM humanos preferidos incluyen los anticuerpos recombinantes humanos de tipo IgM contra el gangliósido GM3 (véase el documento WO 05/05636).

Los minicuerpos preferidos incluyen los diacuerpos agonistas contra el receptor de TPO (véase el documento WO 02/33072) y los diacuerpos agonistas contra el CD47 (véase el documento WO 01/66737).

5 Además, los anticuerpos con un punto isoeléctrico mejorado incluyen, por ejemplo, el Acm1 (cadena H/SEQ ID NO: 1; cadena L/SEQ ID NO: 2), que es un anticuerpo contra el receptor de IL-6 descrito en el documento WO 2009/041621, los anticuerpos humanizados anti-NR10, y los anticuerpos totalmente humanizados NS22 producidos por el método descrito en el Ejemplo 12 del documento WO 2009/072604.

10 En una realización preferida, el tampón de una formulación de la presente invención (es decir, el tampón de histidina-aspartato) se prepara mediante la valoración de una solución acuosa que contiene histidina en forma de aminoácido libre, con una solución acuosa que contiene ácido aspártico en forma de aminoácido libre. Como alternativa, el tampón puede prepararse mediante la adición de los ingredientes en el orden inverso o mediante la valoración directa con polvos.

15 En una realización preferida, la arginina-aspartato en una formulación de la presente invención es una sal preparada mediante la valoración de una solución acuosa que contiene ácido aspártico (aminoácido libre) en forma de aminoácido libre con una solución acuosa que contiene arginina (base libre) en forma de aminoácido libre. Como alternativa, la sal puede prepararse por adición de los ingredientes en el orden inverso, o mediante valoración directa con polvos.

20 Los presentes inventores llevaron a cabo estudio de congelación y descongelación, estudio de aceleración térmica, estudio de estabilidad a largo plazo y estudio almacenamiento en congelación para valorar los efectos de diferentes aditivos sobre la estabilidad de las formulaciones de anticuerpos muy concentrados durante el almacenamiento. Como resultado, los presentes inventores descubrieron que la formación de agregados se suprimió significativamente mediante el uso de ácido aspártico a modo de contraión en el tampón de histidina, a saber, mediante el uso del tampón de histidina-aspartato como tampón en comparación con los tampones convencionales para las formulaciones farmacéuticas, tales como el tampón de histidina-clorhidrato y el tampón de histidina-acetato.

25 Los presentes inventores también descubrieron que se conseguía un mayor efecto de estabilización mediante la adición de arginina-aspartato que con arginina-clorhidrato, que se ha informado como un estabilizante de las formulaciones que contienen anticuerpos. Los resultados de la valoración se ilustran como ejemplo en los Ejemplos que vienen a continuación, usando un anticuerpo humanizado contra el receptor de IL-6.

30 Específicamente, pueden prepararse formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados y estables que tienen poco nivel de agregación de anticuerpos mediante la adición del tampón de histidina-aspartato. Adicionalmente, pueden prepararse formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados y más estables que tienen un nivel mucho más bajo de agregación de anticuerpos mediante la adición de arginina-aspartato a modo de estabilizante. Por lo tanto, se desvelan los métodos para suprimir significativamente la formación de agregados mediante el uso del tampón de histidina-aspartato como un tampón para las soluciones que contienen anticuerpos muy concentrados, y a los métodos para suprimir significativamente la formación de agregados mediante la adición de arginina-aspartato a modo de estabilizante a las soluciones que contienen anticuerpos muy concentrados.

35 Los métodos incluyen, por ejemplo, métodos para suprimir la formación de agregados durante la conservación de formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados en condiciones de congelación o en congelación y descongelación con el uso de ácido aspártico a modo de contraión para el tampón histidina o a modo de contraión para el estabilizante arginina en las formulaciones.

40 Los métodos también pueden incluir, por ejemplo, métodos para suprimir la formación de agregación durante la conservación de las formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados en una condición de líquido mediante el uso de ácido aspártico a modo de contraión para el tampón de histidina o a modo de contraión para el estabilizante arginina en las formulaciones.

45 En la presente invención, los tampones que pueden usarse en vez del tampón de histidina y en los cuales se usa el ácido aspártico a modo de contraión incluyen el tris(hidroximetil)aminometano (Tris) e imidazol. Tales tampones también pueden añadirse al tampón histidina de la presente invención.

En la presente invención, los estabilizantes para los que pueden usarse el ácido aspártico a modo de contraión incluyen argininamida, lisina, meglumina, espermina, espermidina, magnesio, calcio, sodio y potasio, además de arginina.

50 Como se describe anteriormente, la presente invención proporciona formulaciones que contienen anticuerpos estables que comprenden el tampón de histidina-aspartato. Se consigue un efecto de estabilización mucho mayor en las formulaciones que contienen anticuerpos de la presente invención ya que contienen además arginina-aspartato. Por lo tanto, la presente invención hace referencia a formulaciones que contienen anticuerpos que contienen una sal que combina histidina y arginina con ácido aspártico en líquido.

55 La histidina usada en la presente invención podría ser la propia histidina o un derivado de la misma, y la L-histidina se prefiere particularmente. La arginina usada en la presente invención podría ser la propia arginina, un derivado de

la misma, o una sal de la misma, y se prefiere particularmente la L-arginina o una sal de la misma. Las sales de arginina preferidas incluyen la sal de aspartato y sal de glutamato.

5 En las formulaciones de la presente invención, la concentración (cantidad) de tampón de histidina-aspartato es preferentemente de 1 a 100 mM, más preferentemente de 5 a 100 mM, incluso más preferentemente de 5 a 50 mM, y todavía más preferentemente de 10 a 25 mM.

En las formulaciones de la presente invención, la concentración (cantidad) de arginina es preferentemente de 5 a 300 mM, más preferentemente de 25 a 200 mM, y aún más preferentemente de 50 a 150 mM.

10 Las formulaciones de la presente invención son soluciones (formulaciones líquidas que contienen anticuerpos). Las formulaciones líquidas de la presente invención también incluyen soluciones antes de la etapa o etapas de liofilización, y las soluciones disueltas. Las formulaciones líquidas de la presente invención se producen preferentemente sin la etapa o etapas de liofilización en la producción. En otro orden de cosas, las formulaciones liofilizadas pueden obtenerse mediante la liofilización de las formulaciones líquidas de la presente invención con el uso de los métodos conocidos por los expertos en la materia.

15 El pH de las formulaciones de la presente invención es preferentemente de 4 a 8, más preferentemente de 5,0 a 7,5, y aún más preferentemente de 5,5 a 6,5.

La viscosidad de las formulaciones líquidas de la presente invención a temperatura ambiente (25 °C) es preferentemente de 30 mPa·s o menos, más preferentemente de 20 mPa·s o menos, y aún más preferentemente de 15 mPa·s o menos.

20 No se observan cambios significativos para las formulaciones líquidas de la presente invención durante al menos 6 meses, preferentemente 12 meses, más preferentemente dos años, incluso más preferentemente tres años, a la temperatura de refrigeración (de 2 °C a 8 °C), o durante al menos seis meses, preferentemente un año, y más preferentemente dos años, a temperatura ambiente (de 22 °C a 28 °C). En concreto, la presente invención hace referencia a formulaciones líquidas que son estables durante al menos seis meses de 22 °C a 28 °C.

25 Las formulaciones líquidas de la presente invención pueden congelarse y almacenarse a una temperatura en el intervalo de -30 °C a -10 °C.

30 Las formulaciones de la presente invención podrían contener adicionalmente tensioactivos. Como se usa en la presente invención, los tensioactivos preferidos incluyen ésteres de ácidos grasos con polioxietileno sorbitán y éteres alquílicos de polioxipropilenoalquilo polioxietileno, y los tensioactivos más preferidos incluyen polisorbatos 20 y 80, y Pluronic F-68 (poloxámero 188). Los tensioactivos pueden añadirse a las formulaciones de la presente invención en general del 0,0001 % al 10 % (p/v), preferentemente del 0,001 % al 5 %, y más preferentemente del 0,005 % al 3 %.

Las formulaciones de la presente invención podrían además contener aminoácidos. Como se usa en la presente invención, los aminoácidos preferidos incluyen los aminoácidos naturales y los derivados de aminoácidos, y los aminoácidos particularmente preferidos incluyen la L-metionina y la L-prolina.

35 Las formulaciones de la presente invención podrían además contener azúcares. Los azúcares preferidos que se usan en la presente invención incluyen sacarosa, trehalosa, meglumina y sorbitol.

La cantidad de aminoácido o de azúcar que se puede añadir a las formulaciones de la presente invención es por lo general de 1 a 1000 mM, preferentemente de 5 a 500 mM, y más preferentemente de 10 a 300 mM.

40 Las formulaciones de la presente invención podrían además contener sales inorgánicas. Las sales inorgánicas preferidas que se usan en la presente invención incluyen sales de magnesio y sales de calcio.

Las formulaciones de la presente invención están sustancialmente constituidas por los ingredientes de A a D a continuación.

45 (A) anticuerpo contra el receptor de IL-6;
 (B) tampón de histidina-aspartato;
 (C) arginina (que incluye arginina-aspartato), aminoácidos diferentes a la arginina, y/o azúcares según se necesite; y
 (D) tensioactivos.

50 "Sustancialmente constituido" significa que la concentración de los aditivos optativos que se describen más adelante, que son ingredientes diferentes a los ingredientes que se añaden por lo general a las formulaciones, son de 5 mM o menos, preferentemente de 2 mM o menos, y más preferentemente 1 mM o menos. Tales aditivos optativos incluyen crioprotectores, agentes de suspensión, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, conservantes, inhibidores de la adsorción, diluyentes, excipientes, ajustadores del pH, analgésicos, reductores que contienen azufre y antioxidantes.

Adicionalmente, se prefiere que las formulaciones de la presente invención no contengan aniones diferentes al ácido aspártico, a modo de contraiones para el tampón o para el estabilizante. En una realización, tales formulaciones incluyen, por ejemplo, las que no contienen sustancialmente ion cloruro ni ion acetato. "No contiene sustancialmente ion cloruro ni ion acetato" significa que la concentración de ion cloruro y de ion acetato es, por ejemplo, de 5 mM o menos, preferentemente de 2 mM o menos, y más preferentemente de 1 mM o menos. Pueden producirse formulaciones que contienen anticuerpos muy estables sin aumentar la presión osmótica, como resultado del uso de ácido aspártico y ácido glutámico, que tienen un mayor efecto estabilizante, a modo de contraiones y que no incluyen sustancialmente ion cloruro ni ion acetato con menor efecto de estabilización.

Si se necesita, las formulaciones de la presente invención podrían además contener los adecuados crioprotectores, agentes de suspensión, agentes solubilizantes, agentes de isotonicidad, conservantes, inhibidores de la adsorción, diluyentes, excipientes, ajustadores del pH, analgésicos, reductores que contienen azufre, antioxidantes y similares.

Los crioprotectores incluyen, por ejemplo, azúcares tales como trehalosa, sacarosa y sorbitol.

Los agentes solubilizantes incluyen, por ejemplo, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno, polisorbato 80, nicotinamida, monolaurato de polioxietilensorbitano, macrogol y éster etílico de ácidos grasos de aceite de ricino.

Los agentes de isotonicidad incluyen, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio.

Los conservantes incluyen, por ejemplo, parahidroxibenzoato de metilo, parahidroxibenzoato de etilo, ácido sórbico, fenol, cresol y clorocresol.

Los inhibidores de la adsorción incluyen, por ejemplo, seroalbúmina humana, lecitina, dextrano, copolímero de óxido de etileno/óxido de propileno, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno, y polietilenglicol.

Los agentes reductores que contienen azufre incluyen, por ejemplo, los que contienen grupos sulfhidrilo, tales como N-acetilcisteína, N-acetilhomocisteína, ácido tióctico, tioglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico y sales del mismo, tiosulfato de sodio, glutatión y ácidos tioalcanoicos que tienen de uno a siete átomos de carbono.

Los antioxidantes incluyen, por ejemplo, ácido eritóbico, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, α -tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico y sales del mismo, palmitato de ácido L-ascórbico, estearato de ácido L-ascórbico, hidrogenosulfito de sodio, sulfito de sodio, galato de triamilol, galato de propilo, y agentes quelantes, tales como etilendiaminatetraacetato de disodio (EDTA), pirofosfato de sodio y metafosfato de sodio.

Las formulaciones de la presente invención se podrían administrar por vía oral o parenteral. En general, las formulaciones se administran por vía parenteral, en concreto por inyección, administración transdérmica, administración transmucosa, administración nasal, administración pulmonar o similares. La inyección incluye, por ejemplo, las administraciones sistémicas y locales mediante inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular o similares. El volumen de inyección está limitado en la inyección subcutánea; sin embargo, una única dosis de anticuerpo podría ser de una gran cantidad (de aproximadamente 100 a 200 mg). Por lo tanto, las formulaciones de la presente invención son particularmente idóneas para la administración subcutánea (inyección).

En términos de dolor, se prefiere que la relación de la presión osmótica del agente tamponante sea próxima a 1,0 isotónica en las formulaciones para la administración subcutánea. Por lo tanto, la relación de la presión osmótica de las formulaciones líquidas de la presente invención es preferentemente de aproximadamente 1. Arginina, azúcares y similares se añaden para mejorar la estabilidad de las formulaciones durante la conservación. Sin embargo, cuando la presión osmótica es mayor que el nivel isotónico, podría provocar dolor por administración subcutánea. Por lo tanto, se prefiere añadir tales estabilizantes con vistas a la presión osmótica.

[Ejemplos]

A continuación en el presente documento, la presente invención se describe específicamente con referencia a los Ejemplos, pero no debe considerarse que el alcance de la presente invención esté limitado por estos.

[Ejemplo 1] Valoración del efecto de estabilización que tiene el contraión usando el Acm1 y el Acm2

El Acm1 (cadena H/SEQ ID NO: 1; cadena L/SEQ ID NO: 2) y el Acm2 (cadena H/SEQ ID NO: 3; cadena L/SEQ ID NO: 4; tocilizumab), que se describen como un anticuerpo contra el receptor de IL-6 en el documento WO 2009/041621, se expresaron mediante un método conocido por los expertos en la materia que usa una línea de células CHO de expresión estable y a continuación se purificaron a alta pureza mediante un método conocido por los expertos en la materia usando la proteína A. Los Acm1 y Acm2 purificados se usaron en el estudio de estabilidad que se describe en los Ejemplos a continuación.

La estabilidad de dos tipos de formulaciones, que contienen histidina-cloruro o histidina-acetato, se valoró por congelación y descongelación, o por almacenamiento a 40 °C con el Acm1 y el Acm2. Las formulaciones de Acm1 y de Acm2 se prepararon mediante diálisis durante una noche contra cada solución formulada (Tabla 1), seguido de la

concentración de las soluciones. Las concentraciones finales del Acm1 y del Acm2 se ajustaron a 37 mg/ml. El estudio de congelación y descongelación se realizó mediante diez ciclos de congelación y descongelación lenta (congelación a -20 °C seguida de la descongelación a temperatura ambiente) y a continuación diez ciclos de congelación y descongelación rápida (congelación a -20 °C seguida de la descongelación en un baño de agua caliente (37 °C)). La cantidad de agregado en cada formulación después de la congelación y descongelación, o del almacenamiento a 40 °C se calculó mediante el método del porcentaje del área usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por sus siglas en inglés). Un aumento de los agregados (%) sugiere la reducción de la estabilidad del Acm1 y del Acm2. Por lo tanto, el aumento en la cantidad de agregado se usó como indicador para comparar la estabilidad entre las correspondientes formulaciones.

10 Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Se realizó la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para analizar la cantidad de agregados y los productos de degradación de masa molecular baja en cada formulación. Cada formulación se diluyó a aproximadamente 0,4-2,0 mg/ml con la fase móvil que se describe más adelante y, a continuación, se analizó con una columna G3000SW_{XL} (Tosoh Co.) a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min con una fase móvil de tampón de fosfato a 50 mM (pH 7,0) que contenía NaCl a 300 mM (longitud de onda de la detección: 220 nm). El pico de elución que apareció antes que el pico del monómero se consideró que eran los agregados, y el pico de elución que apareció después del pico del monómero, pero antes que el pico procedente del tampón, se consideró que eran los productos de degradación de masa molecular baja. Se calculó el correspondiente contenido (%) mediante el método del porcentaje del área.

20 Tabla 1

Lista de formulaciones			
N.º	Tampón	Estabilizante	pH
1	Histidina-cloruro 20 mM	NaCl 150 mM	6,0
2	Histidina-acetato 20 mM		

Los resultados del estudio de estabilidad de los dos tipos de formulaciones que contienen histidina-cloruro o histidina-acetato con el Acm1 y el Acm2 se muestran en las Figuras 1 a 3. Los resultados demostraban que el Acm1 era ligeramente más estable en histidina-cloruro que en histidina-acetato durante la conservación como líquido y la congelación y descongelación. El resultado del almacenamiento como líquido demostró que el Acm2 era aproximadamente dos veces más estable en histidina-cloruro que en histidina-acetato.

25

[Ejemplo 2] Valoración del efecto de estabilización del contraión usando el Acm1 (1)

Por lo general, se ha usado el ácido clorhídrico a modo de contraión para la histidina y para la arginina. Según un informe anterior (PCT/US2005/037471), los resultados de la valoración del ácido acético, del ácido fosfórico y del ácido sulfúrico como contraiones para la histidina demostraron que el ácido acético tiene un mejor efecto estabilizante cuando se usa a modo de contraión para la histidina. No obstante, tal y como se describe en el Ejemplo 1 anterior, la presente invención demostró que el ácido clorhídrico era ligeramente mejor que el ácido acético a modo de contraión para la histidina cuando se usaba para el Acm1 y el Acm2. El ácido clorhídrico es un contraión habitual, mientras que el ácido clorhídrico se ha informado que tiene una tendencia a corroer el acero inoxidable que se suele usar en los contenedores (Dent. Mater. 17: 409-414 (2001); J. Pharm. Sci. 86: 1250-1255 (1997)). Aparte, se ha informado que el pH tiende a alterarse en ácido acético debido a su volatilidad (Injectable Drug Development, Autores: Pramod K. Gupta (Editor), Gayle A. Brazeau, Gayle A).

30

Por lo tanto, en este Ejemplo, los presentes inventores buscaron contraiones no volátiles que no sean corrosivos para el acero inoxidable y que tengan un mejor efecto de estabilización que el ácido acético y que el ácido clorhídrico a modo de contraión en el tampón para el Acm1 y el Acm2. Los presentes inventores valoraron especies aniónicas diferentes de ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico y ácido sulfúrico previamente descritos en el documento PCT/US2005/037471. Específicamente, el ácido aspártico y el ácido glutámico, los cuales son aminoácidos, se valoraron a modo de contraión. Como se describe en el Ejemplo 1, se demostró que histidina-cloruro tiene un mejor efecto de estabilización que histidina-acetato, tanto con el Acm1 como con el Acm2, por lo que el efecto de estabilización que tiene el contraión se comparó con el del ácido clorhídrico. Específicamente, de acuerdo con las tres formulaciones mostradas en la Tabla 2, el efecto del ácido clorhídrico, del ácido aspártico y del ácido glutámico sobre la estabilidad se valoró a modo de contraión para la histidina como tampón o para la arginina como estabilizante usando Acm1.

40

Cada formulación se preparó con el mismo método que se describe en el Ejemplo 1. El Acm 1 se dializó contra la solución de cada formulación (Tabla 2) durante una noche. A continuación, se concentró cada solución y la concentración final del Acm1 se ajustó a 200 mg/ml. El estudio de congelación y descongelación se realizó llevando a cabo diez ciclos de congelación y descongelación lenta (congelación a -20 °C seguida de la descongelación a

50

temperatura ambiente). El método para preparar cada solución formulada se describe más adelante. La muestra de la formulación n.º 3 se preparó del siguiente modo: se disolvieron L-histidina y L-arginina en agua MilliQ a 20 mM y 50 mM, respectivamente, y las soluciones se llevaron a pH 6 con ácido clorhídrico 1 N. Las muestras de las formulaciones n.º 4 y 5 se prepararon del siguiente modo: se disolvieron L-histidina, L-arginina y ácido L-aspartico o ácido L-glutámico en agua MilliQ a 20 mM, 50 mM y 60 mM, respectivamente, y, a continuación, las soluciones se llevaron a pH 6 con una solución de ácido L-aspartico o ácido L-glutámico 30 a 40 mM. La cantidad de agregado en cada muestra después de la congelación y la descongelación, o del almacenamiento a -20 °C, 25 °C y 5 °C, se calculó con el método del porcentaje del área mediante la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Tabla 2

Lista de formulaciones			
N.º	Tampón	Estabilizante	pH
3	Histidina-cloruro 20 mM	Arg-cloruro 50 mM	6,0
4	Histidina-aspartato 20 mM	Arg-aspartato a 50 mM	
5	Histidina-glutamato 20 mM	Arg-glutamato a 50 mM	

El aumento de la cantidad (%) de agregado para cada formulación durante la congelación y descongelación, o durante el almacenamiento a -20 °C, 25 °C y 5 °C, se muestra en las Figuras 4 a 7. El aumento de la cantidad (%) de agregados durante la conservación a 5 °C y 25 °C demostró que la estabilidad mejoró en el orden de: ácido glutámico = ácido aspártico > ácido clorhídrico a modo de contraión para la histidina y para la arginina. Por lo tanto, se demostró que la estabilidad del Acm1 mejoraba con el ácido aspártico o con el ácido glutámico a modo de contraión, en lugar del ácido clorhídrico. Se observó la misma tendencia en la congelación y descongelación, y en el almacenamiento en congelación. El aumento de la cantidad (%) de agregados durante la conservación a -20 °C durante tres meses con la formulación de ácido glutámico, la formulación de ácido aspártico o la formulación de ácido clorhídrico fue de aproximadamente el 0,8 %, el 1,2 % o el 3,0 %, respectivamente. Por lo tanto, el efecto de estabilización del ácido glutámico era ligeramente más fuerte que el del ácido aspártico.

Los Ejemplos 1 y 2 demostraron que, cuando se usaban a modo de contraión, el ácido glutámico y el ácido aspártico tienen un mejor efecto estabilizante del Acm1 que el ácido clorhídrico y que el ácido acético. No hay ningún informe que demuestre que el ácido glutámico y el ácido aspártico sean volátiles ni corrosivos para el acero inoxidable. Por lo tanto, se ha hallado que el ácido glutámico y el ácido aspártico son prometedores a modo de contraión para el Acm1. Específicamente, histidina-glutamato e histidina-aspartato son mejores como tampón que histidina-cloruro e histidina-acetato, y que arginina-glutamato y arginina-aspartato son mejores como estabilizantes que arginina-cloruro y arginina-acetato.

[Ejemplo 3] Valoración del efecto de estabilización que tiene el contraión usando Acm2 (1)

Como se describe en el Ejemplo 1, se descubrió que el Acm2 era más estable en el tampón de histidina-cloruro que en el tampón de histidina-acetato (como el Acm1, Figura 2). Adicionalmente, como se describe en el Ejemplo 2, la estabilidad en las condiciones de líquido y en congelación del Acm1 mejoró significativamente cuando se usó ácido aspártico o ácido glutámico en vez de ácido clorhídrico a modo de contraión para la histidina y para la arginina. En particular, la estabilidad en las condiciones de congelación del Acm1 mejoró enormemente (hasta aproximadamente el triple) cuando se usó el ácido glutámico en vez del ácido clorhídrico a modo de contraión para la histidina y para la arginina. En este contexto, el ácido glutámico y el ácido clorhídrico se valoraron a modo de contraión para la histidina por su capacidad para estabilizar el Acm2 durante la congelación y la descongelación. Las formulaciones que contienen arginina que tienen efecto de estabilización alto también se valoraron al mismo tiempo, y se usaron como control para comparar el efecto de estabilización observado cuando se usó el ácido glutámico a modo de contraión para la histidina.

Cada formulación se preparó con el mismo método que se describe en el Ejemplo 1. El Acm2 se dializó durante una noche contra cada solución formulada (Tabla 3). A continuación, cada solución se concentró y la concentración final del Acm2 se ajustó a aproximadamente de 40 a 230 mg/ml. El método para preparar cada solución formulada se describe a continuación. Las muestras de las formulaciones n.º 6 y 8 se prepararon del siguiente modo: se disolvieron L-histidina y L-arginina (formulación n.º 8 sola) en agua MilliQ a 50 mM, y las soluciones se llevaron a pH 6 con ácido clorhídrico 1 N. La muestra de la formulación n.º 7 se preparó del siguiente modo: se disolvieron L-histidina y ácido L-glutámico en agua MilliQ a 50 mM y 25 mM, respectivamente, y, a continuación, la solución se llevó a pH 6 con una solución de ácido L-glutámico de 30 a 40 mM. La concentración del Acm2 en cada formulación después de la preparación de la muestra se muestra en la Tabla 4. El estudio de congelación y descongelación se realizó con diez ciclos de congelación a -20 °C seguido de la descongelación a temperatura ambiente (congelación y descongelación lenta). Después de la congelación y descongelación lenta, la cantidad de agregados en cada formulación se calculó con el método del porcentaje del área mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Tabla 3

Lista de formulaciones			
N.º	Tampón	Estabilizante	pH
6	Histidina-cloruro 50 mM		6,0
7	Histidina-glutamato 50 mM		
8	Histidina-cloruro 50 mM	Arginina-cloruro 50 mM	

Tabla 4

Resultado de la medición: Lista de concentraciones del Acm2 en la solución de cada formulación					
N.º	Tampón	Estabilizante	pH	Concentración del Acm2 (mg/ml)	
6A	Histidina-cloruro 50 mM		6,0	47	
6B				70	
6C				97	
6D				122	
6E				143	
6F				164	
6G				186	
6H				229	
7A	Histidina-glutamato 50 mM			46	
7B				72	
7C				97	
7D				119	
7E				144	
7F				165	
7G				196	
8A	Histidina-cloruro 50 mM			Arginina-cloruro 50 mM	44
8B					68
8C					94
8D					120
8E					144
8F					168
8G					192

5 El aumento de la cantidad (%) de agregados para cada formulación en el estudio de congelación y descongelación se muestra en la Figura 8. Los resultados demostraron que, con el uso del ácido glutámico en vez del ácido clorhídrico a modo de contraión para la histidina, la estabilidad del Acm2 mejoraba a aproximadamente el doble. Además, el efecto de estabilización del ácido glutámico era comparable al de arginina-cloruro a 50 mM, que es un
10 estabilizante convencional. Por lo tanto, el ácido glutámico por sí solo demostró ejercer un efecto de estabilización alto a modo de contraión.

En otro orden de cosas, se cree que la relación de la presión osmótica del tampón es preferentemente cercana a 1,0, isotónica, en las formulaciones para la administración subcutánea debido al dolor de la inyección. La estabilidad durante la congelación y descongelación era comparable entre histidina-cloruro a 50 mM/arginina-cloruro a 50 mM e histidina-glutamato a 50 mM. La presión osmótica del tampón en el último era de aproximadamente 100 mOsm más
15 bajo que en el primero. Por lo tanto, como está descrito anteriormente, cuando mejora la estabilidad con el uso de ácido aspártico o ácido glutámico a modo de contraión, la estabilidad puede mejorar sola sin aumentar la presión

osmótica. Eso puede ser una gran ventaja para el desarrollo de formulaciones para la administración subcutánea.

En otro orden de cosas, se añaden arginina, azúcares y similares para mejorar la estabilidad de las formulaciones durante la conservación. Sin embargo, cuando la presión osmótica es mayor que el nivel isotónico, puede provocar dolor durante la inyección por administración subcutánea. Por lo tanto, deben añadirse tales estabilizantes al tener en cuenta la presión osmótica (Injectable Drug Development, Autores: Pramod K. Gupta (Editor), Gayle A. Brazeau, Gayle A. Challenges in the development of high protein concentration formulations, J. Pharm. Sci. 2004, 93 (6), 1390-1402). Cuando el ácido clorhídrico o el ácido acético se añaden a modo de contraión para la histidina o la arginina, ni el ácido clorhídrico ni el ácido acético tienen el efecto de estabilizar el Acm 1. Por lo tanto, el ácido clorhídrico y el ácido acético solo producen el efecto de aumentar la presión osmótica. Por consiguiente, desde el punto de vista de la presión osmótica, se debería disminuir al mínimo en las formulaciones la concentración de las especies de iones que no tienen el efecto de estabilización. En concreto, también desde el punto de vista de la presión osmótica, se prefiere la ausencia de ácido clorhídrico y ácido acético. Histidina-glutamato e histidina-aspartato a modo de tampón son mejores que histidina-cloruro e histidina-acetato; y arginina-glutamato y arginina-aspartato son mejores a modo de estabilizante que arginina-cloruro y arginina-acetato.

[Ejemplo 4] Valoración del efecto de estabilización del contraión usando el Acm1 (2)

Como se describe en los Ejemplos 2 y 3, con el uso del ácido glutámico a modo de contraión para la histidina y para la arginina, la estabilidad del Acm1 mejoró significativamente a aproximadamente el doble o el triple, en particular durante el almacenamiento en congelación. En este contexto, se realizó un estudio de la estabilidad de conservación a -20 °C para valorar la estabilidad del Acm1 a una conservación de -20 °C cuando se usaba ácido glutámico a modo de contraión para la histidina y para la arginina, y un azúcar (trehalosa) como estabilizante. También se realizaron al mismo tiempo un estudio de conservación como líquido y un estudio de congelación y descongelación.

Cada formulación se preparó como sigue: el Acm1 se dializó durante una noche contra cada solución formulada (Tabla 5); a continuación, se concentraron las soluciones y la concentración final del Acm1 se ajustó a 200 mg/ml. El método para preparar cada solución formulada se describe a continuación. Se disolvieron L-histidina, L-arginina, ácido L-glutámico y trehalosa en agua MilliQ a 100 mM, 50 mM, 100 mM y 0 a 150 mM, respectivamente, y, a continuación, las soluciones se llevaron a pH 6 con una solución de ácido glutámico de 30 a 40 mM. El estudio de congelación y descongelación se realizó con diez ciclos de congelación a -20 °C seguido de la descongelación a temperatura ambiente (congelación y descongelación lenta). La cantidad de agregados en cada formulación después de la congelación y descongelación, o la conservación a -20 °C y 25 °C, se calculó con el método del porcentaje del área mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Tabla 5

Lista de formulaciones				
N.º	Tampón	Estabilizante	Azúcar	pH
9	Histidina-glutamato 100 mM	Arginina-glutamato 50 mM	-	6,0
10			Trehalosa 50 mM	
11			Trehalosa 100 mM	
12			Trehalosa 150 mM	

El aumento de la cantidad (%) de agregados de cada formulación después del almacenamiento a -20 °C, congelación y descongelación, y almacenamiento a 25 °C se muestra en las Figuras 9 a 11. Al añadir trehalosa 50 mM o más, se obtuvo una formulación en la que el agregado apenas se incrementa durante el almacenamiento a -20 °C y la congelación y descongelación, como se observa de las Figuras 9 a 11. Adicionalmente, el efecto de estabilización dependiente de la concentración que tiene la trehalosa se observó en el almacenamiento como líquido a 25 °C. Como está descrito anteriormente, los presentes inventores descubrieron formulaciones sencillas que consistían solo en aminoácidos y azúcar, que contribuyen a la estabilización durante el almacenamiento como líquido y el almacenamiento en congelación.

[Ejemplo 5] Valoración del efecto de estabilización del contraión usando el Acm2 (2)

Como se describió en el Ejemplo 1, se demostró que el Acm2 estaba más estabilizado con histidina-cloruro que con histidina-acetato, al igual que el Acm1 (Figura 2). Adicionalmente, como se describe en el Ejemplo 2, la estabilidad del Acm1 en las condiciones de líquido y de congelación mejoró significativamente cuando se usó el ácido aspártico o el ácido glutámico en vez del ácido clorhídrico a modo de contraión para la histidina y para la arginina. En este contexto, la estabilidad del Acm2 durante el almacenamiento como líquido (25 °C) se usó para valorar el ácido clorhídrico y el ácido glutámico a modo de contraión para la histidina. También se valoraron al mismo tiempo las formulaciones con arginina que tienen un efecto de estabilización alto y se usaron como control para comparar el efecto de estabilización observado cuando se usa el ácido glutámico a modo de contraión para la histidina.

5 Cada formulación se preparó por el mismo método que está descrito en el Ejemplo 1. El Acm2 se dializó durante una noche contra cada solución formulada (Tabla 3). A continuación, las soluciones se concentraron y la concentración final del Acm2 se ajustó a aproximadamente de 40 a 230 mg/ml. El método para preparar las soluciones formuladas fue el mismo que se describe en el Ejemplo 3. La concentración del Acm2 en cada formulación después de la preparación de la muestra se muestra en la Tabla 4. La cantidad de agregado en cada formulación durante de dos a cuatro semanas de conservación a 25 °C se calculó con el método del porcentaje del área mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

10 El aumento de la cantidad (%) de agregados para cada formulación después de la conservación a 25 °C se muestra en la Figura 12. Los resultados demostraron que, a diferencia de lo que ocurre en el estudio de congelación y descongelación, la estabilidad del Acm2 no se alteró ni siquiera cuando se usó ácido glutámico en vez de ácido clorhídrico a modo de contraión para la histidina. El pI del Acm1 y del Acm2 es de 5,8 y 9,3, respectivamente. Esto sugiere que era significativo el efecto de estabilización que tiene el contraión con un pI bajo sobre el almacenamiento como líquido.

[Ejemplo 6] Valoración del efecto de estabilización del contraión usando Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5

15 El Acm3 es un anticuerpo biespecífico contra el factor IX y contra el factor X, y tiene una región constante procedente de IgG4. Además, su valor de pI ha disminuido a 6,8 por alteración de la secuencia de aminoácidos.

El Acm4 es un anticuerpo humanizado anti-NR10 (anticuerpo NS22 completamente humanizado y preparado según el método descrito en el Ejemplo 12 del documento WO 2009/072604) y su clase de anticuerpo es la IgG2. Su valor de pI ha disminuido a 5,6 por alteración de la secuencia de aminoácidos.

20 El Acm5 es un anticuerpo humanizado contra el glicoproteína 3 (se humanizó mediante el método descrito en el Ejemplo 24 del documento WO 2006/006693 y su cadena ligera se alteró mediante el método del Ejemplo 25). Su clase de anticuerpo es la IgG1.

25 Tal y como se describe en los Ejemplos 2 y 3, se demostró que la estabilidad del Acm1 y del Acm2 en las condiciones de líquido y en congelación mejoraba significativamente cuando se usaba ácido aspártico o ácido glutámico, en vez de ácido clorhídrico, a modo de contraión para la histidina y para la arginina. A continuación, Acm1 y Acm2, así como Acm3, Acm4 y Acm5, que son anticuerpos modificados para su punto isoeléctrico sea de 5 a 8, se usaron para valorar la estabilidad en solución y la estabilidad tras congelación y descongelación cuando se usa ácido clorhídrico y ácido aspártico a modo de contraión para la histidina y para la arginina. Los pI de Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5 se muestran en la Tabla 6 a continuación.

30 Tabla 6

Muestra	Acm1	Acm2	Acm3	Acm4	Acm5
pI	5,8	9,4	6,8	5,6	9,0

35 Las muestras se prepararon del siguiente modo: Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5 se dializaron contra cada tampón de diálisis (Tabla 7) durante una noche. A continuación, se concentró cada solución de anticuerpo y se les añadió un tampón concentrado para cada formulación (Tabla 8) de tal modo que la concentración final del anticuerpo se ajustó de aproximadamente 100 a 190 mg/ml. Una lista de las soluciones formuladas que se prepararon como está descrito anteriormente se muestra en la Tabla 9. Para cada formulación, se llevó a cabo un estudio de almacenamiento como líquido a 25 °C y un estudio de congelación y descongelación. El estudio de congelación y descongelación se llevó a cabo en diez ciclos de congelación a -20 °C seguidos de la descongelación a 25 °C (congelación y descongelación lenta). Después de la congelación y descongelación lenta, se calculó la cantidad de agregados en cada muestra con el método del porcentaje del área mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Tabla 7

N.º	Muestra	Tampón de diálisis	pH
13	Acm3	Agua	6,0
14	Acm3		
15	Acm4	Histidina-cloruro 50 mM	
16	Acm4	Histidina-aspartato 50 mM	
17	Acm2	Histidina-cloruro 20 mM	

ES 2 985 395 T3

(continuación)

N.º	Muestra	Tampón de diálisis	pH
18	Acm2		
19	Acm1		
20	Acm1		
21	Acm3	Agua	
22	Acm3		
23	Acm5	Histidina-cloruro 20 mM	
24	Acm5		

Tabla 8

N.º	Muestra	Tampón concentrado	pH
13	Acm3	Histidina-cloruro 500 mM	6,0
14	Acm3	Histidina-aspartato 500 mM	
15	Acm4	Histidina-cloruro 50 mM	
16	Acm4	Histidina-aspartato 50 mM	
17	Acm2	Histidina-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 500 mM	
18	Acm2	Histidina-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 500 mM	
19	Acm1	Histidina-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 500 mM	
20	Acm1	Histidina-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 500 mM	
21	Acm3	Histidina-cloruro 200 mM, arginina-cloruro 500 mM	
22	Acm3	Histidina-cloruro 200 mM, arginina-aspartato 500 mM	
23	Acm5	Histidina-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 500 mM	
24	Acm5	Histidina-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 500 mM	

Tabla 9

N.º	Muestra	Formulación	pH	Concentración del Acm (mg/ml)
13	Acm3	Histidina-cloruro 50 mM	6,0	100
14	Acm3	Histidina-aspartato 50 mM		
15	Acm4	Histidina-cloruro 50 mM		
16	Acm4	Histidina-aspartato 50 mM		
17	Acm2	Histidina-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 50 mM		190
18	Acm2	Histidina-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 50 mM		
19	Acm1	Histidina-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 50 mM		
20	Acm1	Histidina-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 50 mM		
21	Acm3	Histidina-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 50 mM		110
22	Acm3	Histidina-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 50 mM		
23	Acm5	Histidina-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 50 mM		
24	Acm5	Histidina-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 50 mM		
				120

5 El resultado sobre el aumento de la cantidad (%) de agregados en cada formulación después de la congelación y descongelación o del almacenamiento como líquido a 25 °C se muestra en las Figuras 13 a 20. La comparación del aumento de la cantidad de agregados durante el almacenamiento como líquido a 25 °C demostró que la estabilidad era comparable entre la formulación de histidina-aspartato y la formulación de histidina-cloruro, y entre la formulación de arginina-aspartato y la formulación de arginina-cloruro (Figuras 13, 15, 17 y 19).

10 En otro orden de cosas, la comparación del aumento de la cantidad de agregados después de la congelación y descongelación reveló que la estabilidad con la formulación de histidina-aspartato era dos o más veces mayor que con la formulación de histidina-cloruro, y la estabilidad con la formulación de arginina-aspartato era mayor que con la formulación de arginina-cloruro (Figuras 14, 16, 18 y 20). Por lo tanto, la estabilidad del anticuerpo en la condición en congelación se demostró que estaba mejorada significativamente con el uso de ácido aspártico en vez de ácido clorhídrico a modo de contraión para la histidina o para la arginina.

[Ejemplo 7] Valoración del efecto de estabilización del contraión usando Acm 1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5

15 Como se describe en los ejemplos 2, 3 y 6, se demostró que la estabilidad del anticuerpo en las condiciones de líquido y en congelación se mejoraba significativamente cuando se usaba ácido aspártico o ácido glutámico en vez de ácido clorhídrico a modo de contraión en la formulación de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) y se valoró la estabilidad de la conservación como líquido y la estabilidad tras congelación y descongelación con Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5.

20 Las muestras se prepararon del siguiente modo: Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5 se dializaron contra cada tampón de diálisis (Tabla 10) durante una noche. A continuación, se concentró cada solución de anticuerpo y se les añadió un tampón concentrado para cada formulación (Tabla 11) de tal modo que la concentración final del anticuerpo quedaba ajustada de aproximadamente 100 a 110 mg/ml. En la tabla 12 se muestra una lista de las soluciones formuladas preparadas como está descrito anteriormente. Para cada solución formulada, se llevó a cabo un estudio de almacenamiento a 25 °C y un estudio de congelación y descongelación. El estudio de congelación y descongelación se llevó a cabo en diez ciclos de congelación a -20 °C seguidos de la descongelación a 25 °C (congelación y descongelación lenta). Después de la congelación y descongelación lenta, se calculó la cantidad de agregados en cada muestra con el método de porcentaje del área mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaños (SEC).

Tabla 10

N.º	Muestra	Tampón de diálisis	pH
25	Acm1	Tris-cloruro 20 mM	6,5
26	Acm1	Tris-aspartato 20 mM	
27	Acm2	Tris-cloruro 20 mM	
28	Acm2	Tris-aspartato 20 mM	
29	Acm3	Agua	
30	Acm3	Agua	
31	Acm4	Tris-cloruro 20 mM	
32	Acm4	Tris-aspartato 20 mM	
33	Acm5	Tris-cloruro 20 mM	
34	Acm5	Tris-aspartato 20 mM	

Tabla 11

N.º	Muestra	Tampón concentrado	pH
25	Acm1	Tris-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 500 mM	6,5
26	Acm1	Tris-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 500 mM	
27	Acm2	Tris-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 500 mM	
28	Acm2	Tris-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 500 mM	
29	Acm3	Tris-cloruro 200 mM, arginina-cloruro 500 mM	

(continuación)

N.º	Muestra	Tampón concentrado	pH
30	Acm3	Tris-cloruro 200 mM, arginina-aspartato 500 mM	
31	Acm4	Tris-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 500 mM	
32	Acm4	Tris-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 500 mM	
33	Acm5	Tris-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 500 mM	
34	Acm5	Tris-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 500 mM	

Tabla 12

N.º	Muestra	Formulación	pH	Concentración del Acm (mg/ml)
25	Acm1	Tris-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 50 mM	6,5	100
26	Acm1	Tris-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 50 mM		
27	Acm2	Tris-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 50 mM		
28	Acm2	Tris-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 50 mM		
29	Acm3	Tris-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 50 mM		
30	Acm3	Tris-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 50 mM		110
31	Acm4	Tris-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 50 mM		
32	Acm4	Tris-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 50 mM		
33	Acm5	Tris-cloruro 20 mM, arginina-cloruro 50 mM		
34	Acm5	Tris-cloruro 20 mM, arginina-aspartato 50 mM		

5 El resultado sobre el aumento de la cantidad (%) de agregados en cada formulación después de la congelación y descongelación o del almacenamiento como líquido a 25 °C se muestra en las Figuras 21 y 22. La comparación del aumento de la cantidad de agregados durante el almacenamiento como líquido a 25 °C demostró que la estabilidad era comparable entre la formulación de Tris-aspartato/arginina-aspartato y Tris-cloruro/arginina-cloruro (Figura 21).

10 En otro orden de cosas, la comparación del aumento de la cantidad de agregados después de la congelación y descongelación reveló que la estabilidad con la formulación de Tris-aspartato/arginina-aspartato era mayor que con la formulación de Tris-cloruro/arginina-cloruro (Figura 22). Por lo tanto, la estabilidad del anticuerpo en la condición en congelación también se demostró que estaba significativamente mejorada con el uso de ácido aspártico en vez de ácido clorhídrico a modo de contraíón en la formulación de Tris.

[Ejemplo 8] Valoración del efecto de estabilización que tiene el contraíón para Tris con Acm1, Acm2 y Acm3

15 Como se describe en el Ejemplo 7, la estabilidad del anticuerpo en la condición en congelación se demostró que estaba significativamente mejorada cuando se usó ácido aspártico en vez de ácido clorhídrico a modo de contraíón en la formulación de Tris. A continuación, el ácido clorhídrico y el ácido aspártico se usaron a modo de contraíones para Tris y se valoró la estabilidad de conservación como líquido y la estabilidad tras congelación y descongelación con Acm1, Acm2 y Acm3.

20 Las muestras se prepararon del siguiente modo: Acm1, Acm2 y Acm3 se dializaron contra cada tampón de diálisis (Tabla 13) durante una noche. A continuación, cada solución de anticuerpo se concentró a 100 mg/ml o a una concentración más elevada y se le añadió cada dializado de tal modo que la concentración final de anticuerpo quedaba ajustada a aproximadamente 100 mg/ml. En la Tabla 14 se muestra una lista de las soluciones formuladas que se prepararon como está descrito anteriormente. Se llevó a cabo un estudio de conservación a 25 °C y un estudio de congelación y descongelación con cada solución formulada. El estudio de congelación y descongelación se llevó a cabo en diez ciclos de congelación a -20 °C seguidos de la descongelación a 25 °C (congelación y descongelación lenta). Después de la congelación y descongelación lenta, se calculó la cantidad de agregados en cada muestra con el método del porcentaje del área mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

30

Tabla 13

N.º	Muestra	Tampón de diálisis	pH
35	Acm1	Tris-cloruro 50 mM	6,5
36	Acm1	Tris-aspartato 50 mM	
37	Acm2	Tris-cloruro 50 mM	
38	Acm2	Tris-aspartato 50 mM	
39	Acm3	Tris-cloruro 50 mM	
40	Acm3	Tris-aspartato 50 mM	

Tabla 14

N.º	Muestra	Formulación	pH	Concentración del Acm (mg/ml)
35	Acm1	Tris-cloruro 50 mM	6,5	100
36	Acm1	Tris-aspartato 50 mM		
37	Acm2	Tris-cloruro 50 mM		
38	Acm2	Tris-aspartato 50 mM		
39	Acm3	Tris-cloruro 50 mM		
40	Acm3	Tris-aspartato 50 mM		

- 5 El resultado sobre el aumento de la cantidad (%) de agregados después de la congelación y descongelación o de la conservación como líquido a 25 °C en cada formulación se muestra en las Figuras 23 y 24. La comparación del aumento de la cantidad de agregados sobre la base de este resultado demostró que tanto durante la conservación como líquido a 25 °C como durante la congelación y descongelación, la estabilidad con la formulación de Tris-aspartato era mayor que con la formulación de Tris-cloruro, y que la estabilidad durante la congelación y descongelación era, en particular, dos o más veces mayor. Por lo tanto, también se demostró que la estabilidad del anticuerpo se mejoraba significativamente con ácido aspártico en vez de ácido clorhídrico a modo de contraión para Tris cuando se usa como tamponante.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Una formulación líquida que comprende anticuerpos estables que comprende el tampón arginina-aspartato e histidina-aspartato.
- 5 2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la formulación no comprende sustancialmente ni ion cloruro ni ion acetato.
3. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2, en donde la formulación comprende adicionalmente un azúcar.
4. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 10 5. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el anticuerpo se ha modificado para tener un punto isoeléctrico (pI) de 5 a 8.
6. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la concentración del anticuerpo es de 50 mg/ml o más o 100 mg/ml o más.
- 15 7. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde la concentración del anticuerpo es de 50 a 250 mg/ml.
8. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo de la dicha formulación que comprende anticuerpos se selecciona
 - i) del grupo que consiste en anticuerpos contra el factor tisular, anticuerpos contra el receptor de IL-6, anticuerpos contra IL-6, anticuerpos monoclonales contra el antígeno HM1.24, anticuerpos contra el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (anticuerpos anti-PTHrP), anticuerpos contra el glipicano-3, anticuerpos contra el gangliósido GM3, anticuerpos contra el agonista del receptor de TPO, anticuerpos a modo de sustituto funcional del factor de coagulación VIII, anticuerpos contra el receptor de IL31, anticuerpos contra HLA, anticuerpos contra AXL, anticuerpos contra CXCR4, anticuerpos contra NR10 y anticuerpos biespecíficos contra el factor IX y el factor X, particularmente del grupo que consiste en un anticuerpo contra el receptor de IL-6, un anticuerpo biespecífico contra el factor IX y el factor X, un anticuerpo contra NR10 y un anticuerpo contra el glipicano 3; o
 - 20 ii) de a) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 y b) un anticuerpo que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4.
- 25 9. La formulación de acuerdo con la reivindicación 8,
 - i) en donde la viscosidad de la formulación líquida es de 30 mPa·s o menos; o
 - ii) en donde la formulación líquida es estable de 2 °C a 8 °C durante al menos seis meses; o
 - 35 iii) en donde la formulación no se ha sometido a la liofilización durante la preparación de la formulación; o
 - iv) en donde la formulación se conserva en congelación de -30 °C a -10 °C.
10. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la formulación es una formulación liofilizada.
11. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en donde la concentración de histidina es de 5 a 100 mM.
- 40 12. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la concentración de arginina es de 5 a 300 mM.
13. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en donde el anticuerpo es un anticuerpo contra el receptor de IL-6.
- 45 14. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en donde el tampón comprende sustancialmente solo aminoácido o aminoácidos.
15. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, en donde la formulación es para administración subcutánea.

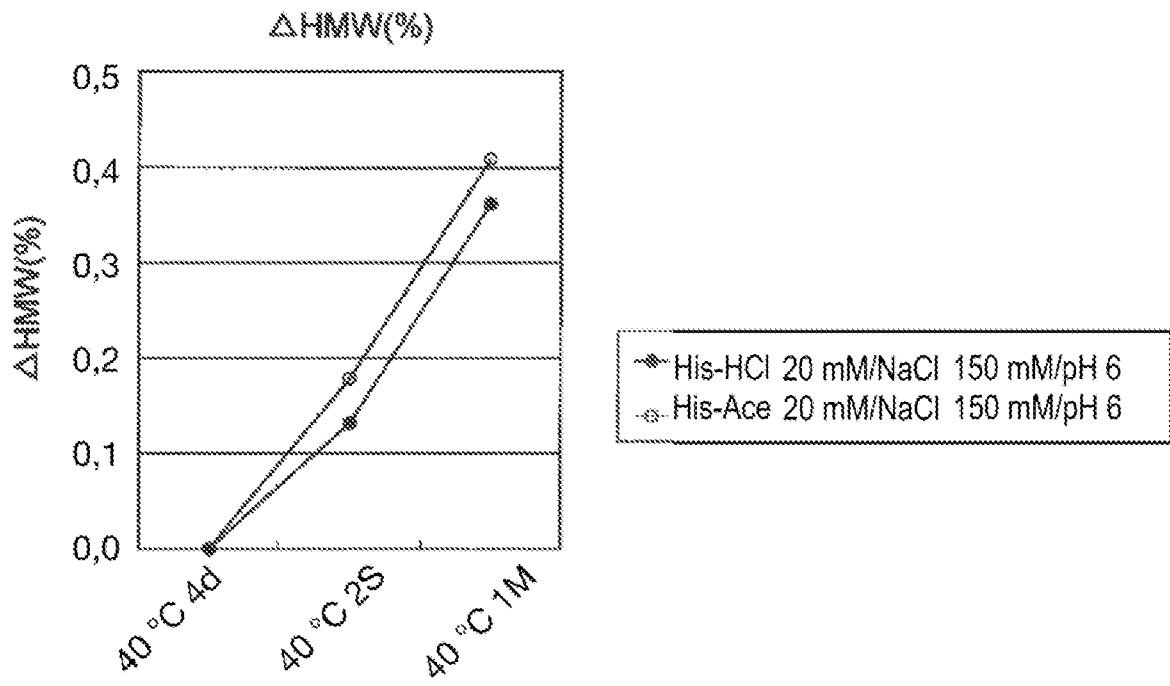


FIG. 1

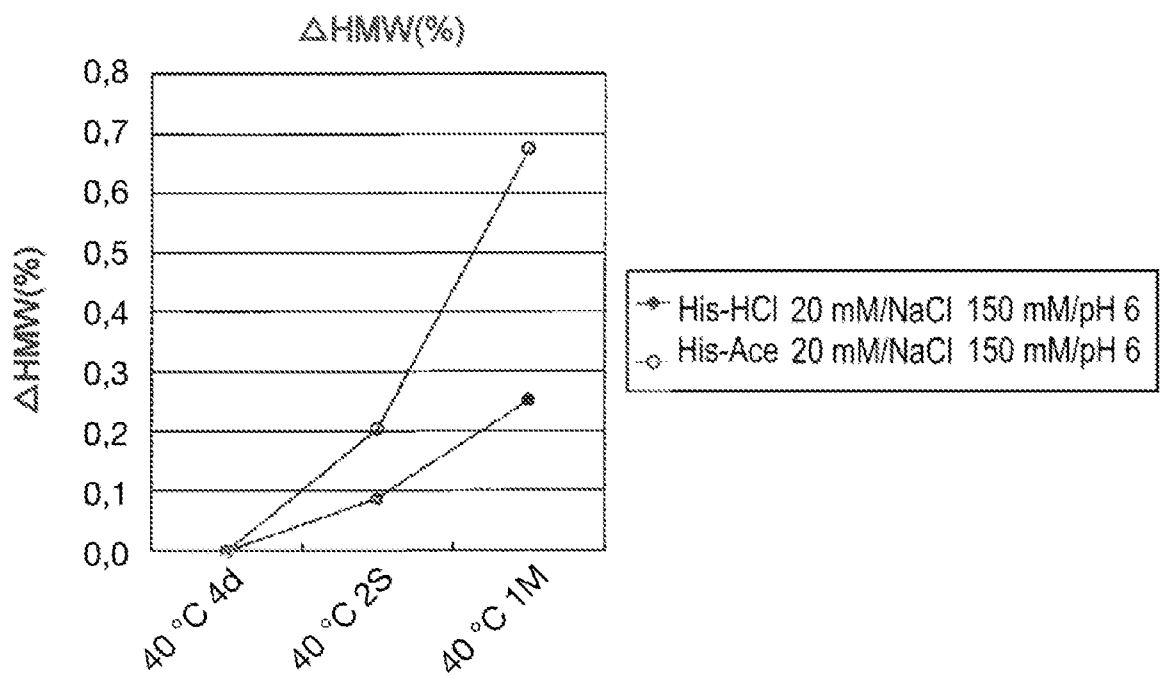


FIG. 2

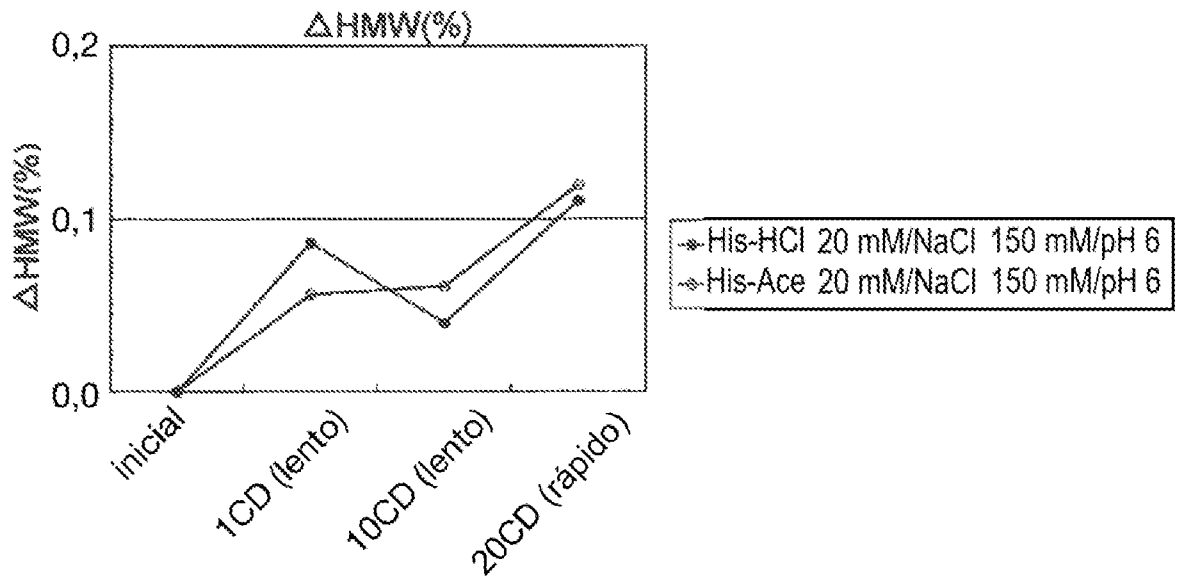


FIG. 3

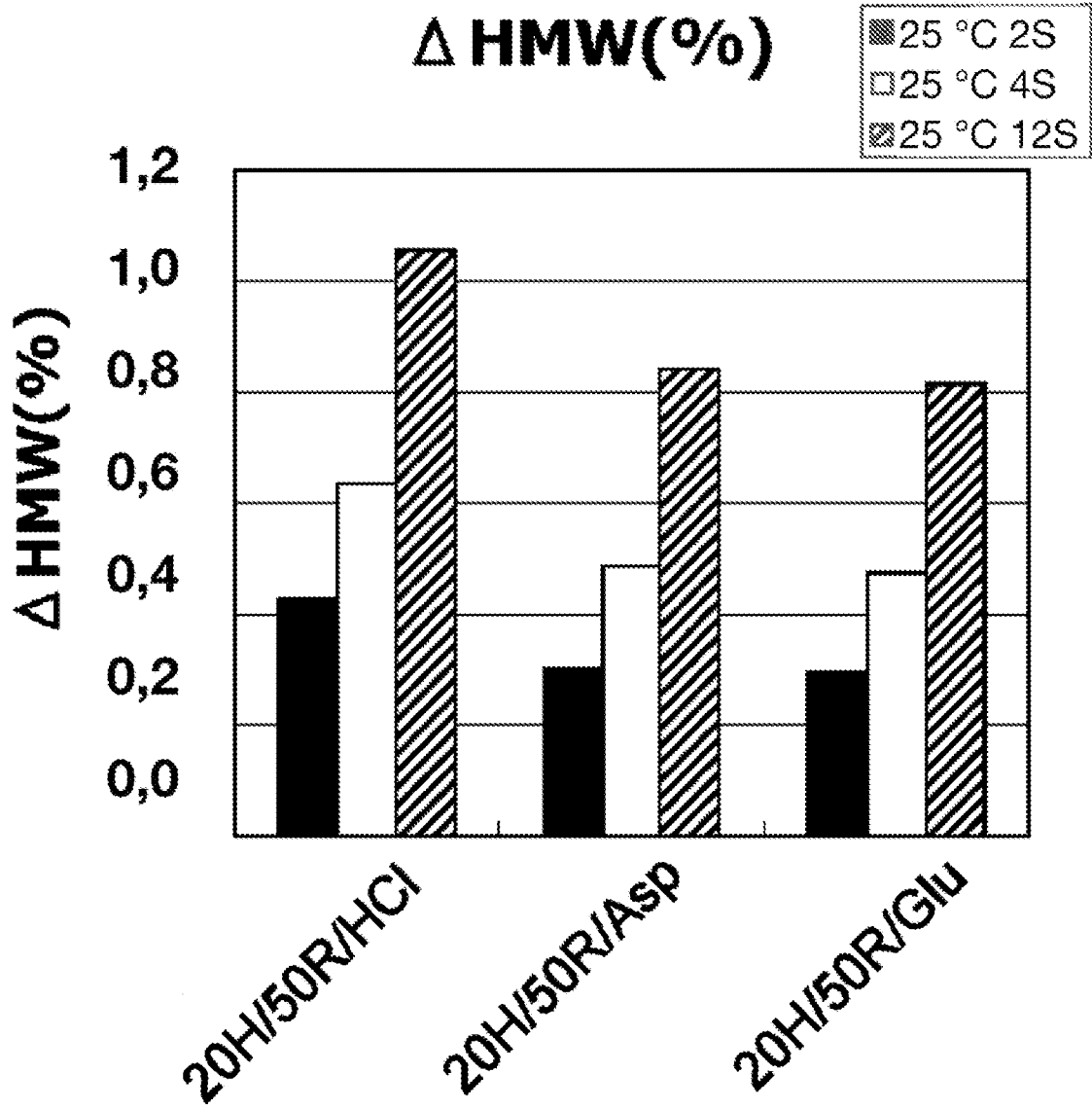


FIG. 4

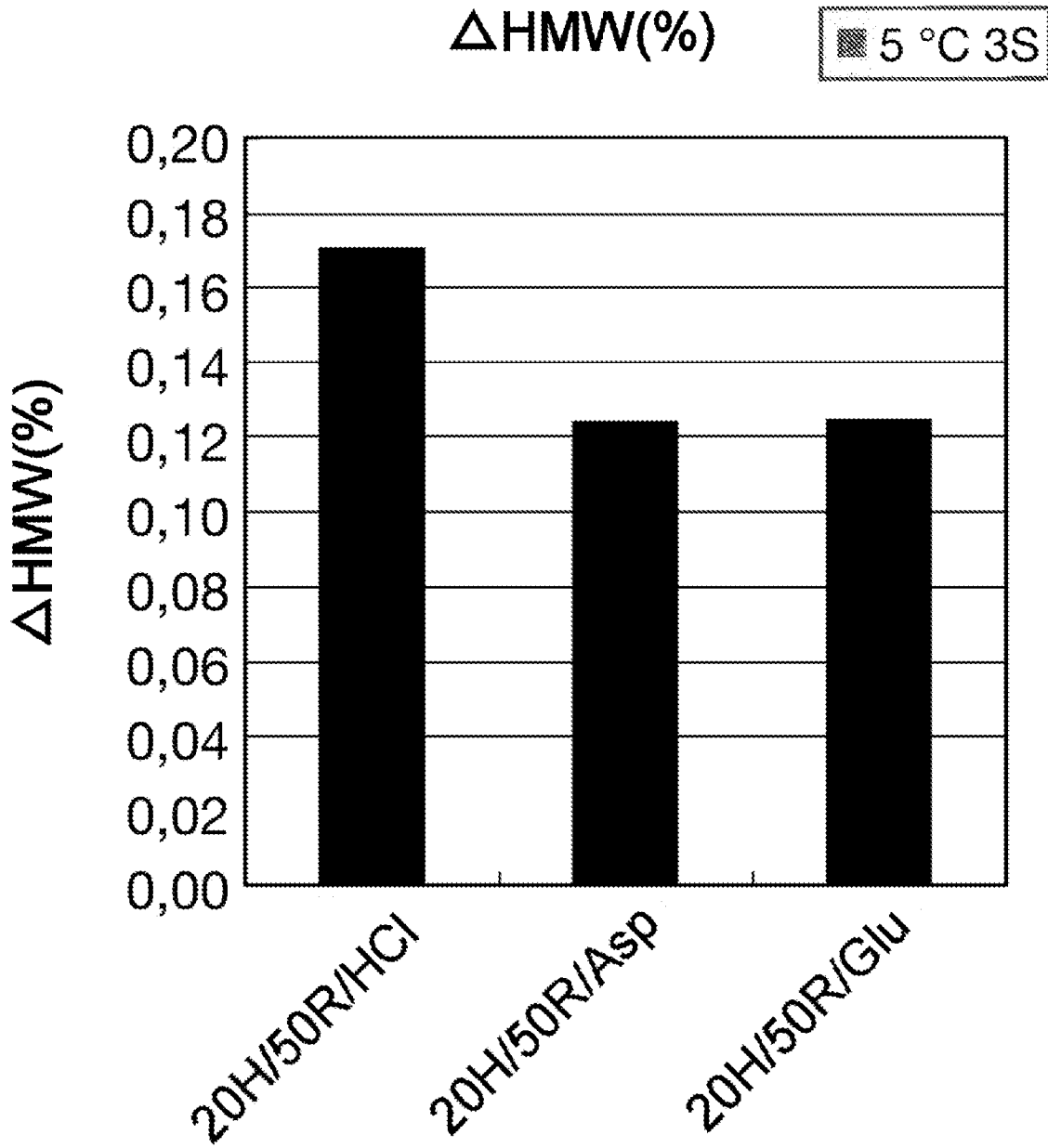


FIG. 5

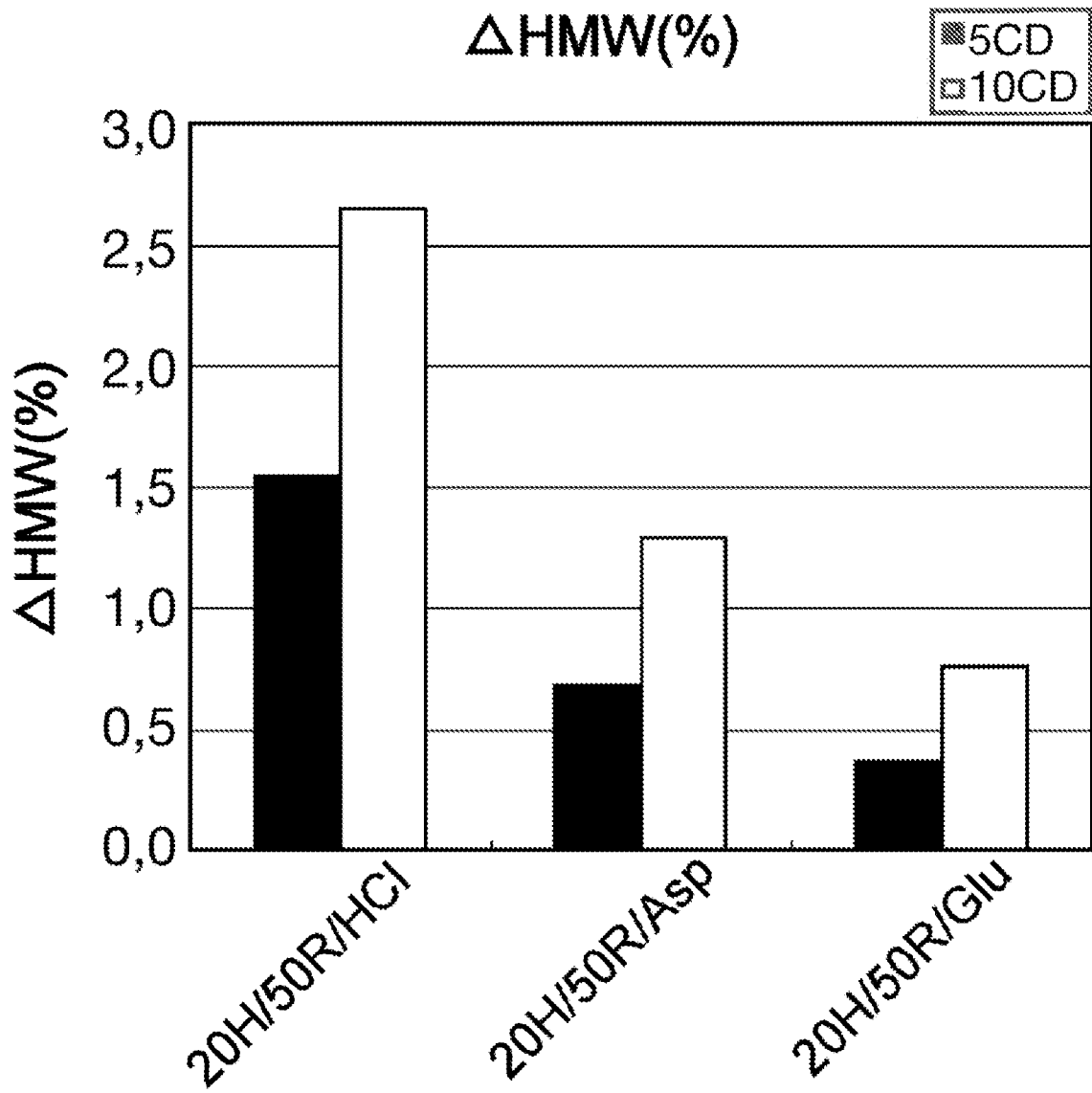


FIG. 6

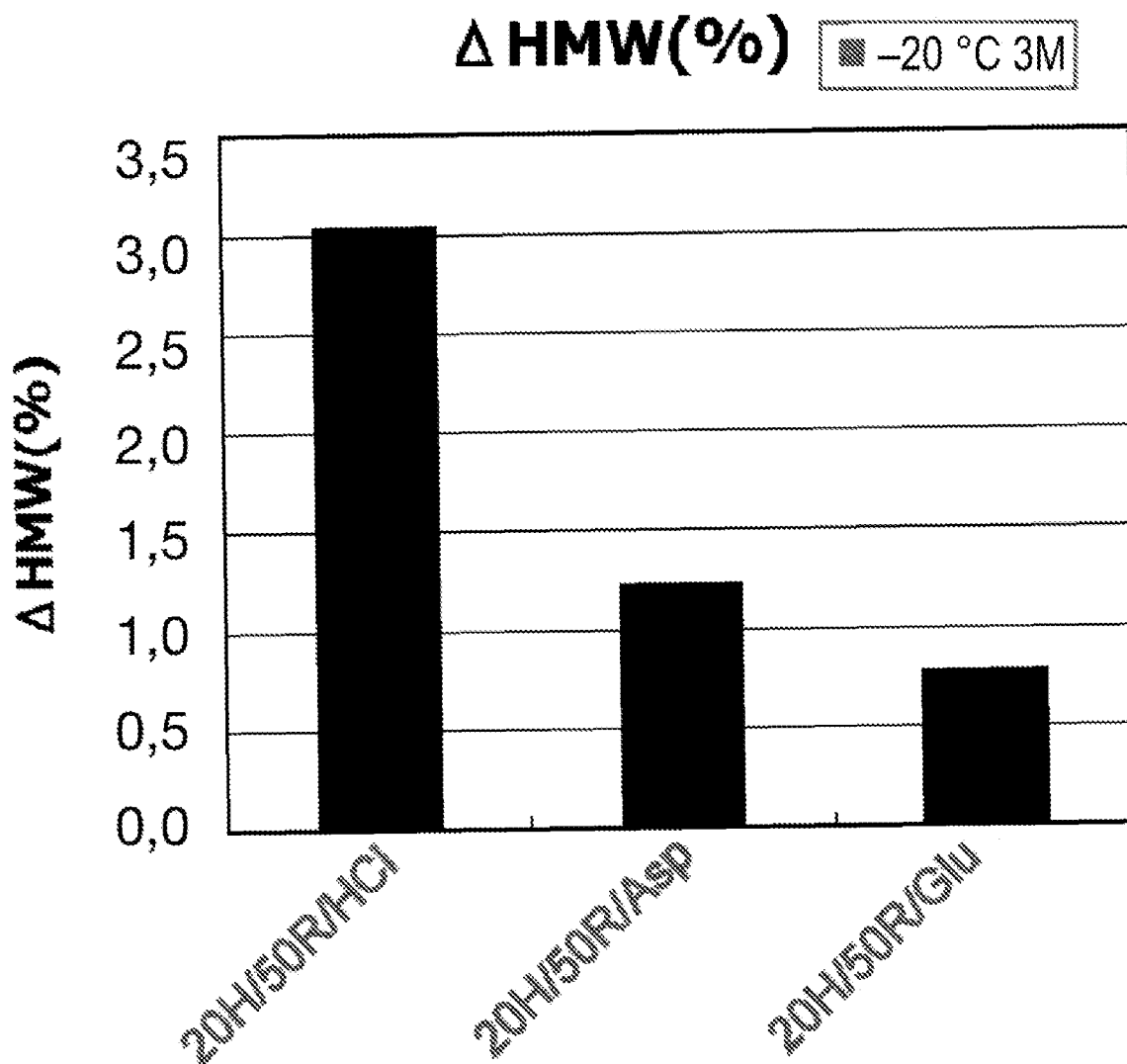


FIG. 7

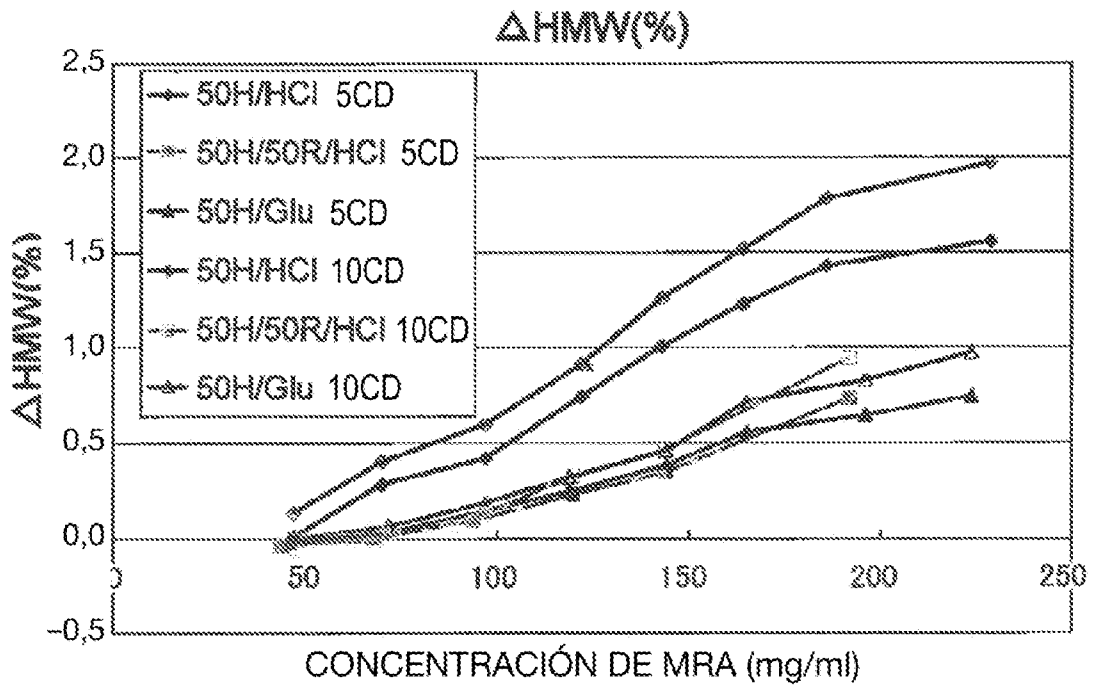


FIG. 8

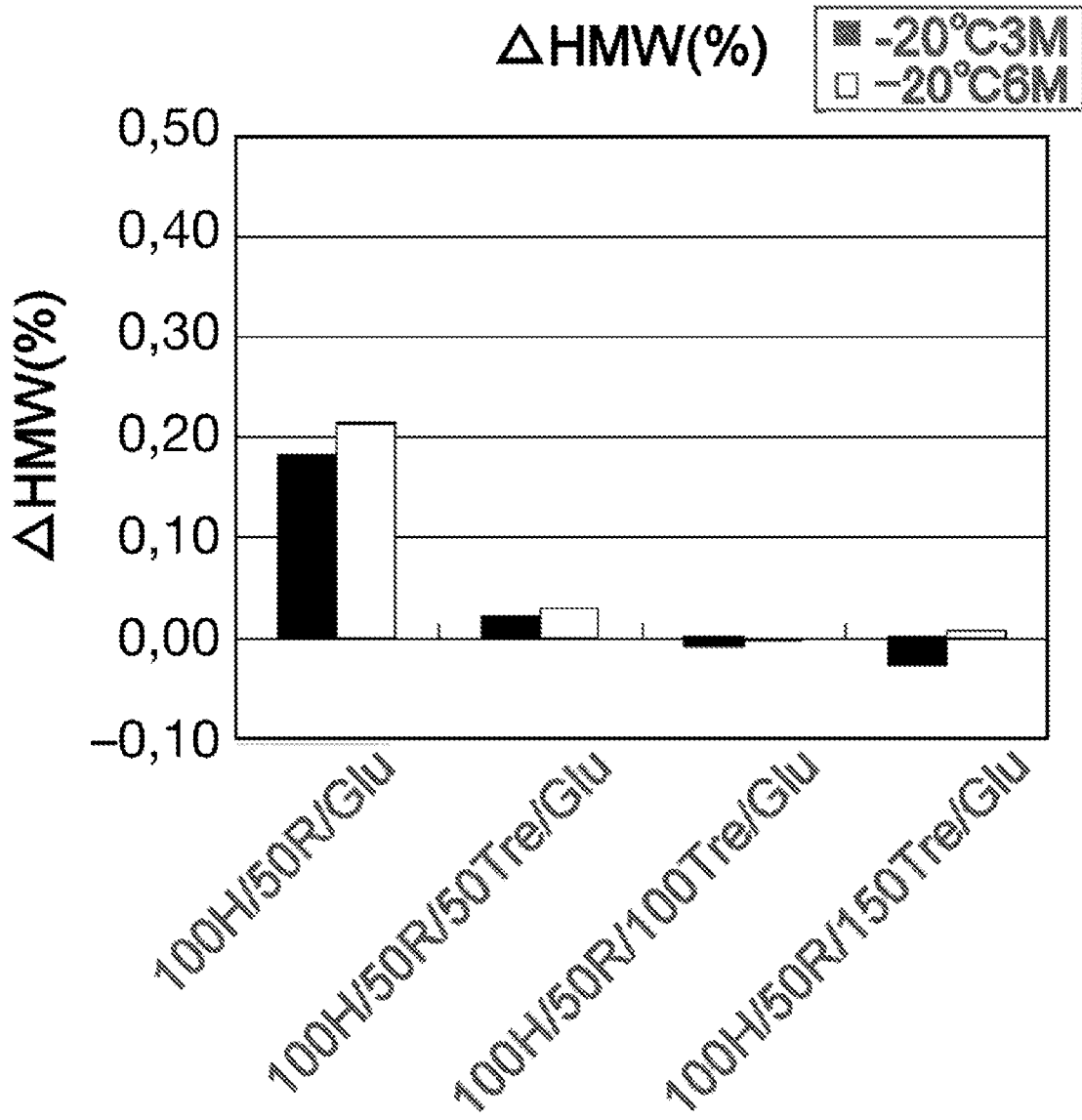


FIG. 9

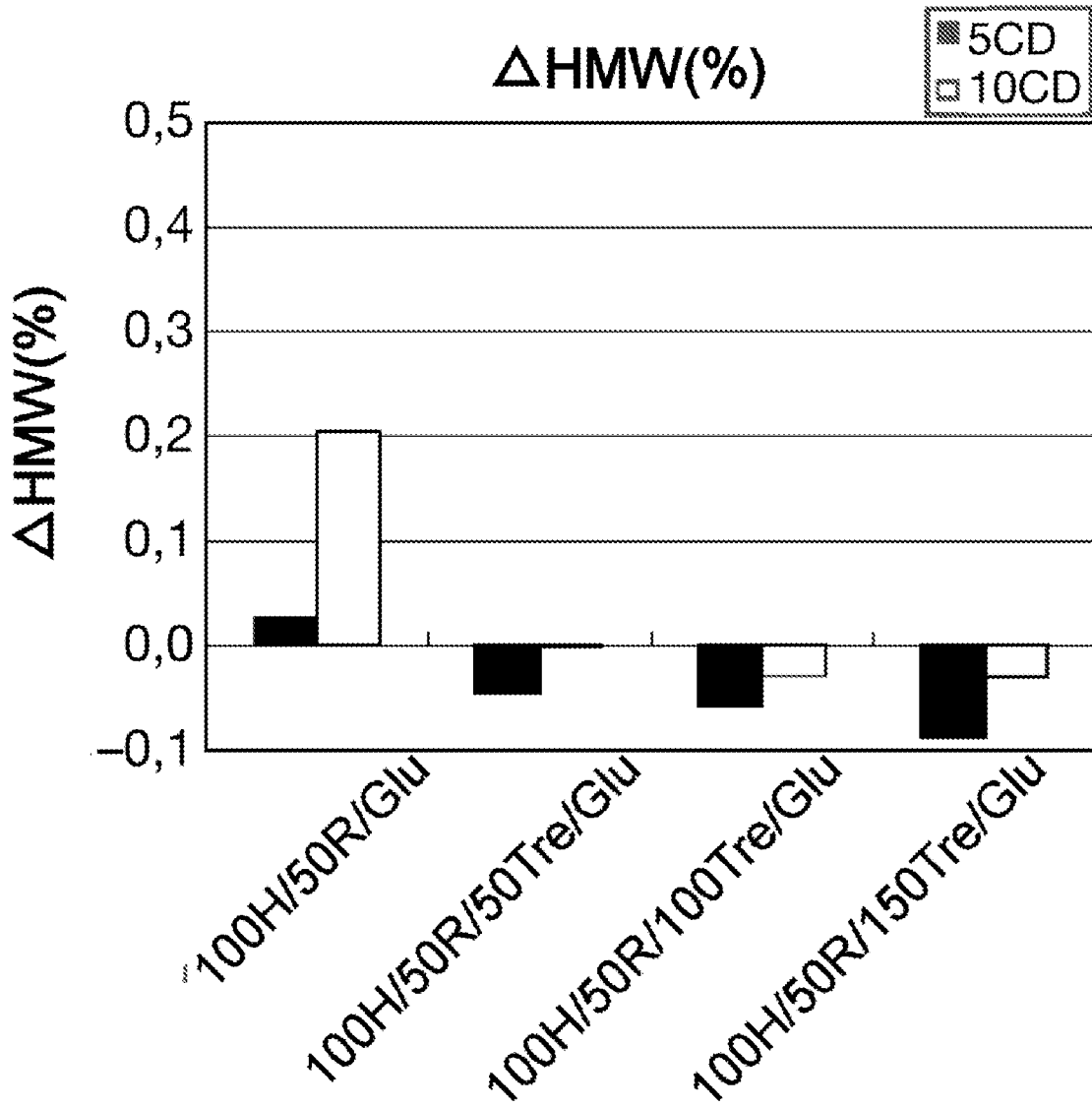


FIG. 10

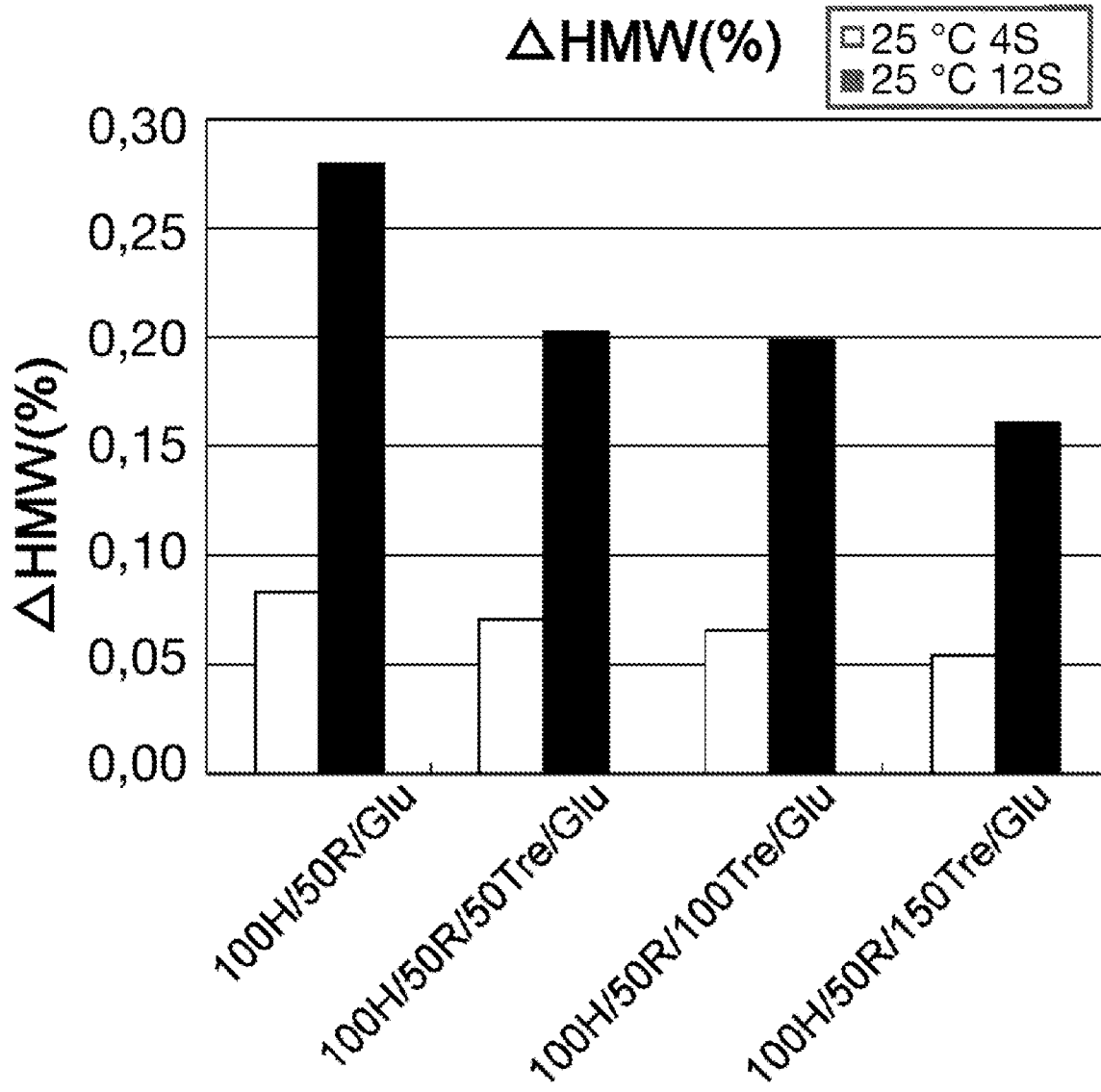


FIG. 11

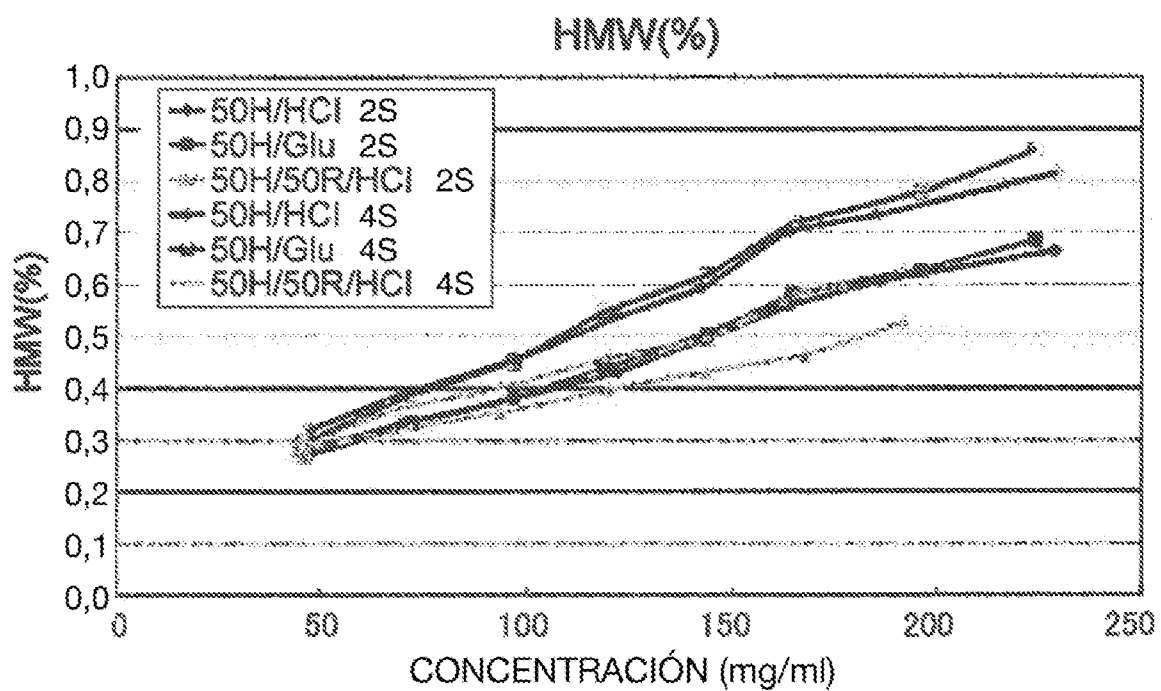


FIG. 12

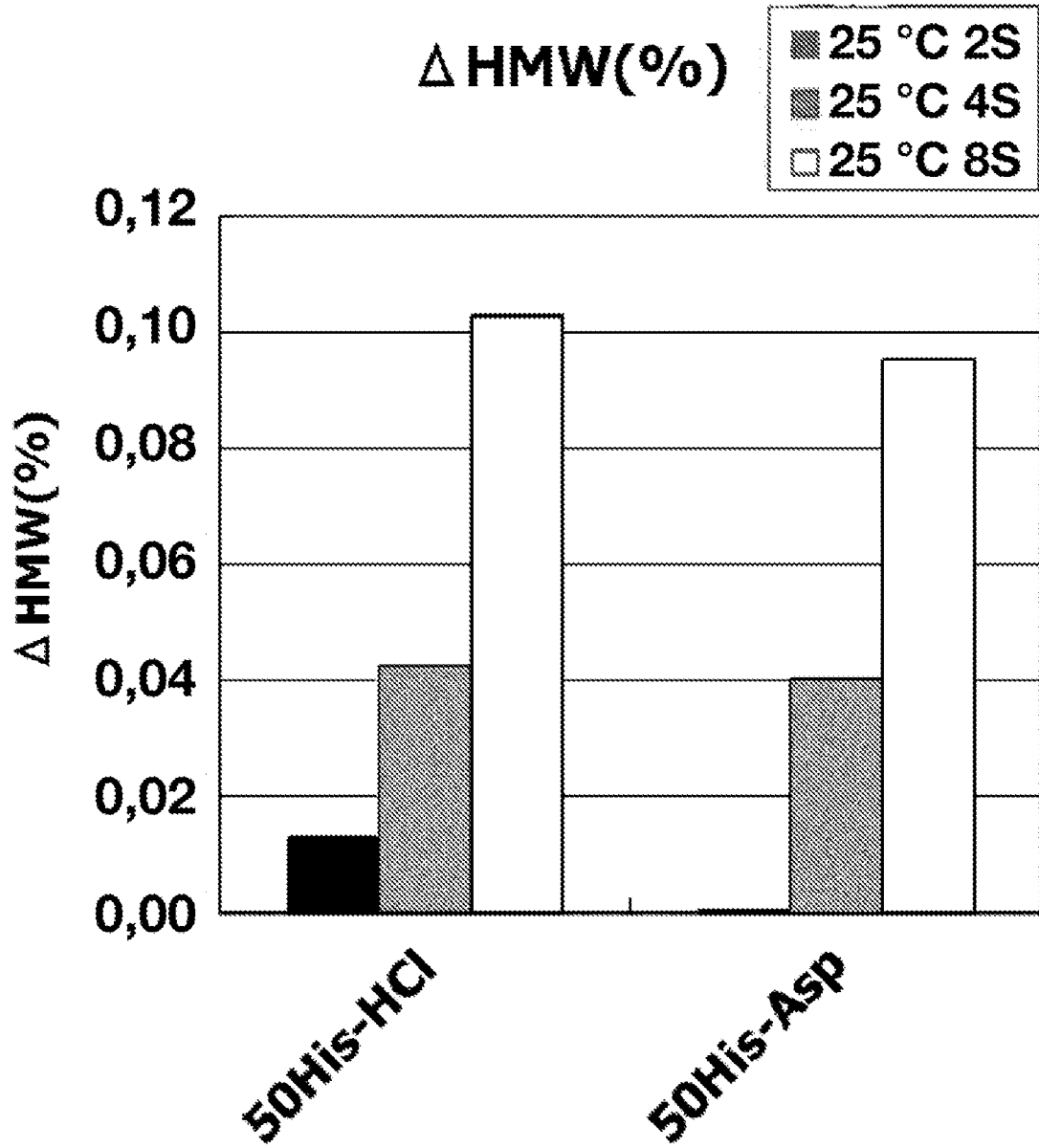


FIG. 13

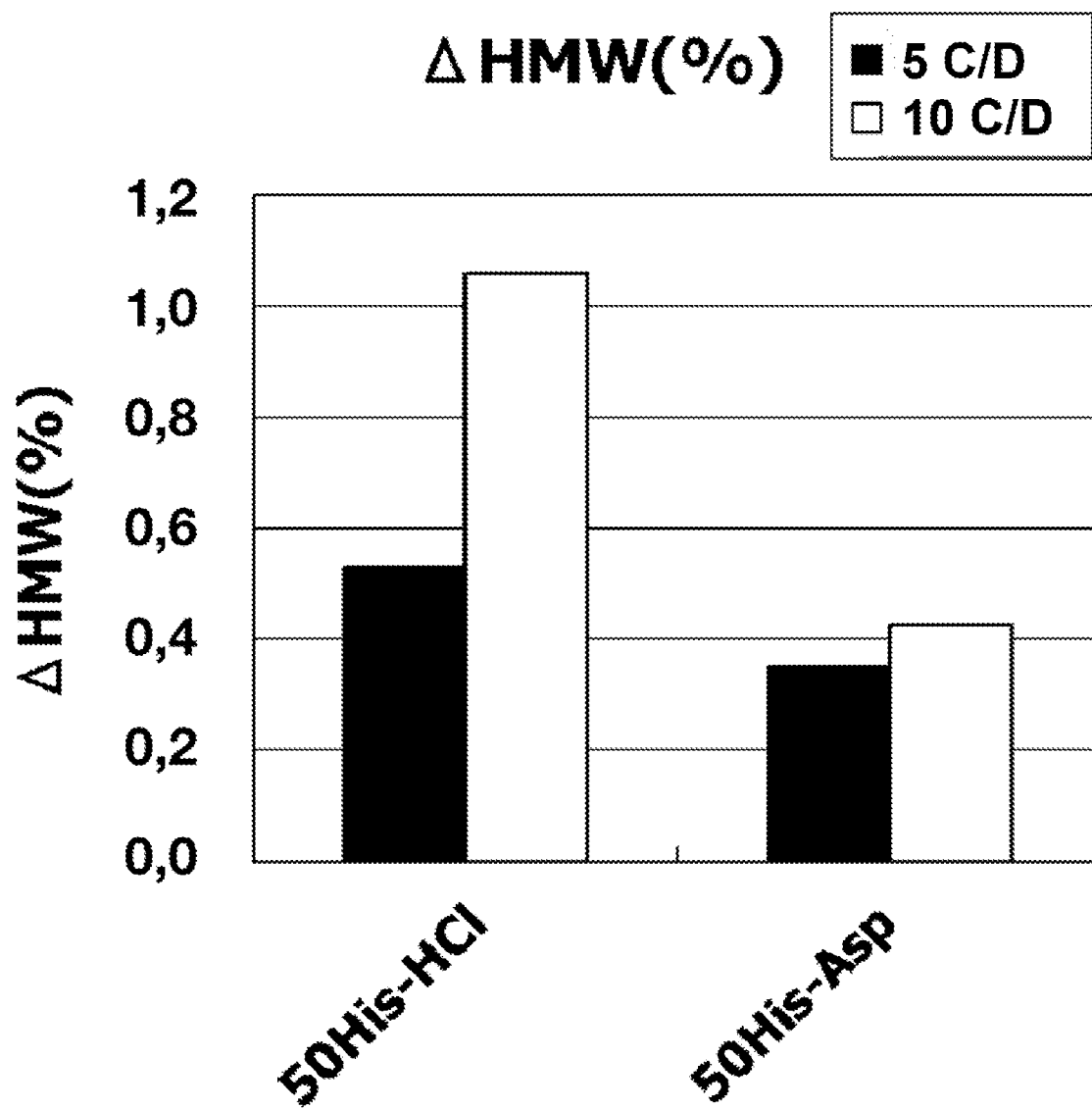


FIG. 14

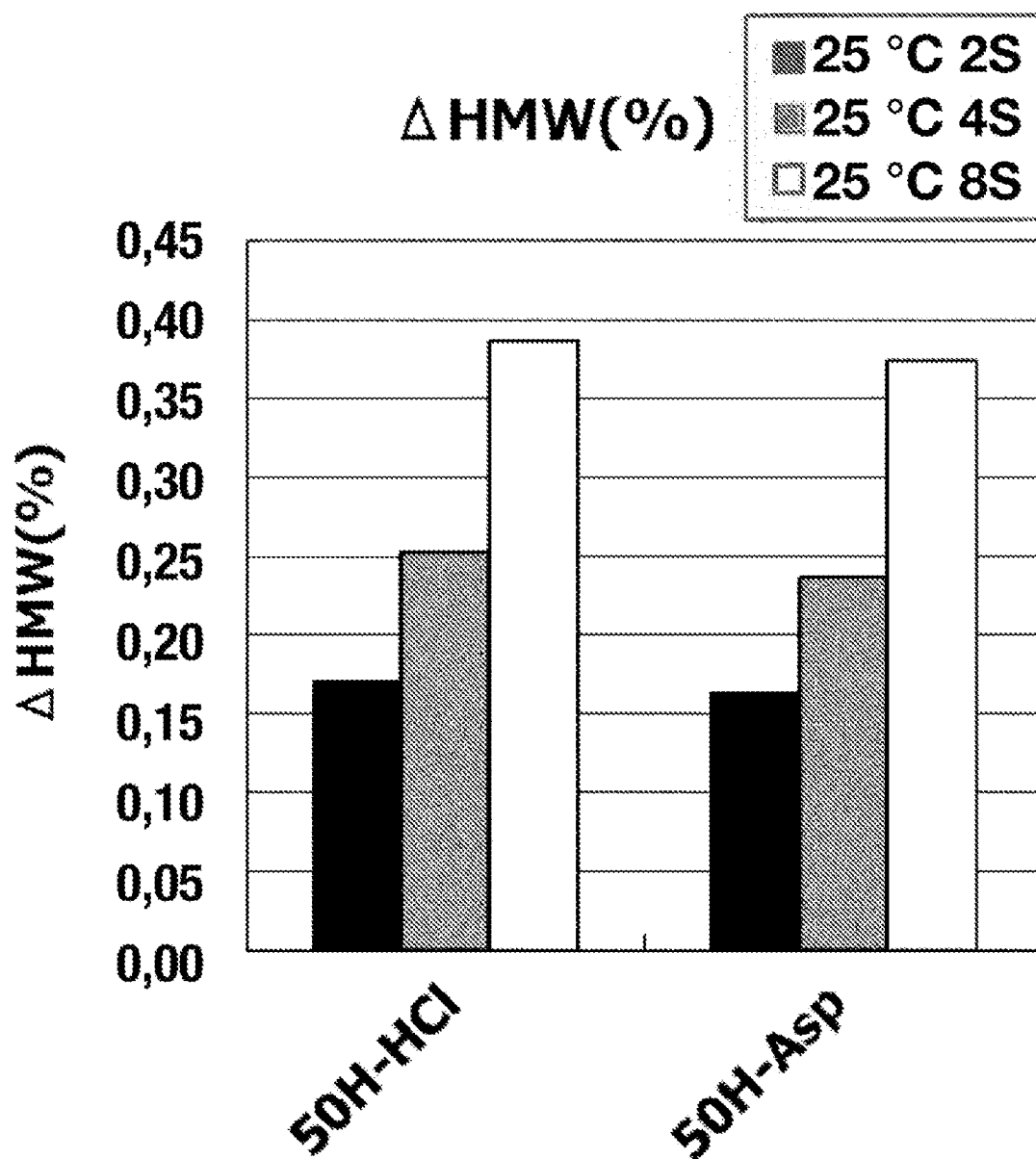


FIG. 15

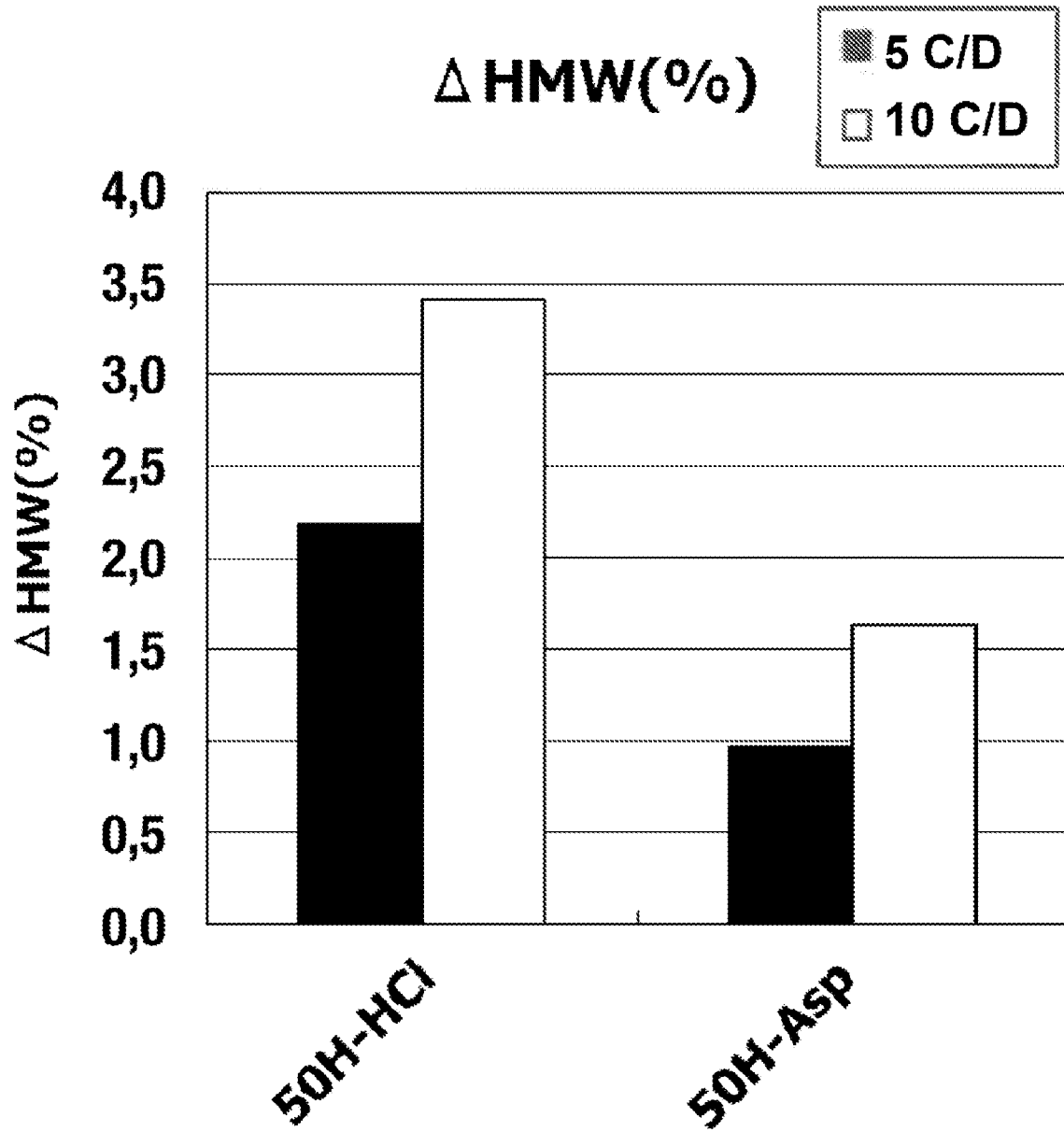


FIG. 16

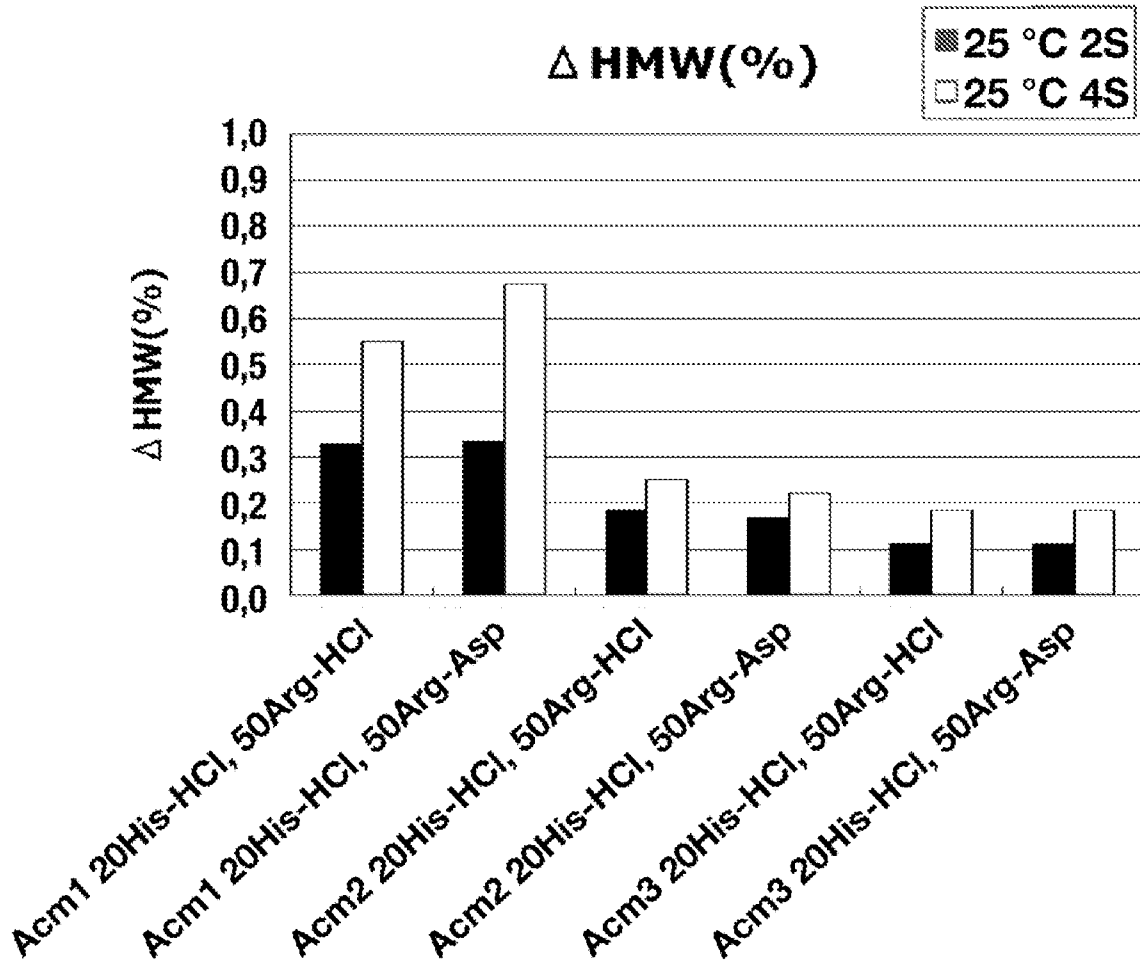


FIG. 17

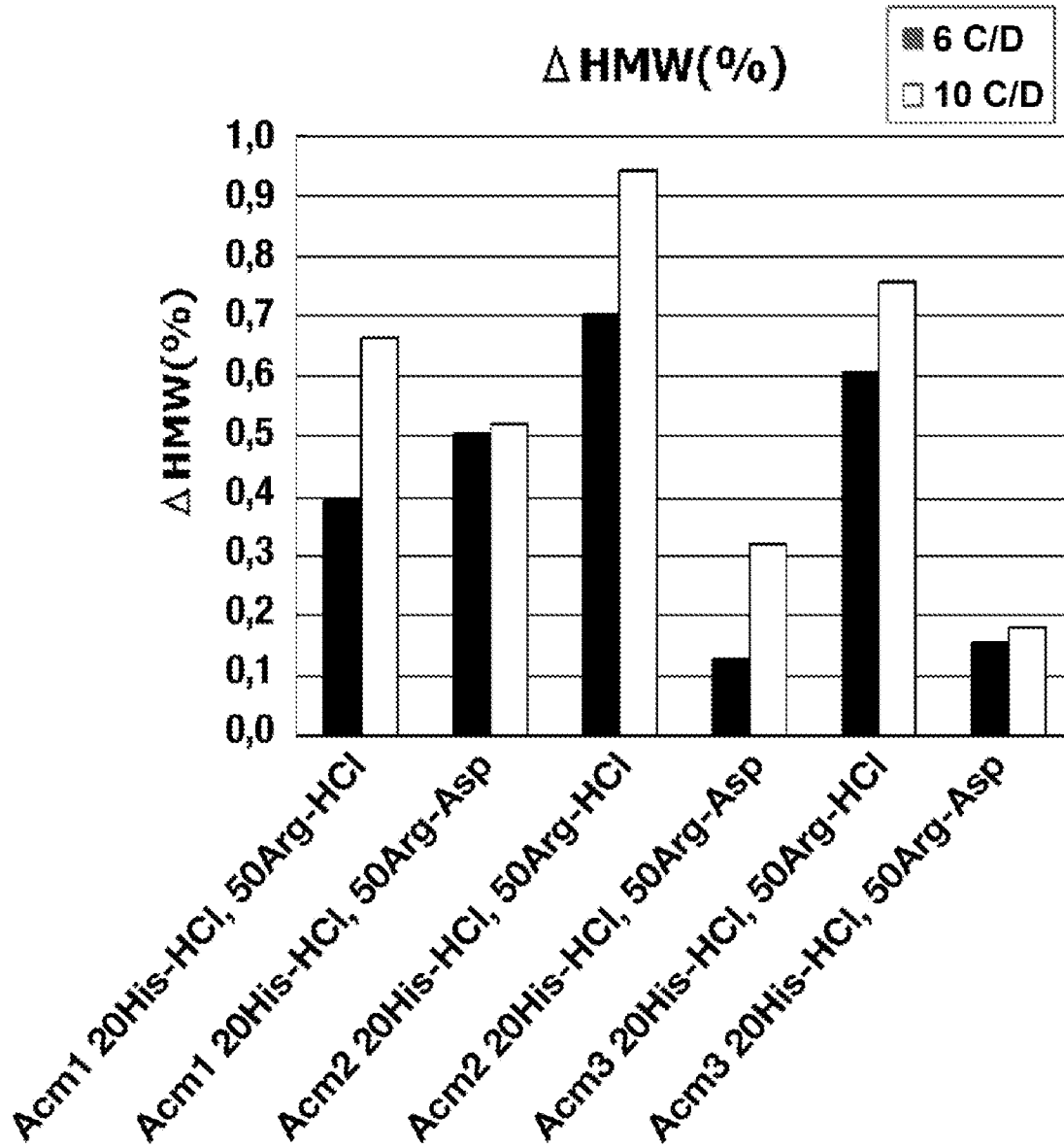


FIG. 18

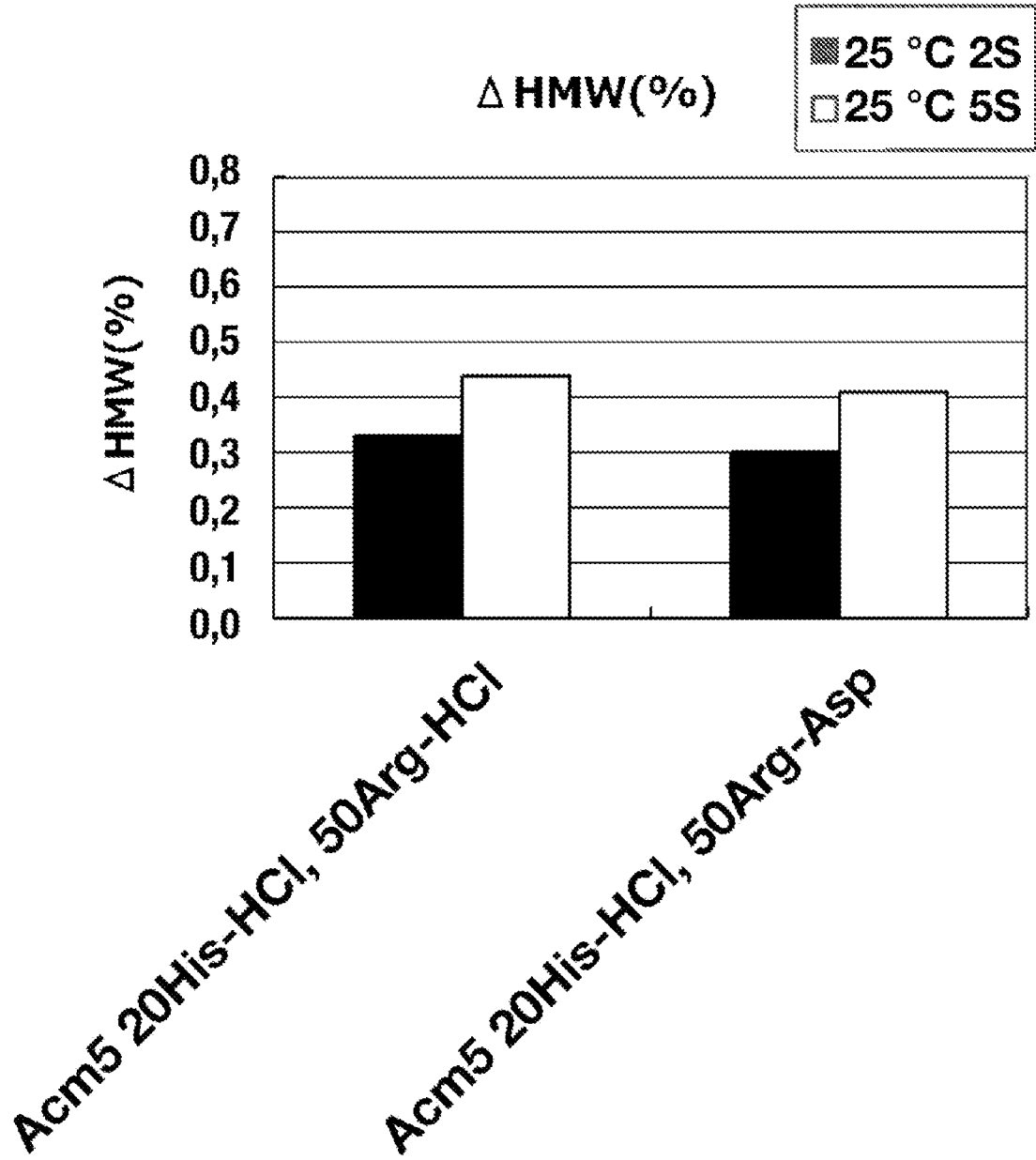


FIG. 19

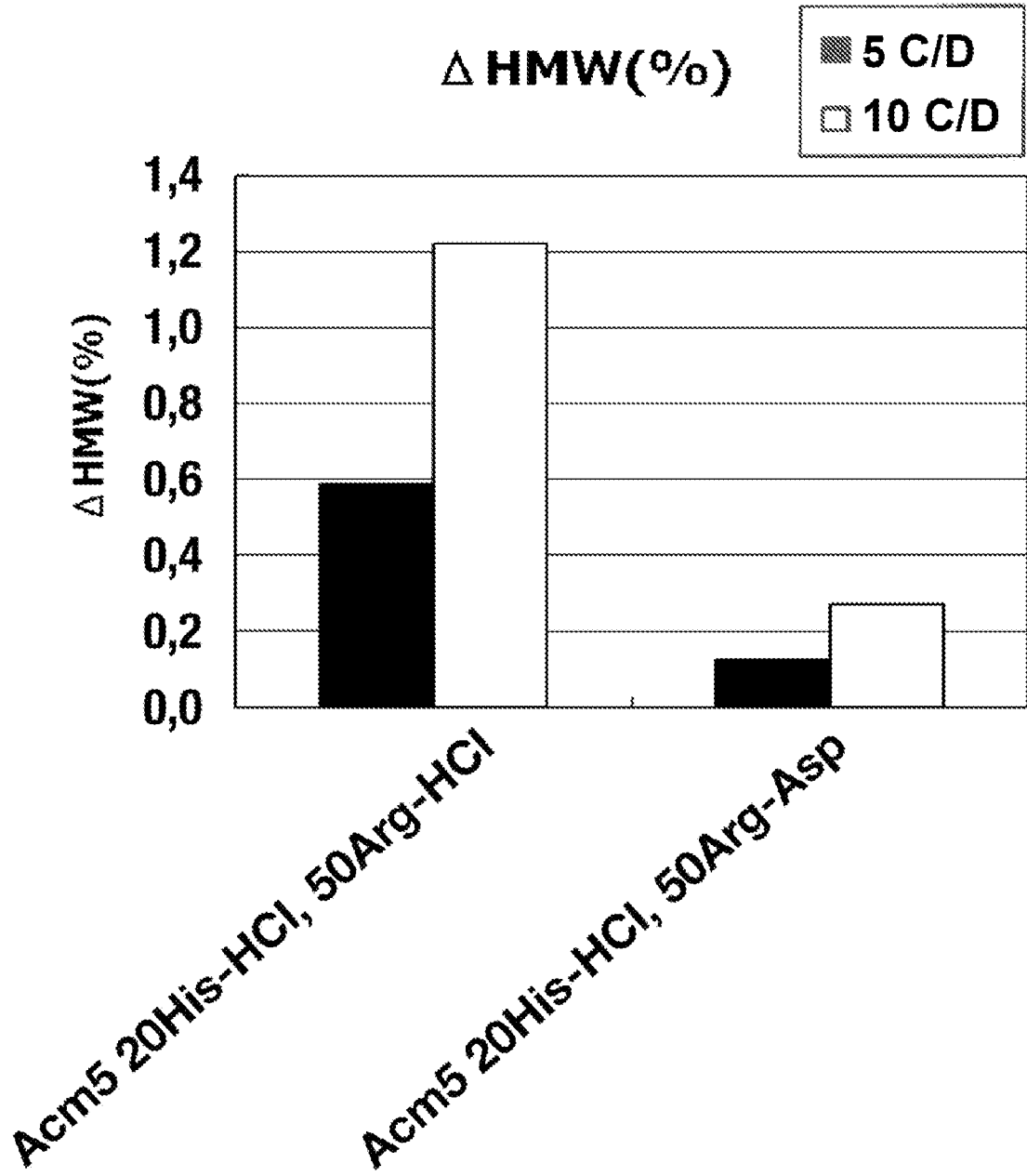


FIG. 20

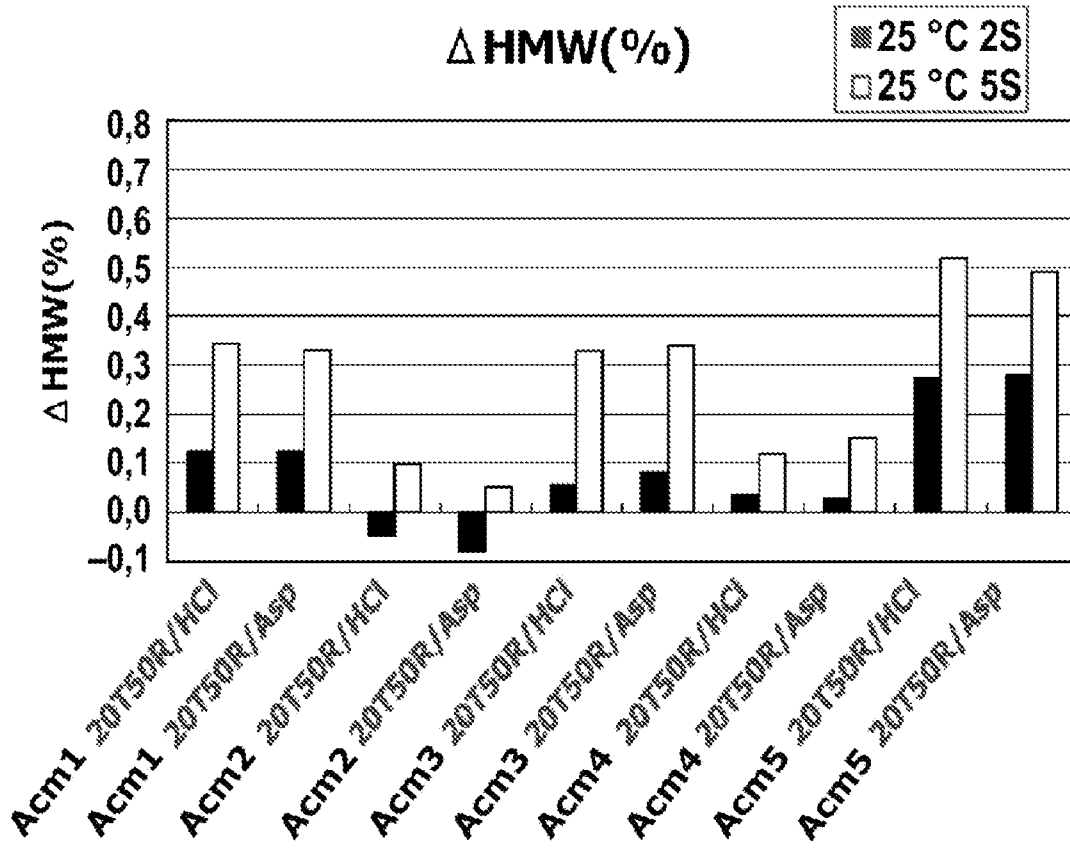


FIG. 21

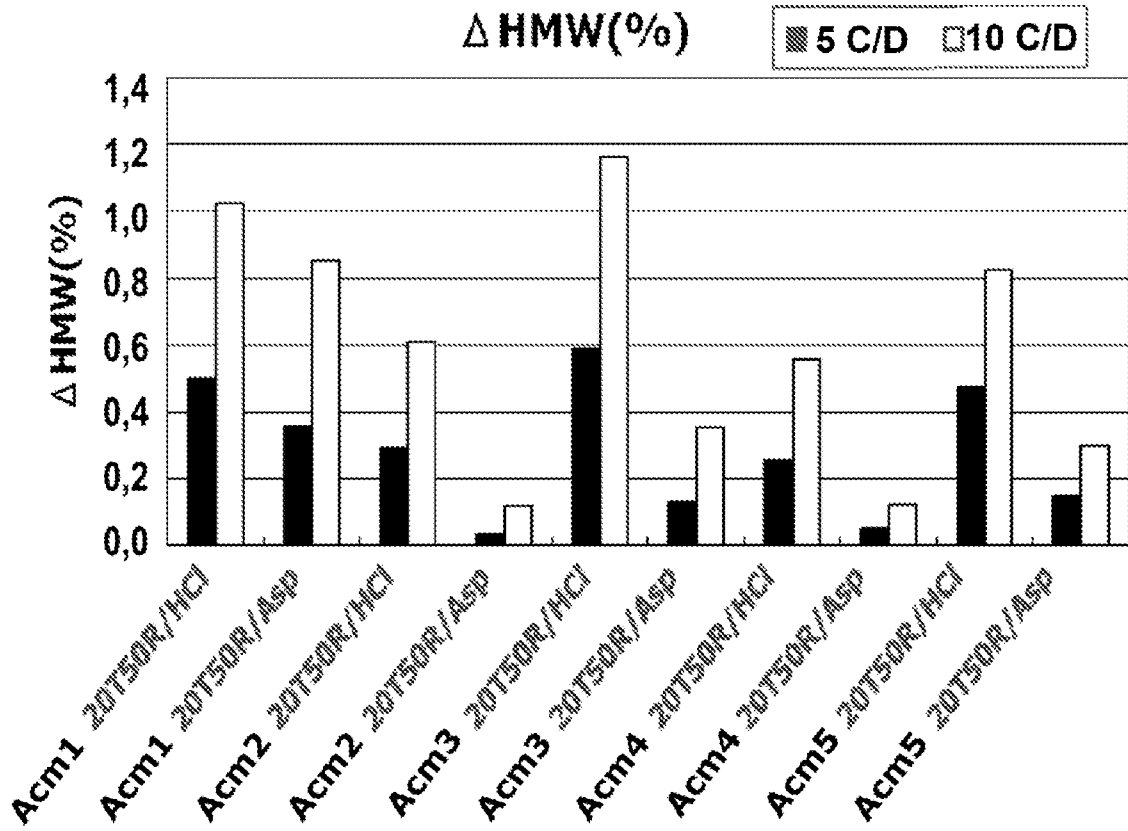


FIG. 22

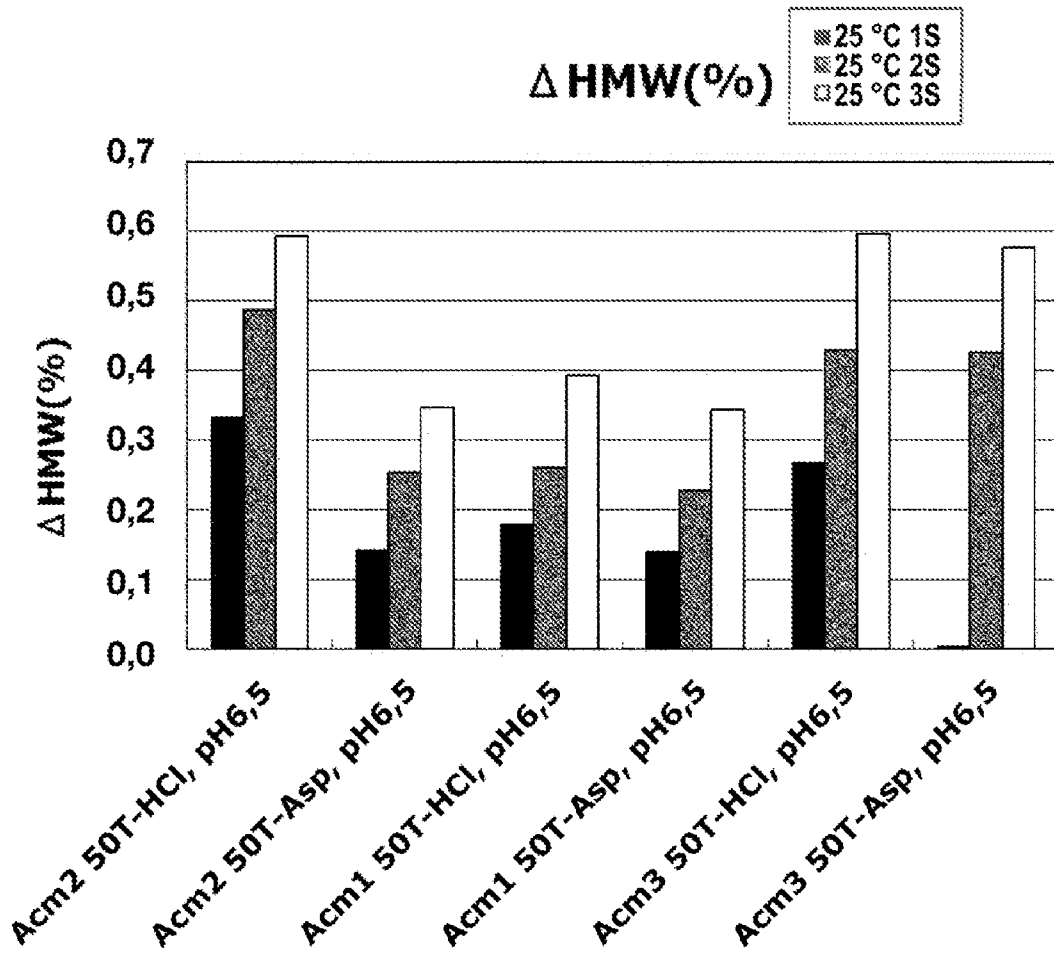


FIG. 23

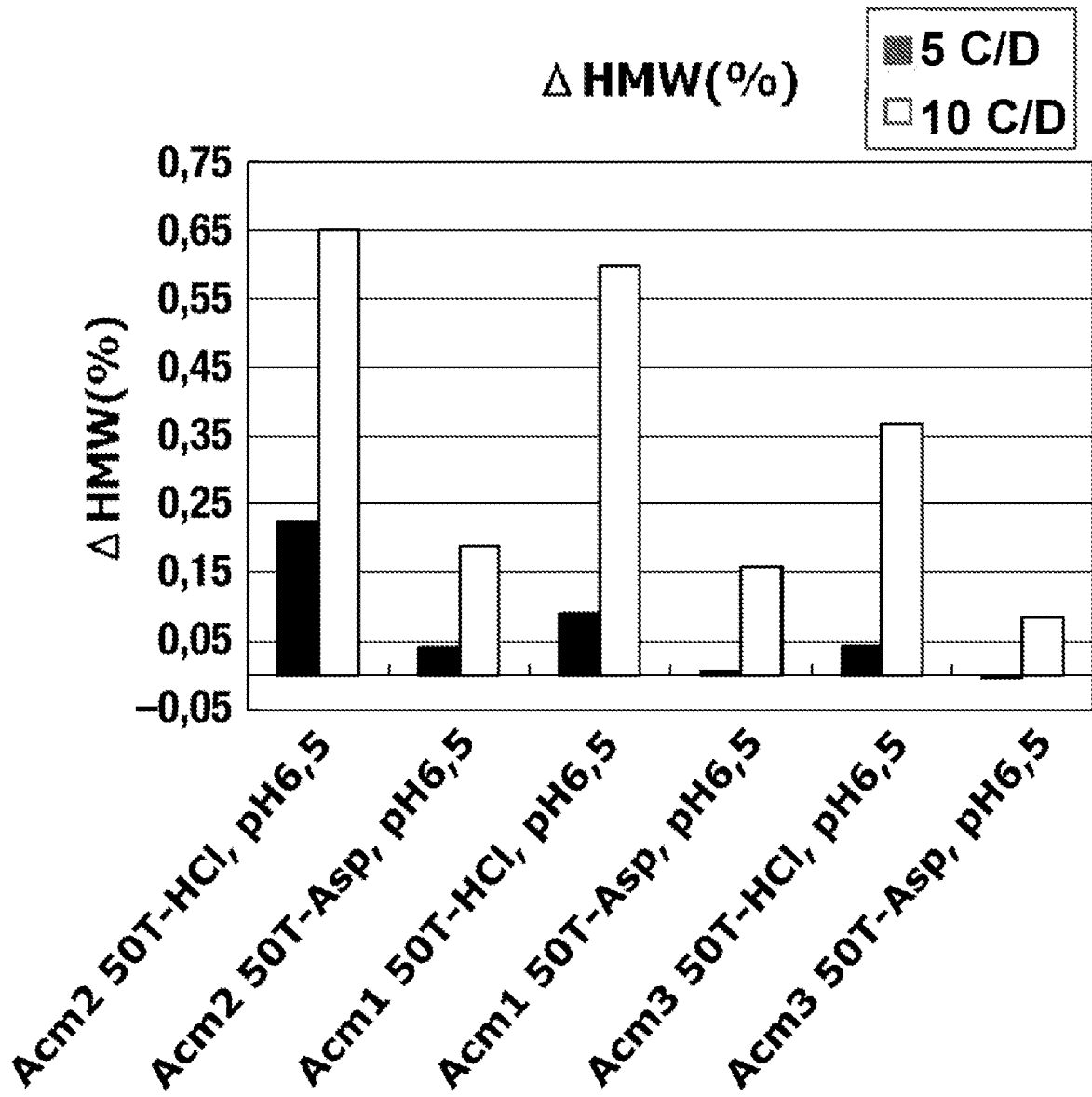


FIG. 24