

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **3 008 262**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 47/12** (2006.01)

**C07K 16/22** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.05.2011 E 19202835 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **16.10.2024 EP 3620175**

54 Título: **Formulaciones de anticuerpos a alta concentración**

30 Prioridad:

**14.05.2010 US 33498610 P**

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

**21.03.2025**

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.00%)  
One Amgen Center Drive  
Thousand Oaks, CA 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**OSSLUND, TIMOTHY D.**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

Observaciones:

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

**ES 3 008 262 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 de anticuerpos a alta concentración

5 **Antecedentes**

10 Las formulaciones de anticuerpo líquidas altamente concentradas son útiles para administrar dosis en volumen más pequeño. Sin embargo, las formulaciones de proteína altamente concentradas plantean varios problemas. Un problema es la inestabilidad debido a la formación de partículas. Otro problema es la elevada viscosidad como resultado de numerosas interacciones intermoleculares de la naturaleza macromolecular de los anticuerpos. Las formulaciones altamente viscosas son difíciles de fabricar, extraer en una jeringa e inyectar. El uso de fuerza en la manipulación de las formulaciones viscosas conduce a excesiva espuma, que puede conducir a la desnaturalización e inactivación de productos biológicos activos.

15 La patente de EE.UU. N.º 6.875.432 y las publicaciones de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2006/0182740, 2007/0172479, 2008/0160014 desvelan formulaciones de anticuerpo y métodos de su preparación. Ninguna de estas publicaciones desvela los anticuerpos referenciados en el presente documento. El documento WO2009/079471 desvela los anticuerpos anti-esclerostina a los que se hace referencia en el presente documento. No desvela las formulaciones a las que se hace referencia en el presente documento.

20 **Resumen de la invención**

La invención se define en las reivindicaciones adjuntas. Los aspectos, ejemplos y realizaciones que quedan fuera del ámbito reivindicado se proporcionan únicamente a título ilustrativo.

25 La presente divulgación se basa en el descubrimiento de que la adición de acetato de calcio a bajas concentraciones, por ejemplo 5-10 mM, redujo la viscosidad eficaz en formulaciones que comprenden una alta concentración de un anticuerpo anti-esclerostina seleccionado. A diferencia, la misma concentración de acetato de calcio no redujo significativamente la viscosidad de otras formulaciones de anticuerpo.

30 Por consiguiente, la invención proporciona una formulación estéril que comprende un anticuerpo anti-esclerostina a una concentración de al menos 70 mg/ml, en la que el anticuerpo comprende secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 88 y 90, y una sal de calcio a una concentración que oscila de 1 mM a 20 mM, en la que la formulación tiene una viscosidad de 10 cP o menos.

35 La invención proporciona también formulaciones para su uso en métodos de tratamiento de cualquier trastorno asociado a disminución de la densidad ósea.

40 La invención también proporciona formulaciones para su uso en un método de tratamiento o prevención de trastornos óseos relacionados asociados a actividad anormal de osteoblastos u osteoclastos en un paciente.

## OTROS ASPECTOS DE LA DIVULGACIÓN

45 En un aspecto de la divulgación, la formulación es estéril y cuando está en forma líquida o líquida reconstituida comprende (a) un anticuerpo anti-esclerostina a una concentración de al menos 70 mg/ml, en la que el anticuerpo comprende un conjunto de seis CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-5 (CDR de Ab-A y Ab-1), 15-20 (CDR de Ab-B), 25-30 (CDR de Ab-C), 35-40 (CDR de Ab-D), 45-50 (CDR de Ab-2), 55-60 (CDR de Ab-3 y Ab-15), 73-78 (CDR de Ab-4 y Ab-5), 91-96 (CDR de Ab-6), 101-106 (CDR de Ab-7), 111-116 (CDR de Ab-8), 121-126 (CDR de Ab-9), 131-136 (CDR de Ab-10), 141-146 (CDR de Ab-11 y Ab-16), 159-164 (CDR de Ab-12), 169-174 (CDR de Ab-13 y Ab-14), 187-192 (CDR de Ab-17 y Ab-18), 201-206 (CDR de Ab-19, Ab-20 y Ab-23), 225-229 (CDR de Ab-21 y Ab-22) o 239-244 (CDR de Ab-24); y (b) una sal de calcio a una concentración que oscila de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM, en la que la formulación tiene una viscosidad absoluta de aproximadamente 10 cP o menos. La viscosidad absoluta como se describe en el presente documento se mide usando un viscosímetro de cono y plato de Brookfield LV-DVII con un husillo CPE-40 con temperatura del vaso de muestras coincidente regulada por un baño de circulación de agua constante a 25 °C.

60 En algunas realizaciones, la sal de calcio se selecciona del grupo que consiste en acetato de calcio, carbonato de calcio y cloruro de calcio. En una realización, la sal de calcio es acetato de calcio. Alternativamente, en algunas realizaciones, la sal de calcio está presente a una concentración que reduce la viscosidad de una formulación de anticuerpo al menos el 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 % o más en comparación con la misma formulación de anticuerpo que carece de la sal de calcio.

65 En un aspecto relacionado de la divulgación, la formulación es estéril y cuando está en forma líquida o líquida

reconstituida comprende (a) un anticuerpo anti-esclerostina a una concentración de aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, en la que el anticuerpo comprende un conjunto de seis CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-5 (CDR de Ab-A y Ab-1), 15-20 (CDR de Ab-B), 25-30 (CDR de Ab-C), 35-40 (CDR de Ab-D), 45-50 (CDR de Ab-2), 55-60 (CDR de Ab-3 y Ab-15), 73-78 (CDR de Ab-4 y Ab-5), 91-96 (CDR de Ab-6), 101-106 (CDR de Ab-7), 111-116 (CDR de Ab-8), 121-126 (CDR de Ab-9), 131-136 (CDR de Ab-10), 141-146 (CDR de Ab-11 y Ab-16), 159-164 (CDR de Ab-12), 169-174 (CDR de Ab-13 y Ab-14), 187-192 (CDR de Ab-17 y Ab-18), 201-206 (CDR de Ab-19, Ab-20 y Ab-23), 225-229 (CDR de Ab-21 y Ab-22) o 239-244 (CDR de Ab-24); y (b) acetato de calcio a una concentración que oscila de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM, en la que la formulación tiene una viscosidad absoluta de aproximadamente 10 cP o menos. Alternativamente, en algunos casos, el acetato de calcio está presente a una concentración que reduce la viscosidad de una formulación de anticuerpo al menos el 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 % o más en comparación con la misma formulación de anticuerpo que carece del acetato de calcio.

También se describe un método de reducción de la viscosidad de una formulación de proteína, comprendiendo el método; añadir acetato de calcio a una concentración de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 20 mM, a una formulación de inmunoglobulina anti-esclerostina, en la que la formulación comprende una inmunoglobulina a una concentración de aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, en la que la viscosidad de la formulación con el acetato de calcio se reduce en comparación con la viscosidad de una formulación de anticuerpo sin el acetato de calcio.

En otro aspecto, la formulación es estéril y tiene una viscosidad absoluta de aproximadamente 10 cP o menos que comprende: (a) Ab-5 a una concentración de al menos 70 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml; (b) acetato de calcio a una concentración que oscila de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM; y (c) un poliol tal como sacarosa, por ejemplo, en una cantidad que oscila de aproximadamente el 1 % en peso/volumen a aproximadamente el 12 % en peso/volumen. En ciertas realizaciones, el poliol está en una cantidad que oscila de aproximadamente el 4 % al 10 %. La inmunoglobulina comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 86 (región variable de la cadena pesada de Ab-5) y/o SEQ ID NO: 84 (región variable de la cadena ligera de Ab-5).

En otro aspecto, la formulación es estéril y tiene una viscosidad absoluta de aproximadamente 10 cP o menos y comprende (a) Ab-5 a una concentración de al menos 70 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml; (b) acetato de calcio a una concentración que oscila de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM; y (c) un poliol tal como sacarosa, por ejemplo, en una cantidad que oscila de aproximadamente el 4 % en peso/volumen a aproximadamente el 6 % en peso/volumen.

En cualquiera de los aspectos precedentes, en algunas realizaciones, la formulación comprende además (c) un tampón acetato, por ejemplo, acetato sódico, a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM. En algunas realizaciones, la concentración total de acetato es aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM.

En un aspecto diferente de la divulgación, la formulación es estéril y cuando está en forma líquida o líquida reconstituida comprende (a) un anticuerpo anti-esclerostina a una concentración de aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, en la que el anticuerpo comprende un conjunto de seis CDR seleccionadas del grupo que consiste en SEQ ID NOs: 1-5 (CDR de Ab-A y Ab-1), 15-20 (CDR de Ab-B), 25-30 (CDR de Ab-C), 35-40 (CDR de Ab-D), 45-50 (CDR de Ab-2), 55-60 (CDR de Ab-3 y Ab-15), 73-78 (CDR de Ab-4 y Ab-5), 91-96 (CDR de Ab-6), 101-106 (CDR de Ab-7), 111-116 (CDR de Ab-8), 121-126 (CDR de Ab-9), 131-136 (CDR de Ab-10), 141-146 (CDR de Ab-11 y Ab-16), 159-164 (CDR de Ab-12), 169-174 (CDR de Ab-13 y Ab-14), 187-192 (CDR de Ab-17 y Ab-18), 201-206 (CDR de Ab-19, Ab-20 y Ab-23), 225-229 (CDR de Ab-21 y Ab-22) o 239-244 (CDR de Ab-24); y (b) una sal de acetato y/o tampón acetato a una concentración que oscila de acetato aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, o de acetato aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, en la que la formulación tiene una viscosidad absoluta de aproximadamente 10 cP o menos. En algunas realizaciones, la sal de acetato y/o tampón comprenden acetato de calcio y/o acetato sódico. Alternativamente, en algunas realizaciones, la sal de acetato y/o tampón está presente a una concentración que reduce la viscosidad de una formulación de anticuerpo al menos el 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 21 %, 22 %, 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, 30 %, 31 %, 32 %, 33 %, 34 %, 35 %, 36 %, 37 %, 38 %, 39 %, 40 %, 41 %, 42 %, 43 %, 44 %, 45 %, 46 %, 47 %, 48 %, 49 %, 50 %, 51 %, 52 %, 53 %, 54 %, 55 %, 56 %, 57 %, 58 %, 59 %, 60 % o más en comparación con la misma formulación de anticuerpo que carece de la sal de acetato y/o tampón.

En cualquiera de los aspectos precedentes de la divulgación, en algunas realizaciones, la concentración total de iones (cationes y aniones) en solución es aproximadamente 20 mM a aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM. En cualquiera de estas realizaciones, la osmolaridad total es inferior a aproximadamente 400 mOsm/l o 350 mOsm/l, y es preferentemente próxima a isotónica, por ejemplo 250-350 mOsm/l. En algunas realizaciones, la formulación es hipotónica. Por ejemplo, en tales realizaciones, la osmolaridad de la formulación es

inferior a aproximadamente 250 mOsm/l. En otras realizaciones, la formulación es hipertónica. Así, en tales realizaciones, la osmolaridad total de la formulación es mayor de aproximadamente 350 mOsm/l.

5 En cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, un anticuerpo anti-esclerostina en la formulación puede comprender regiones variables de la cadena ligera y/o pesada maduras de cualquiera de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-19, Ab-21, Ab-23 o Ab-24. Así, en realizaciones específicas de la divulgación, el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos de: SEQ ID NO: 14 (región variable de la cadena pesada de Ab-1), y/o SEQ ID NO: 12 (región variable de la cadena ligera de Ab-1); o SEQ ID NO: 68 (región variable de la cadena pesada de Ab-15), y/o SEQ ID NO: 66 (región variable de la cadena ligera de Ab-15); o SEQ ID NO: 86 (región variable de la cadena pesada de Ab-5), y/o SEQ ID NO: 84 (región variable de la cadena ligera de Ab-5); o SEQ ID NO: 154 (región variable de la cadena pesada de Ab-16), y/o SEQ ID NO: 152 (región variable de la cadena ligera de Ab-16); o SEQ ID NO: 182 (región variable de la cadena pesada de Ab-14) y/o SEQ ID NO: 180 (región variable de la cadena ligera de Ab-14); o SEQ ID NO: 208 (región variable de la cadena pesada de Ab-19) y/o SEQ ID NO: 207 (región variable de la cadena ligera de Ab-19); o SEQ ID NO: 216 (región variable de la cadena pesada de Ab-20) y/o SEQ ID NO: 214 (región variable de la cadena ligera de Ab-20); o SEQ ID NO: 220 (región variable de la cadena pesada de Ab-23) y/o SEQ ID NO: 218 (región variable de la cadena ligera de Ab-23); o SEQ ID NO: 238 (región variable de la cadena pesada de Ab-22) y/o SEQ ID NO: 236 (región variable de la cadena ligera de Ab-22). En algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo comprende las cadenas pesadas y/o ligeras maduras de cualquiera de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-15, Ab-16, Ab-19, Ab-23 o Ab-24. En algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo comprende secuencias de aminoácidos obtenibles expresando en células huésped de mamífero el ADNc que codifica la cadena pesada y/o ligera, o alternativamente la región variable de la cadena pesada y/o ligera, de cualquiera de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-15, Ab-16, Ab-19, Ab-23 o Ab-24, como se describen en el presente documento.

En cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, el anticuerpo anti-esclerostina puede comprender las CDR, o las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras maduras, o las cadenas pesadas y ligeras maduras, de cualquiera de Ab-4 o Ab-5; Ab-13 o Ab-14; o Ab-19, Ab-20 o Ab-23. En cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, el anticuerpo se une a esclerostina de SEQ ID NO: 1 con una  $K_D$  de  $10^{-7}$  o menos (significando números más bajos afinidad de unión más alta).

En cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, en algunas realizaciones, el anticuerpo en la formulación está presente a una concentración de al menos 120 mg/ml, o al menos 140 mg/ml. En cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, en algunas realizaciones, la viscosidad absoluta de formulación es aproximadamente 8 cP o menos, o aproximadamente 6 cP o menos. En realizaciones alternativas, el anticuerpo en la formulación está presente a una concentración de aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 130 mg/ml, en las que la formulación tiene una viscosidad absoluta de aproximadamente 10 cP o menos.

En algunas realizaciones, cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento comprende además un poliol tal como sacarosa, por ejemplo, en una cantidad que oscila de aproximadamente el 4 % en peso/volumen a aproximadamente el 6 %. En algunas realizaciones, la formulación comprende aproximadamente el 9 % de sacarosa. En algunas realizaciones, cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento comprende opcionalmente otros excipientes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo sal, tampón, aminoácido, estabilizador, poliol, otro agente de tonicidad, tensioactivo, agente de carga, crioprotector, lioprotector, antioxidante, ion metálico, agente quelante y/o conservante. En algunas realizaciones, la formulación tiene menos del 0,05 % en peso de tensioactivo.

En cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, en algunas realizaciones, la formulación tiene un pH que oscila de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6, o aproximadamente 5 a aproximadamente 6, o aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5. En algunas realizaciones, la formulación tiene un pH de 5,2.

En el presente documento también se describen formulaciones para su uso en métodos de tratamiento de cualquiera trastorno asociado a disminución de la densidad ósea, que incluye, pero no se limita a, acondroplasia, disostosis cleidocraneal, encondromatosis, displasia fibrosa, enfermedad de Gaucher, raquitismo hipofosfatémico, síndrome de Marfan, exostosis múltiple hereditaria, neurofibromatosis, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, osteopoiquilosis, lesiones escleróticas, pseudoartritis, osteomielitis piogénica, enfermedad periodontal, pérdida ósea inducida por fármacos antiepilépticos, hiperparatiroidismo primario o secundario, síndromes de hiperparatiroidismo familiar, pérdida de peso inducida por ingravidez, osteoporosis en el hombre, pérdida ósea postmenopáusica, osteoartritis, osteodistrofia renal, trastornos infiltrativos del hueso, pérdida de hueso oral, osteonecrosis de la mandíbula, enfermedad de Paget juvenil, melorreostosis, enfermedades óseas metabólicas, mastocitosis, anemia/enfermedad de células falciformes, pérdida ósea relacionada con trasplante de órganos, pérdida ósea relacionada con trasplante de riñón, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, epilepsia, artritis juvenil, talasemia, mucopolisacaridosis, enfermedad de Fabry, síndrome de Turner, síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, lepra, enfermedad de Perthe, escoliosis idiopática del adolescente, enfermedad inflamatoria multisistémica infantil, síndrome de Winchester, enfermedad de Menkes, enfermedad de Wilson, enfermedad ósea isquémica (tal como enfermedad de Legg-Calve-

Perthes u osteoporosis migratoria regional), estados anémicos, afecciones producidas por esteroides, pérdida ósea inducida por glucocorticoides, pérdida ósea inducida por heparina, trastornos de la médula ósea, escorbuto, desnutrición, deficiencia de calcio, osteoporosis, osteopenia, alcoholismo, enfermedad hepática crónica, estado posmenopáusico, afecciones inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, colitis inflamatoria, enfermedad de Crohn, oligomenorrea, amenorrea, embarazo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, trastornos tiroideos, trastornos paratiroideos, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, inmovilización o descuido, síndrome de distrofia simpática refleja, osteoporosis regional, osteomalacia, pérdida ósea asociada a sustitución de articulación, pérdida ósea asociada a VIH, pérdida ósea asociada a pérdida de hormona de crecimiento, pérdida ósea asociada a fibrosis quística, pérdida ósea asociada a quimioterapia, pérdida ósea inducida por tumor, pérdida ósea relacionada con cáncer, pérdida ósea por ablación hormonal, mieloma múltiple, pérdida ósea inducida por fármacos, anorexia nerviosa, pérdida de hueso facial asociada a enfermedad, pérdida de hueso craneal asociada a enfermedad, pérdida de hueso de la mandíbula asociada a enfermedad, pérdida de hueso del cráneo asociada a enfermedad, pérdida ósea asociada al envejecimiento, pérdida de hueso facial asociada al envejecimiento, pérdida de hueso craneal asociada al envejecimiento, pérdida de hueso de la mandíbula asociada al envejecimiento, pérdida de hueso craneal asociada al envejecimiento, o pérdida ósea asociada a viaje al espacio.

Las formulaciones descritas en el presente documento, en algunas realizaciones, son útiles para mejorar los resultados en procedimientos ortopédicos, procedimientos dentales, cirugía de implante, sustitución de articulación, injerto de hueso, cirugía cosmética ósea y reparación ósea tal como consolidación de fracturas, consolidación de pseudoartrosis, retraso de consolidación y reconstrucción facial. Una o más formulaciones pueden administrarse antes, durante y/o después del procedimiento, sustitución, injerto, cirugía o reparación.

Tales métodos pueden comprender administrar una formulación en una cantidad terapéuticamente eficaz, por ejemplo una cantidad eficaz para mejorar la densidad ósea, y pueden comprender además administrar un segundo agente terapéutico.

En el presente documento también se desvela un vial, kit o recipiente, por ejemplo una jeringa precargada o dispositivo de inyección, que comprende una formulación descrita en el presente documento y opcionalmente una etiqueta que comprende instrucciones para usar el volumen apropiado o cantidad de formulación necesario para lograr una dosis de aproximadamente 0,5-20 mg/kg, o 0,5-10 mg/kg de peso corporal del paciente.

Debe entenderse que aunque diversas realizaciones en la memoria descriptiva se presentan usando el lenguaje "que comprende", bajo diversas circunstancias, también puede describirse una realización relacionada usando el lenguaje "que consiste en" o "que consiste esencialmente en". Debe observarse que el término "un" o "una" se refiere a uno o más, por ejemplo, se entiende que "una molécula de inmunoglobulina" representa una o más moléculas de inmunoglobulina. Como tales, los términos "un" (o "una"), "uno o más", y "al menos uno" pueden usarse indistintamente en el presente documento.

Debe también entenderse que cuando se describe un intervalo de valores, la característica que se describe podría ser un valor individual encontrado dentro del intervalo. Por ejemplo, "un pH de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 6" podrían ser, pero no se limita a, pH 4, 4,2, 4,6, 5,1, 5,5, etc., y cualquier valor entre tales valores. Adicionalmente, no debe interpretarse que "un pH de aproximadamente pH 4 a aproximadamente pH 6" signifique que el pH de una formulación en cuestión varía 2 unidades de pH en el intervalo de pH 4 a pH 6 durante el almacenamiento, sino que puede elegirse un valor en ese intervalo para el pH de la solución, y el pH sigue tamponado a aproximadamente ese pH. En algunas realizaciones, cuando se usa el término "aproximadamente", significa el número citado más o menos el 5 %, 10 %, 15 % o más de ese número citado. La variación real prevista es determinable del contexto.

En cualquiera de los intervalos descritos en el presente documento, los puntos extremos del intervalo están incluidos en el intervalo. Sin embargo, la descripción también contempla los mismos intervalos en los que se excluye el punto extremo más bajo y/o el más alto. Características y variaciones adicionales de la invención serán evidentes para aquellos expertos en la materia a partir de la totalidad de la presente solicitud, que incluye el dibujo y la descripción detallada, y todas esas características se entienden como aspectos de la invención. Asimismo, las características de la invención descritas en el presente documento pueden recombinarse en realizaciones adicionales que también están previstas como aspectos de la invención, independientemente de si la combinación de características se menciona específicamente anteriormente como un aspecto o realización de la invención. Por tanto, solo tales limitaciones que se describen en el presente documento como críticas a la invención se considerarían como tales; las variaciones de la invención que carecen de limitaciones que no se han descrito en el presente documento como críticas se consideran aspectos de la invención.

## Descripción detallada

En el presente documento se describen formulaciones que comprenden altas concentraciones de anticuerpo que contienen sales de calcio y/o sales de acetato o tampones para reducir la viscosidad, métodos de uso de estas formulaciones y recipientes o kits que comprenden estas formulaciones.

### I. Anticuerpos en la formulación

En algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo anti-esclerostina en la formulación está presente a una concentración de al menos aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 71 mg/ml, aproximadamente 72 mg/ml, aproximadamente 73 mg/ml, aproximadamente 74 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 76 mg/ml, aproximadamente 77 mg/ml, aproximadamente 78 mg/ml, aproximadamente 79 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 81 mg/ml, aproximadamente 82 mg/ml, aproximadamente 83 mg/ml, aproximadamente 84 mg/ml, aproximadamente 85 mg/ml, aproximadamente 86 mg/ml, aproximadamente 87 mg/ml, aproximadamente 88 mg/ml, aproximadamente 89 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 91 mg/ml, aproximadamente 92 mg/ml, aproximadamente 93 mg/ml, aproximadamente 94 mg/ml, aproximadamente 95 mg/ml, aproximadamente 96 mg/ml, aproximadamente 97 mg/ml, aproximadamente 98 mg/ml, aproximadamente 99 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 101 mg/ml, aproximadamente 102 mg/ml, aproximadamente 103 mg/ml, aproximadamente 104 mg/ml, aproximadamente 105 mg/ml, aproximadamente 106 mg/ml, aproximadamente 107 mg/ml, aproximadamente 108 mg/ml, aproximadamente 109 mg/ml, aproximadamente 110 mg/ml, aproximadamente 111 mg/ml, aproximadamente 112 mg/ml, aproximadamente 113 mg/ml, aproximadamente 114 mg/ml, aproximadamente 115 mg/ml, aproximadamente 116 mg/ml, aproximadamente 117 mg/ml, aproximadamente 118 mg/ml, aproximadamente 119 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 121 mg/ml, aproximadamente 122 mg/ml, aproximadamente 123 mg/ml, aproximadamente 124 mg/ml, aproximadamente 125 mg/ml, aproximadamente 126 mg/ml, aproximadamente 127 mg/ml, aproximadamente 128 mg/ml, aproximadamente 129 mg/ml, aproximadamente 130 mg/ml, aproximadamente 131 mg/ml, aproximadamente 132 mg/ml, aproximadamente 133 mg/ml, aproximadamente 134 mg/ml, aproximadamente 135 mg/ml, aproximadamente 136 mg/ml, aproximadamente 137 mg/ml, aproximadamente 138 mg/ml, aproximadamente 139 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 141 mg/ml, aproximadamente 142 mg/ml, aproximadamente 143 mg/ml, aproximadamente 144 mg/ml, aproximadamente 145 mg/ml, aproximadamente 146 mg/ml, aproximadamente 147 mg/ml, aproximadamente 148 mg/ml, aproximadamente 149 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 151 mg/ml, aproximadamente 152 mg/ml, aproximadamente 153 mg/ml, aproximadamente 154 mg/ml, aproximadamente 155 mg/ml, aproximadamente 156 mg/ml, aproximadamente 157 mg/ml, aproximadamente 158 mg/ml, aproximadamente 159 mg/ml, o aproximadamente 160 mg/ml, y puede oscilar hasta, por ejemplo, aproximadamente 300 mg/ml, aproximadamente 290 mg/ml, aproximadamente 280 mg/ml, aproximadamente 270 mg/ml, aproximadamente 260 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 240 mg/ml, aproximadamente 230 mg/ml, aproximadamente 220 mg/ml, aproximadamente 210 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, o aproximadamente 170 mg/ml. Se contempla cualquier intervalo se integre una combinación de los anteriores valores extremos, que incluye, pero no se limita a: aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 250 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, o aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml.

Los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 y Ab-24 se describieron previamente en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. N.º 2007/0110747.

Los anticuerpos anti-esclerostina descritos en el presente documento se unen a esclerostina de SEQ ID NO: 1 con una  $K_D$  de  $10^{-6}$  o menos, o  $10^{-7}$  o menos, o  $10^{-8}$  o menos, o  $10^{-9}$  o menos (significando números más bajos afinidad de unión más alta). La afinidad puede determinarse mediante cualquier medio conocido en la técnica, que incluye mediante tecnología Biacore.

En algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo comprende la cadena pesada y/o ligera de cualquiera de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-15, Ab-16, Ab-19, Ab-23 o Ab-24. Las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa madura de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-19, Ab-23 y Ab-24, que incluyen la región constante, se exponen en SEQ ID NOs: 8, 22, 32, 42, 52, 62, 80, 88, 98, 108, 118, 128, 138, 148, 166, 176, 184, 70, 210 222 y 246, respectivamente. Las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa madura de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-15, Ab-16, Ab-19, Ab-23 y Ab-24, que incluyen la región constante, se exponen en SEQ ID NOs: 10, 24, 34, 44, 54, 64, 82, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 168, 178, 186, 72, 224 y 248.

Secuencias de ADNc correspondientes que codifican la cadena ligera de longitud completa de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-15, Ab-16, Ab-19, Ab-23 y Ab-24, que incluyen la región constante, se exponen en SEQ ID NOs: 7, 21, 31, 41, 51, 61, 79, 87, 97, 107, 117, 127, 137, 147, 165, 175, 183, 69, 209, 221 y 245, respectivamente. Secuencias de ADNc correspondientes que codifican la cadena pesada de longitud completa, que incluyen la región constante de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-15, Ab-16, Ab-19, Ab-23 y Ab-24, se exponen en SEQ ID NOs: 9, 23, 33, 43, 53, 63, 81, 89, 99, 109, 119, 129, 139, 149, 167, 177, 185, 71, 211, 223 y 247, respectivamente.

En otras realizaciones de la divulgación, el anticuerpo comprende la región variable de la cadena pesada y/o ligera de cualquiera de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-19, Ab-21, Ab-23 o Ab-24. Por ejemplo, el anticuerpo comprende SEQ ID NO: 14 (región variable de la cadena pesada de Ab-1), y/o SEQ ID NO: 12 (región variable de la cadena ligera de Ab-1); SEQ ID NO: 68 (región variable de la cadena pesada de Ab-15), y/o SEQ ID NO: 66 (región variable de la cadena ligera de Ab-15); o SEQ ID NO: 86 (región variable de la cadena pesada de Ab-5), y/o SEQ ID NO: 84 (región variable de la cadena ligera de Ab-5); o SEQ ID NO: 154 (región variable de la cadena pesada de Ab-16), y/o SEQ ID NO: 152 (región variable de la cadena ligera de Ab-16); o SEQ ID NO: 182 (región variable de la cadena pesada de Ab-14) y/o SEQ ID NO: 180 (región variable de la cadena ligera de Ab-14); o SEQ ID NO: 208 (región variable de la cadena pesada de Ab-19) y/o SEQ ID NO: 207 (región variable de la cadena ligera de Ab-19); o SEQ ID NO: 216 (región variable de la cadena pesada de Ab-20) y/o SEQ ID NO: 214 (región variable de la cadena ligera de Ab-20); o SEQ ID NO: 220 (región variable de la cadena pesada de Ab-23) y/o SEQ ID NO: 218 (región variable de la cadena ligera de Ab-23); o SEQ ID NO: 238 (región variable de la cadena pesada de Ab-22) y/o SEQ ID NO: 236 (región variable de la cadena ligera de Ab-22).

En algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR expuestas en SEQ ID NOs: 1-5 (CDR de Ab-A y Ab-1), o 15-20 (CDR de Ab-B), o 25-30 (CDR de Ab-C), o 35-40 (CDR de Ab-D), o 45-50 (CDR de Ab-2), o 55-60 (CDR de Ab-3 y Ab-15), o 73-78 (CDR de Ab-4 y Ab-5), o 91-96 (CDR de Ab-6), o 101-106 (CDR de Ab-7), o 111-116 (CDR de Ab-8), o 121-126 (CDR de Ab-9), o 131-136 (CDR de Ab-10), o 141-146 (CDR de Ab-11 y Ab-16), o 159-164 (CDR de Ab-12), o 169-174 (CDR de Ab-13 y Ab-14), o 187-192 (CDR de Ab-17 y Ab-18), o 201-206 (CDR de Ab-19, Ab-20 y Ab-23), o 225-229 (CDR de Ab-21 y Ab-22), o 239-244 (CDR de Ab-24).

En algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo comprende secuencias de aminoácidos obtenibles expresando en células huésped de mamífero el ADNc que codifica la cadena pesada y/o ligera, o alternativamente la región variable de la cadena pesada y/o ligera, de cualquiera de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-15, Ab-16, Ab-19, Ab-23 o Ab-24, como se describe en el presente documento. En cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, en algunas realizaciones, el anticuerpo es una inmunoglobulina tetrámera que consiste en dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras.

En algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cualquiera de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-15, Ab-16, Ab-19, Ab-23 o Ab-24, y comprende una cadena pesada y/o ligera que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-15, Ab-16, Ab-19, Ab-23 o Ab-24, respectivamente. En algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo comprende las CDR de cualquiera de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-15, Ab-16, Ab-19, Ab-23 o Ab-24, y comprende una cadena pesada y/o ligera que comprende una secuencia de aminoácidos al menos el 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o el 99 % idéntica a la región variable de la cadena pesada y/o ligera del anticuerpo Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-15, Ab-16, Ab-19, Ab-23 o Ab-24, respectivamente.

En algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo:

1) retiene una cualquiera, dos, tres, cuatro, cinco, o seis de CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 y/o CDRL3 de cualquiera de los anticuerpos Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 o Ab-24, que opcionalmente incluye una o dos mutaciones en tal(es) CDR(s),

2) retiene todas de CDRH1, CDRH2, CDRH3, o la región variable de la cadena pesada de, cualquiera del anticuerpo Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 o Ab-24, que opcionalmente incluye una o dos mutaciones en tal(es) CDR(s),

3) retiene todas de CDRL1, CDRL2, CDRL3, o la región variable de la cadena ligera de, cualquiera del anticuerpo Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 o Ab-24, que opcionalmente incluye una o dos mutaciones en tal(es) CDR(s),

4) se une al mismo epítipo de esclerostina que el anticuerpo Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 o Ab-24, por ejemplo como se determina mediante cristalografía de rayos X, o un aminoácido dentro de un bucle formado por los aminoácidos 86-111 de SEQ ID NO: 249; y/o

5) compite con el anticuerpo Ab-A, Ab-B, Ab-C, Ab-D, Ab-1, Ab-2, Ab-3, Ab-4, Ab-5, Ab-6, Ab-7, Ab-8, Ab-9, Ab-

10, Ab-11, Ab-12, Ab-13, Ab-14, Ab-15, Ab-16, Ab-17, Ab-18, Ab-19, Ab-20, Ab-21, Ab-22, Ab-23 o Ab-24 por unirse a esclerostina por más de aproximadamente el 75 %, más de aproximadamente el 80 %, o más de aproximadamente el 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 % o el 95 %.

5 En algunas realizaciones de la divulgación, el anticuerpo comprende las tres CDR de cadena ligera, la región variable de la cadena ligera madura, las tres CDR de cadena pesada, la región variable de la cadena pesada madura, las seis CDR, o tanto la región variable de la cadena ligera madura como de la cadena pesada madura. En algunas realizaciones a modo de ejemplo de la divulgación, dos CDR de cadena ligera de un anticuerpo pueden combinarse con una tercera CDR de cadena ligera de un anticuerpo diferente. Alternativamente, una CDRL1 de un anticuerpo puede combinarse con una CDRL2 de un anticuerpo diferente y una CDRL3 de otro anticuerpo más, particularmente donde las CDR son altamente homólogas. Similarmente, dos CDR de cadena pesada de un anticuerpo pueden combinarse con una tercera CDR de cadena pesada de un anticuerpo diferente; o una CDRH1 de un anticuerpo puede combinarse con una CDRH2 de un anticuerpo diferente y una CDRH3 de otro anticuerpo más, particularmente donde las CDR son altamente homólogas.

20 El término "anticuerpo" se refiere a un anticuerpo intacto o un fragmento de unión del mismo. Un anticuerpo puede comprender una molécula de anticuerpo completo (incluyendo versiones policlonales, monoclonales, quiméricas, humanizadas o humanas que tienen cadenas pesadas y/o ligeras de longitud completa), o comprenden un fragmento de unión al antígeno del mismo. Fragmentos de anticuerpos incluyen fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, Fab, Fab', Fv, Fc y Fd, y pueden incorporarse en anticuerpos de un solo dominio, anticuerpos monocatenarios, maxicuerpos, minicuerpos, intracuerpos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, v-NAR y bis-scFv (véase, por ejemplo, Hollinger y Hudson, Nature Biotechnology, 23(9):1 126-1136 (2005)).

25 Un anticuerpo "aislado" se refiere a un anticuerpo, como ese término se define en el presente documento, que se ha identificado y separado de un componente de su entorno natural. Componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con usos de diagnóstico o terapéuticos para el anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En ciertas realizaciones, el anticuerpo se purificará (1) a más del 95 % en peso de anticuerpo, y lo más preferentemente más del 99 % en peso, (2) a un grado suficiente para obtener al menos 15 restos del extremo N o secuencia de aminoácidos interna, o (3) a homogeneidad por SDS-PAGE bajo condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferentemente, tinción con plata. Anticuerpo aislado que existe de forma natural incluye el anticuerpo *in situ* dentro de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Generalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará por al menos una etapa de purificación.

35 Una "inmunoglobulina" o "anticuerpo nativo" es una glucoproteína tetrámera. En una inmunoglobulina que existe de forma natural, cada tetrámero está compuesto por dos pares de cadenas de polipéptidos idénticas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kDa) y una "pesada" (aproximadamente 50-70 kDa). La porción del extremo amino de cada cadena incluye una región "variable" ("V") de aproximadamente 100 a 110 o más aminoácidos, principalmente responsable del reconocimiento del antígeno. La porción del extremo carboxi de cada cadena define una región constante principalmente responsable de la función efectora. Las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas. Cadenas pesadas se clasifican como mu ( $\mu$ ), delta ( $\Delta$ ), gamma ( $\gamma$ ), alfa ( $\alpha$ ) y épsilon ( $\epsilon$ ), y definen el isotipo del anticuerpo como IgM, IgD, IgG, IgA e IgE, respectivamente. Varios de estos pueden dividirse además en subclases o isotipos, por ejemplo IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2. Diferentes isotipos tienen diferentes funciones efectoras; por ejemplo, los isotipos IgG1 e IgG3 tienen actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC). Las cadenas ligeras humanas se clasifican como cadenas ligeras kappa ( $\kappa$ ) y lambda ( $\lambda$ ). Dentro de las cadenas ligeras y pesadas, las regiones variables y constantes se unen por una región "J" de aproximadamente 12 o más aminoácidos, incluyendo la cadena pesada también una región "D" de aproximadamente 10 más aminoácidos. Véase generalmente Fundamental Immunology, Cap. 7 (Paul, W., ed., 2ª ed. Raven Press, N.Y. (1989)).

50 Los alotipos son variaciones en la secuencia de anticuerpos, frecuentemente en la región constante, que pueden ser inmunogénicas y están codificadas por alelos específicos en seres humanos. Se han identificado alotipos para cinco de los genes IGHC humanos, los genesIGHG1, IGHG2, IGHG3, IGHA2 e IGHE, y se designan alotipos G1m, G2m, G3m, A2m y Em, respectivamente. Se conocen al menos 18 alotipos Gm: nG1m(1), nG1m(2), G1m (1, 2, 3, 17) o G1m (a, x, f, z), G2m (23) o G2m (n), G3m (5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28) o G3m (b1, c3, b5, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5). Hay dos alotipos A2m, A2m(1) y A2m(2).

60 El término región "hipervariable" se refiere a restos de aminoácidos de una región determinante de la complementariedad o CDR (es decir, restos 24-34 (L1), 50-56 (L2) y 89-97 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 31-35 (H1), 50-65 (H2) y 95-102 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada como se describe por Kabat *et al.*, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). Incluso una única CDR puede reconocer y unirse al antígeno, aunque con una afinidad más baja que el sitio de unión al antígeno entero que contiene todas las CDR.

65 Una definición alternativa de restos de un "bucle" hipervariable se describe por Chothia *et al.*, J. Mol. Biol. 196: 901-

917 (1987) como los restos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena ligera y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada.

Restos de la "región marco" o FR son aquellos restos de la región variable distintos de los restos de la región hipervariable.

"Fragmentos de anticuerpos" comprenden una porción de una inmunoglobulina intacta, preferentemente una región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto, e incluyen anticuerpos multiespecíficos (biespecíficos, triespecíficos, etc.) formados a partir de fragmentos de anticuerpos. Pueden producirse fragmentos de inmunoglobulinas por técnicas de ADN recombinante o por escisión enzimática o química de anticuerpos intactos.

Ejemplos no limitantes de fragmentos de anticuerpos incluyen Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fv (región variable), anticuerpos de dominio (dAb, que contienen un dominio VH) (Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989), fragmentos de la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos monocatenarios (scFv, que contienen dominios VH y VL en una única cadena de polipéptidos) (Bird *et al.*, Science 242:423-426, 1988, y Huston *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883, 1988, que opcionalmente incluyen un conector polipeptídico; y opcionalmente multiespecífico, Gruber *et al.*, J. Immunol. 152: 5368 (1994)), fragmentos de una sola cadena de anticuerpos, diacuerpos (dominios VH y VL en una única cadena de polipéptidos que se emparejan con dominios VL y VH complementarios de otra cadena) (documentos EP 404.097; WO 93/11161; y Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993)), triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos (scFv fusionado con CH3 mediante un conector peptídico (sin bisagra) o mediante una bisagra de IgG) (Olafsen, *et al.*, Protein Eng Des Sel. 2004 Apr;17(4):315-23), anticuerpos lineales (segmentos de Fd en tándem (VH -CH1-VH -CH1) (Zapata *et al.*, Protein Eng, 8(10):1057-1062 (1995)); anticuerpos recombinantes quelantes (crAb, que pueden unirse a dos epítomos adyacentes sobre el mismo antígeno) (Neri *et al.*, J Mol Biol. 246:367-73, 1995), bicuerpos (Fab-scFv biespecíficos) o tricuerpos (Fab-(scFv)<sub>2</sub> triespecíficos) (Schoonjans *et al.*, J Immunol. 165:7050-57, 2000; Willems *et al.*, J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 786:161-76, 2003), intracuerpos (Biocca, *et al.*, EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 101:17616-21, 2004) que también pueden comprender secuencias señal celulares que retienen o dirigen el anticuerpo intracelularmente (Mhashilkar *et al.*, EMBO J 14:1542-51, 1995; Wheeler *et al.*, FASEB J. 17:1733-5, 2003), transcuerpos (anticuerpos permeables a célula que contienen un dominio de transducción de proteína (PTD) fusionado con scFv (Heng *et al.*, Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005), nanocuerpos (dominio variable de aproximadamente 15 kDa de la cadena pesada) (Cortez-Retamozo *et al.*, Cancer Research 64:2853-57, 2004), productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños (SMIP) (WO03/041600, publicación de patente de EE.UU. 20030133939 y publicación de patente de EE.UU. 20030118592), una proteína de fusión de dominio de unión al antígeno-inmunoglobulina, un anticuerpo camelizado (en el que VH se recombina con una región constante que contiene dominios de bisagra, CH1, CH2 y CH3) (Desmyter *et al.*, J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001; Ewert *et al.*, Biochemistry 41:3628-36, 2002; publicaciones de patente de EE.UU. N.º 20050136049 y 20050037421), un anticuerpo que contiene VHH, anticuerpos de cadena pesada (HCAb, homodímeros de dos cadenas pesadas que tienen la estructura H2L2), o variantes o derivados de los mismos, y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para conferir unión de antígeno específica al polipéptido, tal como una secuencia de CDR, en tanto que el anticuerpo retenga la actividad biológica deseada.

El término "variante", cuando se usa a propósito de anticuerpos, se refiere a una secuencia de polipéptidos de un anticuerpo que contiene al menos una sustitución, delección o inserción de aminoácidos en la región variable o la porción equivalente a la región variable, a condición de que la variante retenga la afinidad de unión deseada o actividad biológica. Además, los anticuerpos como se describen en el presente documento pueden tener modificaciones de aminoácidos en la región constante para modificar la función efectora del anticuerpo, que incluyen semivida o eliminación, actividad de ADCC y/o CDC. Tales modificaciones pueden potenciar la farmacocinética o potenciar la eficacia del anticuerpo en el tratamiento, por ejemplo, del cáncer. Véase Shields *et al.*, J. Biol. Chem., 276(9):6591-6604 (2001). En el caso de IgG1, modificaciones a la región constante, particularmente la región bisagra o CH2, pueden aumentar o disminuir la función efectora, que incluye actividad de ADCC y/o CDC. Una región constante de IgG2 puede modificarse para reducir la formación de agregados anticuerpo-antígeno. En el caso de IgG4, las modificaciones a la región constante, particularmente la región bisagra, pueden reducir la formación de semi-anticuerpos.

El término "modificación", cuando se usa a propósito de los anticuerpos o polipéptidos descritos en el presente documento, incluye, pero no se limita a, cambio de uno o más aminoácidos (incluyendo sustituciones, inserciones o delecciones); modificaciones químicas que no interfieren con la actividad de unión de hepcidina; modificación covalente por conjugación a agentes terapéuticos o de diagnóstico; marcado (por ejemplo, con radionúclidos o diversas enzimas); unión de polímero covalente tal como pegilación (derivatización con polietilenglicol) e inserción o sustitución por síntesis química de aminoácidos no naturales. Los polipéptidos modificados (que incluyen anticuerpos) pueden retener las propiedades de unión de moléculas no modificadas de la invención.

El término "derivado", cuando se usa a propósito de anticuerpos o polipéptidos de la invención, se refiere a anticuerpos o polipéptidos que son covalentemente modificados por conjugación con agentes terapéuticos o de diagnóstico, marcado (por ejemplo, con radionúclidos o diversas enzimas), unión de polímero covalente tal como pegilación (derivatización con polietilenglicol) e inserción o sustitución por síntesis química de aminoácidos no naturales. Los

derivados pueden retener las propiedades de unión de moléculas no derivatizadas de la invención.

Métodos de preparación de anticuerpos biespecíficos u otros multiespecíficos son conocidos en la técnica e incluyen reticulación química, uso de cremalleras de leucina [Kostelny *et al.*, J. Immunol. 148:1547-1553, 1992]; tecnología de diacuerpos [Hollinger *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48, 1993]; dímeros scFv [Gruber *et al.*, J. Immunol. 152: 5368, 1994], anticuerpos lineales [Zapata *et al.*, Protein Eng. 8:1057-62, 1995]; y anticuerpos recombinantes quelantes [Neri *et al.*, J Mol Biol. 246:367-73, 1995].

Pueden conjugarse proteínas y agentes no de proteína con los anticuerpos por métodos que son conocidos en la técnica. Los métodos de conjugación incluyen enlace directo, enlace mediante conectores covalentemente unidos y miembros de pares de unión específica (por ejemplo, avidina-biotina). Tales métodos incluyen, por ejemplo, el descrito por Greenfield *et al.*, Cancer Research 50, 6600-6607 (1990) para la conjugación de doxorubicina y aquellos descritos por Arnon *et al.*, Adv. Exp. Med. Biol. 303, 79-90 (1991) y por Kiseleva *et al.*, Mol. Biol. (USSR) 25, 508-514 (1991) para la conjugación de compuestos de platino.

Los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos descritos en el presente documento pueden obtenerse, por ejemplo, a partir de anticuerpos que existen de forma natural, o bibliotecas de presentación en fagos de Fab o scFv. La expresión "anticuerpo humanizado" se refiere a un anticuerpo derivado de una secuencia de un anticuerpo no humano, normalmente un anticuerpo monoclonal de roedor, que comprende modificaciones que convierten la secuencia en más similar a humana. Alternativamente, un anticuerpo humanizado puede derivarse de un anticuerpo quimérico.

Fragmentos de anticuerpos incluyen fragmento de anticuerpo de dominio (dAb) (Ward *et al.*, Nature 341:544-546, 1989) que consiste en un dominio V<sub>H</sub>, "anticuerpos lineales" comprenden un par de segmentos Fd en tándem (V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H1</sub>) que forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o mono-específicos (Zapata *et al.* Protein Eng. 8:1057-62 (1995)); "minicuerpo" que consiste en scFv fusionado con CH3 mediante un conector peptídico (sin bisagra) o mediante una bisagra de IgG se ha descrito en Olafsen, *et al.*, Protein Eng Des Sel. 2004 Apr;17(4):315-23; "maxicuerpo" se refiere a scFv bivalentes covalentemente unidos a la región Fc de una inmunoglobulina, véase, por ejemplo, Fredericks *et al.*, Protein Engineering, Design & Selection, 17:95-106 (2004) y Powers *et al.*, Journal of Immunological Methods, 251:123-135 (2001); anticuerpos de cadena pesada, por ejemplo el dominio V<sub>H</sub>H, o H<sub>2</sub>L<sub>2</sub> (denominados "anticuerpos de cadena pesada" o "HCABs"); o V<sub>HH</sub> camelizado (véase, por ejemplo, Reichman, *et al.*, J Immunol Methods 1999, 231:25-38, Desmyter *et al.*, J. Biol. Chem. 276:26285-90, 2001, Ewert *et al.*, Biochemistry 41:3628-36, 2002; nanocuerpo (Cortez-Retamozo *et al.*, Cancer Research 64:2853-57, 2004); los intracuerpos son anticuerpos monocatenarios que demuestran expresión intracelular y pueden manipular la función de proteína intracelular (Biocca, *et al.*, EMBO J. 9:101-108, 1990; Colby *et al.*, Proc Natl Acad Sci U S A. 101:17616-21, 2004, Mhashilkar *et al.*, EMBO J 14:1542-51, 1995, Wheeler *et al.* (FASEB J. 17:1733-5, 2003); los transcuerpos son anticuerpos permeables a células en los que un dominio de transducción de proteína (PTD) está fusionado con anticuerpos de fragmento de cadena variable única (scFv) (Heng *et al.*, (Med Hypotheses. 64:1105-8, 2005); SMIP o proteínas de fusión de dominio de unión-inmunoglobulina específicas para proteínas diana son polipéptidos de una sola cadena que comprenden dominios de unión al antígeno fusionados con dominios de inmunoglobulina necesarios para llevar a cabo funciones efectoras de anticuerpos. Véase, por ejemplo, el documento WO03/041600, la publicación de patente de EE.UU. 20030133939 y la publicación de patente de EE.UU. 20030118592.

## II. Sales de calcio y acetato o tampones

Se ha encontrado que añadir concentraciones relativamente bajas de acetato de calcio a formulaciones de un anticuerpo seleccionado reduce la viscosidad de la formulación. El término "viscosidad", como se usa en el presente documento, se refiere a "viscosidad absoluta". La viscosidad absoluta, algunas veces llamada viscosidad dinámica o simple, es el producto de la viscosidad cinemática y la densidad del fluido: Viscosidad absoluta = Viscosidad cinemática x Densidad. La dimensión de la viscosidad cinemática es L<sup>2</sup>/T, donde L es una longitud y T es un tiempo. Comúnmente, la viscosidad cinemática se expresa en centistokes (cSt). La unidad del SI de la viscosidad cinemática es mM<sup>2</sup>/s, que es 1 cSt. La viscosidad absoluta se expresa en unidades de centipoise (cP). La unidad del SI de la viscosidad absoluta es el milipascal-segundo (mPa-s), donde 1 cP = 1 mPa-s.

Tales mediciones de viscosidad pueden hacerse horas (por ejemplo, 1-23 horas), días (por ejemplo, 1-10 días), semanas (por ejemplo, 1-5 semanas), o meses (por ejemplo, 1-12 meses), o años (por ejemplo, 1-2 años, 1-3 años) después de la adición de un agente reductor de la viscosidad a una formulación de anticuerpo. Las mediciones de viscosidad pueden hacerse a una temperatura de almacenamiento o de administración, por ejemplo 2-8 °C o 25 °C (temperatura ambiente). La viscosidad absoluta de la formulación líquida o líquida reconstituida a la temperatura de almacenamiento y/o de administración puede ser de 15 cP o menos, o de 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7, 6, 5 o 4 cP o menos.

En algunas realizaciones, la viscosidad de la formulación de proteína se mide antes y después de la adición de la sal de calcio y/o la sal de acetato (y/o tampón). Métodos de medición de la viscosidad son muy conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, usar un viscosímetro capilar, o un reómetro de cono-plato. Puede usarse cualquier método, siempre que se use el mismo método para comparar las formulaciones de prueba y de referencia.

La viscosidad de una formulación de anticuerpo puede reducirse mediante la adición de una sal de calcio, y/o una sal de acetato (y/o tampón) a la formulación. La viscosidad de una formulación de anticuerpo puede reducirse aproximadamente el 5 %, aproximadamente el 10 %, aproximadamente el 15 %, aproximadamente el 20 %, aproximadamente el 25 %, aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 35 %, aproximadamente el 40 %, aproximadamente el 45 %, aproximadamente el 50 %, aproximadamente el 55 %, aproximadamente el 60 %, aproximadamente el 65 %, aproximadamente el 70 %, aproximadamente el 75 %, aproximadamente el 80 %, aproximadamente el 85 %, y aproximadamente el 90 % en comparación con la viscosidad de una formulación de anticuerpo comparable que carece de la sal de calcio, y/o sal de acetato (y/o tampón).

Sales de calcio a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, acetato de calcio, carbonato cálcico y cloruro de calcio. En algunas realizaciones de la divulgación, la sal de calcio está a una concentración de al menos 0,5 mM, 1 mM, 2 mM, 3 mM, 4 mM, 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM o 10 mM. En ciertas realizaciones de la divulgación, la concentración de la sal de calcio no es superior a 11 mM, 12 mM, 13 mM, 14 mM, 15 mM, 16 mM, 17 mM, 18 mM, 19 mM, 20 mM, 21 mM, 22 mM, 23 mM, 24 mM o 25 mM. Se contempla cualquier intervalo que integre una combinación de los puntos extremos anteriores, que incluye, pero no se limita a, de aproximadamente 0,5 mM a aproximadamente 10 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM, o de 5 mM a aproximadamente 15 mM. En algunas realizaciones, la sal de calcio está presente a una concentración que reduce la viscosidad de una formulación de anticuerpo al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o más en comparación con la misma formulación de anticuerpo que carece de la sal de acetato y/o tampón, o que logra una viscosidad de 10 cP o menos, o 9, 8, 7, 6 o 5 cP o menos. En ciertas realizaciones, la sal de calcio se añade a bajas concentraciones para no afectar negativamente la formulación de proteína. Por ejemplo, a concentraciones de cloruro de calcio o cloruro de magnesio de 20 mM o mayores, las proteínas pueden formar un gel a temperaturas de almacenamiento bajas (por ejemplo, 2-8 °C). Por consiguiente, generalmente se selecciona una concentración de una sal de calcio para la que la viscosidad se reduce a la temperatura de almacenamiento prevista de la formulación de viscosidad reducida.

En todos los intervalos descritos en el presente documento, la concentración de catión, anión o sal descrita es la concentración final en el líquido o formulación líquida reconstituida que va a administrarse. En cualquiera de los intervalos descritos en el presente documento, los puntos extremos del intervalo están incluidos en el intervalo. Sin embargo, la descripción también contempla los mismos intervalos en los que se excluye el punto extremo más bajo y/o el más alto.

En algunas realizaciones, una formulación descrita en el presente documento comprende además, además de la sal de calcio, un tampón acetato a una concentración de al menos 5 mM, 6 mM, 7 mM, 8 mM, 9 mM, 10 mM o 15 mM. En algunas realizaciones, la concentración es no superior a 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM o 50 mM. Se contempla cualquier intervalo que integre una combinación de los puntos extremos anteriores, que incluye, pero no se limita a, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 15 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 10 mM. El tampón se añade preferentemente a una concentración que mantiene el pH a aproximadamente 5-6 o 5-5,5 o 4,5-5,5. Cuando la sal de calcio en la formulación es acetato de calcio, en algunas realizaciones, la concentración total de acetato es aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM.

En algunos aspectos, la formulación comprende una concentración total de acetato que es al menos aproximadamente 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM o 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración de acetato es no superior a aproximadamente 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, 80 mM, 85 mM o 90 mM. Se contempla cualquier intervalo que integre una combinación de los puntos extremos anteriores, que incluye, pero no se limita a: aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 50 mM, aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, aproximadamente 30 mM a aproximadamente 50 mM, o aproximadamente 30 mM a aproximadamente 75 mM. En algunas realizaciones, la sal de acetato o tampón comprende acetato de calcio y/o acetato sódico. Alternativamente, en algunas realizaciones, la sal de acetato y/o tampón está presente a una concentración que reduce la viscosidad de una formulación de anticuerpo al menos el 30 %, 40 %, 50 %, 60 % o más en comparación con la misma formulación de anticuerpo que carece de la sal de acetato y/o tampón, o que logra una viscosidad de 10 cP o menos, o 9, 8, 7, 6 o 5 cP o menos. A modo de ejemplo no limitante, una solución que contiene acetato de calcio 10 mM tendrá anión acetato 20 mM y 10 mM de catión calcio, debido a la naturaleza divalente del catión calcio, mientras que una solución que contiene acetato sódico 10 mM tendrá catión sodio 10 mM y anión acetato 10 mM.

En algunas realizaciones de la divulgación, la concentración total de iones (cationes y aniones) en solución es al menos 10 mM, 15 mM, 20 mM, 25 mM, 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, 80 mM o 85 mM. En algunas realizaciones de la divulgación, la concentración total de iones es no superior a aproximadamente 30 mM, 35 mM, 40 mM, 45 mM, 50 mM, 55 mM, 60 mM, 65 mM, 70 mM, 75 mM, 80 mM, 85 mM, 90 mM, 95 mM, 100 mM, 110 mM, 120 mM, 130 mM, 140 mM, 150 mM, 160 mM, 170 mM, 180 mM, 190 mM o 200 mM. Se contempla cualquier intervalo que integre una combinación de los puntos extremos anteriores, que incluye, pero no se limita a: aproximadamente 30 mM a aproximadamente 60 mM, o aproximadamente 30 mM a aproximadamente 70 mM, o aproximadamente 30 mM a aproximadamente 80 mM, o aproximadamente 40 mM a aproximadamente 150 mM, o aproximadamente 50 mM a aproximadamente 150 mM. A modo de ejemplo no limitante,

una solución de acetato de calcio 10 mM tendrá una concentración total 30 mM de iones (cationes 10 mM y aniones 20 mM).

5 En cualquiera de las formulaciones descritas en el presente documento, en algunas realizaciones, la osmolaridad total es no superior a 500 mOsm/l, 450 mOsm/l, 400 mOsm/l, o 350 mOsm/l, y es preferentemente próxima a isotónica, por ejemplo 250-350 mOsm/l.

10 Otros excipientes conocidos en la técnica o descritos en el presente documento pueden incluirse además en la formulación.

### 10 III. Excipientes en la formulación

15 Las formulaciones de proteína se administran generalmente por vía parenteral. Cuando se administran por vía parenteral, deben ser estériles. Diluyentes estériles incluyen líquidos que son farmacéuticamente aceptables (seguros y no tóxicos para administración a un ser humano) y útiles para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida después de la liofilización. Diluyentes a modo de ejemplo incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución de pH tamponado (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. Los diluyentes pueden incluir soluciones acuosas de sales y/o tampones.

20 Los excipientes son aditivos que están incluidos en una formulación debido a que tanto confieren como potencian la estabilidad, administración y capacidad de fabricación de un medicamento. Independientemente del motivo para su inclusión, los excipientes son un componente esencial de un medicamento y, por tanto, necesitan ser seguros y bien tolerados por los pacientes. Para fármacos de proteína, la elección de excipientes es particularmente importante debido a que pueden afectar tanto la eficacia como la inmunogenicidad del fármaco. Por lo tanto, necesitan desarrollarse formulaciones de proteína con selección apropiada de excipientes que proporcionen estabilidad, seguridad y perspectivas de comercialización adecuadas.

30 Los excipientes en el presente documento se describen organizados tanto por su tipo químico como su función funcional en las formulaciones. Se proporcionan descripciones breves de los modos de estabilización cuando se trata cada tipo de excipiente. Dadas las enseñanzas y orientación proporcionada en el presente documento, aquellos expertos en la materia serán fácilmente capaces de variar la cantidad o intervalo de excipiente sin aumentar la viscosidad a un nivel no deseable. Los excipientes pueden elegirse para lograr una osmolaridad deseada (es decir, isotónica, hipotónica o hipertónica) de la disolución final, pH, estabilidad deseada, resistencia a la agregación o degradación o precipitación, protección en condiciones de congelación, liofilización o altas temperaturas, u otras propiedades. Se conocen en la técnica una variedad de tipos de excipientes. Excipientes a modo de ejemplo incluyen sales, aminoácidos, otros agentes de tonicidad, tensioactivos, estabilizadores, agentes de carga, crioprotectores, lioprotectores, antioxidantes, iones metálicos, agentes quelantes y/o conservantes.

40 Además, donde se informa de un excipiente particular en una formulación por, por ejemplo, porcentaje (%) en peso/volumen, aquellos expertos en la materia reconocerán que también se contempla la concentración molar equivalente de ese excipiente.

#### 45 A. Tampones

El intervalo de pH de estabilidad óptima necesita identificarse pronto durante los estudios de pre-formulación. Varios enfoques, tales como estudios de estabilidad acelerada y estudios de cribado calorimétrico, han demostrado ser útiles en este esfuerzo (Remmele R.L. Jr., *et al.*, *Biochemistry*, 38(16): 5241-7 (1999)). Una vez se finaliza una formulación, el medicamento debe fabricarse y mantenerse dentro de una especificación predefinida durante toda su estabilidad en almacén. Por lo tanto, casi siempre se emplean agentes de tamponamiento para controlar el pH en la formulación.

55 Se han empleado rutinariamente ácidos orgánicos, fosfatos y Tris como tampones en formulaciones de proteína (Tabla 1). La capacidad del tampón de las especies de tamponamiento es máxima a un pH igual al pKa y disminuye a medida que aumenta el pH o disminuye lejos de este valor. El noventa por ciento de la capacidad de tamponamiento existe dentro de una unidad de pH de su pKa. La capacidad del tampón también aumenta proporcionalmente al aumentar la concentración de tampón.

60 Necesitan considerarse varios factores cuando se elige un tampón. Primero y más importante, necesitan definirse las especies de tampón y su concentración basándose en su pKa y el pH de la formulación deseado. Es igualmente importante garantizar que el tampón sea compatible con el fármaco de proteína, otros excipientes de formulación y no catalice ninguna reacción de degradación. Recientemente, se ha mostrado que tampones de carboxilato polianiónicos tales como citrato y succinato forman aductos covalentes con los restos de la cadena lateral de proteínas. Un tercer aspecto importante a considerar es la sensación de escozor e irritación que el tampón puede inducir. Por ejemplo, se sabe que el citrato produce escozor tras la inyección (Laursen T, *et al.*, *Basic Clin Pharmacol Toxicol.*, 98(2): 218-21 (2006)). Las posibilidades de escozor e irritación son mayores para fármacos que se administran mediante las vías SC o IM, donde la solución de fármaco queda en el sitio durante un periodo de tiempo relativamente más largo que

cuando se administran por vía IV, donde la formulación se diluye rápidamente en la sangre tras la administración. Para formulaciones que se administran por infusión IV directa, necesita monitorizarse la cantidad total de tampón (y cualquiera otro componente de formulación). Por ejemplo, se ha informado que los iones potasio administrados en forma del tampón fosfato de potasio pueden inducir efectos cardiovasculares en un paciente (Hollander-Rodríguez JC, *et al.*, Am. Fam. Physician., 73(2): 283-90 (2006)).

Tabla 1: Agentes de tamponamiento comúnmente usados y sus valores de  $pK_a$

Tampón	$pK_a$	Medicamento de ejemplo
Acetato	4,8	Neupogen, Neulasta
Succinato	$pK_{a1} = 4,8$ , $pK_{a2} = 5,5$	Actimmune
Citrato	$pK_{a1} = 3,1$ , $pK_{a2} = 4,8$ , $pK_{a3} = 6,4$	Humira
Histidina (imidazol)	6,0	Xolair
Fosfato	$pK_{a1} = 2,15$ , $pK_{a2} = 7,2$ , $pK_{a3} = 12,3$	Enbrel (formulación líquida)
Tris	8,1	Leucina

El sistema de tampón presente en la formulación está seleccionado para ser fisiológicamente compatible y para mantener un pH deseado.

El compuesto de tamponamiento del pH puede estar presente en cualquier cantidad adecuada para mantener el pH de formulación a un nivel predeterminado. El agente de tamponamiento del pH, por ejemplo acetato, puede estar presente a una concentración entre 0,1 mM y 1000 mM (1 M). En una realización, el agente de tamponamiento del pH es al menos 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700 o 900 mM. En otra realización, la concentración del agente de tamponamiento del pH es entre 1, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, o 90 mM y 100 mM. En otra realización adicional, la concentración del agente de tamponamiento del pH es entre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, o 40 mM y 50 mM. En otra realización más, la concentración del agente de tamponamiento del pH es 10 mM.

Otros agentes de tamponamiento del pH a modo de ejemplo usados para tamponar la formulación como se explica en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, glicina, glutamato, succinato, fosfato, acetato y aspartato. También puede usarse aminoácidos tales como histidina y ácido glutámico como agentes de tamponamiento.

#### B. Estabilizadores y agentes de carga

Los estabilizadores incluyen una clase de compuestos que puede servir de crioprotectores, lioprotectores y agentes formadores de vidrio. Los crioprotectores actúan estabilizando las proteínas durante la congelación o en el estado congelado a bajas temperaturas. Los lioprotectores estabilizan proteínas en la forma de dosificación sólida liofilizada preservando las propiedades conformacionales similares a nativas de la proteína durante las etapas de deshidratación de la liofilización. Las propiedades del estado vítreo se han clasificado como "fuertes" o "frágiles" dependiendo de sus propiedades de relajación en función de la temperatura. Es importante que los crioprotectores, lioprotectores y agentes formadores de vidrio permanezcan en la misma fase con la proteína con el fin de conferir estabilidad. Azúcares, polímeros y polioles se clasifican en esta categoría y pueden algunas veces cumplir las tres funciones.

Los polioles engloban una clase de excipientes que incluye azúcares (por ejemplo manitol, sacarosa, sorbitol) y otros alcoholes polihidroxilados (por ejemplo, glicerol y propilenglicol). El polímero polietilenglicol (PEG) está incluido en esta categoría. Los polioles se usan comúnmente como excipientes estabilizantes y/o agentes de isotonicidad en tanto formulaciones de proteína parenterales líquidas como liofilizadas. Los polioles pueden proteger a las proteínas de tanto vías de degradación físicas como químicas.

Polioles C3-C6 a modo de ejemplo incluyen propilenglicol, glicerina (glicerol), treosa, treitol, eritrosa, eritritol, ribosa, arabinosa, arabitol, lixosa, maltitol, sorbitol, sorbosa, glucosa, manosa, manitol, levulosa, dextrosa, maltosa, trehalosa, fructosa, xilitol, inositol, galactosa, xilosa, fructosa, sacarosa, 1,2,6-hexanotriol y similares. Azúcares de orden superior incluyen dextrano, propilenglicol o polietilenglicol. Azúcares reductores tales como fructosa, maltosa o galactosa oxidan más fácilmente que los azúcares no reductores. Ejemplos adicionales de alcoholes de azúcar son glucitol, maltitol, lactitol o iso-maltulosa. Lioprotectores a modo de ejemplo adicionales incluyen glicerina y gelatina, y los azúcares melibiosa, melezitosa, rafinosa, manotriosa y estaquirosa. Ejemplos de azúcares reductores incluyen glucosa, maltosa, lactosa, maltulosa, iso-maltulosa y lactulosa. Ejemplos de azúcares no reductores incluyen glucósidos no reductores de compuestos polihidroxi seleccionados de alcoholes de azúcar y otros polialcoholes de cadena lineal. Los monoglucósidos incluyen compuestos obtenidos mediante reducción de disacáridos tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa.

En algunas realizaciones, las formulaciones descritas en el presente documento también comprenden un estabilizador (o una combinación de estabilizadores) se añade a la formulación. El término "estabilizador" significa un excipiente

capaz de prevenir la agregación u otra degradación física, además de degradación química (por ejemplo, autólisis, desamidación, oxidación, etc.) en un estado acuoso y sólido. Estabilizadores que son convencionalmente empleados en composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, glicina, HCl de arginina, compuestos de poli-hidroxi, que incluyen polisacáridos tales como dextrano, almidón, hidroxietilalmidón, ciclodextrinas, N-metilpirrolideno, celulosa y ácido hialurónico, cloruro sódico, [Carpenter *et al.*, Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)]. En una realización, el estabilizador se incorpora en una concentración de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 40 % en peso/volumen. En otra realización, el estabilizador se incorpora en una concentración de al menos el 0,5, 1,2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30 o el 40 % en peso/volumen. En otra realización, el estabilizador se incorpora en una concentración de aproximadamente el 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 % a aproximadamente el 10 % en peso/volumen. En otra realización adicional, el estabilizador se incorpora en una concentración de aproximadamente el 2 % a aproximadamente el 6 % en peso/volumen. En otra realización más, el estabilizador se incorpora en una concentración de aproximadamente el 4 % en peso/volumen. En otra realización más, el estabilizador se incorpora en una concentración de aproximadamente el 6 % en peso/volumen.

Si se desea, las formulaciones también incluyen cantidades apropiadas de agentes de carga y de regulación de la osmolaridad adecuados para formar una "torta" liofilizada. Agentes de carga pueden ser tanto cristalinos (por ejemplo, manitol, glicina) como amorfos (por ejemplo, sacarosa, polímeros tales como dextrano, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa). Otros agentes de carga a modo de ejemplo incluyen lactosa, sorbitol, trehalosa o xilitol. En otra realización, el agente de carga se incorpora en una concentración de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 10 % en peso/volumen. En otra realización, el agente de carga se incorpora en una concentración de al menos el 0,2, 0,5, 0,7, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0, 5,5, 6,0, 6,5, 7,0, 7,5, 8,0, 8,5, 9,0 o el 9,5 % en peso/volumen. En otra realización más, el agente de carga está en una concentración de aproximadamente el 1, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 % al 5,0 % en peso/volumen, para producir una torta mecánicamente y farmacéuticamente estable.

### C. Tensioactivos

Las moléculas de proteínas tienen una alta tendencia a interactuar con superficies que las hacen susceptibles a la adsorción y desnaturalización en las interfases aire-líquido, vial-líquido y líquido-líquido (aceite de silicona). Se ha observado que esta vía de degradación es inversamente dependiente de la concentración de proteína y produce tanto la formación de agregados de proteína solubles e insolubles como la pérdida de proteína de la solución mediante adsorción a superficies. Además de la adsorción a la superficie del recipiente, la degradación inducida por la superficie se agrave con agitación física, como se experimentaría durante el transporte y la manipulación del producto.

Comúnmente se usan tensioactivos en formulaciones de proteína para prevenir la degradación inducida por la superficie. Los tensioactivos son moléculas anfipáticas con la capacidad de sacar fuera de competición a proteínas para posiciones interfaciales. Las porciones hidrófobas de las moléculas de tensioactivo ocupan posiciones interfaciales (por ejemplo, aire/líquido), mientras que las porciones hidrófilas de las moléculas siguen estando orientadas hacia el disolvente a granel. A concentraciones suficientes (normalmente alrededor de la concentración micelar crítica del detergente), una capa superficial de moléculas de tensioactivo sirve para prevenir que las moléculas de proteínas se adsorban en la interfase. Así, se minimiza la degradación inducida por la superficie. Los tensioactivos más comúnmente usados son ésteres de ácidos grasos de polietoxilatos de sorbitano, es decir, polisorbato 20 y polisorbato 80 (por ejemplo, Avonex®, Neupogen®, Neulasta®). Los dos se diferencian solo en la longitud de la cadena alifática que confiere carácter hidrófobo a las moléculas, C-12 y C-18, respectivamente. Por consiguiente, el polisorbato-80 es más tensioactivo y tiene una concentración micelar crítica más baja que el polisorbato-20. El tensioactivo poloxámero 188 también se ha usado en varios productos líquidos comercializados tales como Gonal-F®, Norditropin® y Ovidrel®.

Los detergentes también pueden afectar la estabilidad conformacional termodinámica de las proteínas. Nuevamente aquí, los efectos de un excipiente dado serán específicos de proteína. Por ejemplo, se ha mostrado que los polisorbatos reducen la estabilidad de algunas proteínas y aumentan la estabilidad de otras. La desestabilización por detergente de las proteínas puede racionalizarse en términos de las colas hidrófobas de las moléculas de detergente que pueden involucrarse en la unión específica con estados de proteína parcialmente o completamente desplegadas. Estos tipos de interacciones podrían producir un desplazamiento en el equilibrio conformacional hacia los estados de proteína más expandidos (es decir, aumentando la exposición de porciones hidrófobas de la molécula de proteína en complemento al polisorbato de unión). Alternativamente, si el estado nativo de proteína presenta algunas superficies hidrófobas, la unión de detergente al estado nativo puede estabilizar esa conformación.

Otro aspecto de los polisorbatos es que son inherentemente susceptibles a la degradación oxidativa. Frecuentemente, como materiales de partida, contienen cantidades suficientes de peróxidos para producir la oxidación de cadenas laterales de restos de proteína, especialmente metionina. Las posibilidades de daño oxidativo que surgen de la adición de estabilizador enfatiza el grado al que deben usarse las concentraciones eficaces más bajas de excipientes en las formulaciones. Para tensioactivos, la concentración eficaz para una proteína dada dependerá del mecanismo de estabilización. Se ha propuesto que, si el mecanismo de estabilización de tensioactivos está relacionado con prevenir la desnaturalización superficial, la concentración eficaz será aproximadamente la concentración micelar crítica del detergente. En cambio, si el mecanismo de estabilización está asociado a interacciones de detergente específicas de

proteína, la concentración de tensioactivo eficaz se relacionará con la concentración de proteína y la estequiometría de la interacción (Randolph T.W., *et al.*, *Pharm Biotechnol.*, 13:159-75 (2002)).

También pueden añadirse tensioactivos en cantidades apropiadas para prevenir el fenómeno de agregación relacionado con la superficie durante la congelación y el secado [Chang, B, *J. Pharm. Sci.* 85:1325, (1996)]. Tensioactivos a modo de ejemplo incluyen tensioactivos aniónicos, catiónicos, no iónicos, de ion bipolar y anfóteros que incluyen tensioactivos derivados de aminoácidos que existen de forma natural. Los tensioactivos aniónicos incluyen, pero no se limitan a, laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio y dioctilsulfonato de sodio, ácido quenodesoxicólico, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, dodecilsulfato de litio, sal de sodio de ácido 1-octanosulfónico, colato de sodio hidratado, desoxicolato de sodio y sal de sodio de ácido glucodesoxicólico. Los tensioactivos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio monohidratado y bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Los tensioactivos de ion bipolar incluyen, pero no se limitan a, CHAPS, CHAPSO, SB3-10 y SB3-12. Los tensioactivos no iónicos incluyen, pero no se limitan a, digitonina, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20 y TWEEN-80. En otra realización, los tensioactivos incluyen lauromacrogol 400, Polyoxyl 40 stearate, aceite de ricino hidrogenado y polioxietileno 10, 40, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, lecitina de soja y otros fosfolípidos tales como DOPC, DMPG, DMPC y DOPG; éster de ácido graso de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa.

Las formulaciones descritas en el presente documento pueden comprender además estos tensioactivos, bien individualmente o como una mezcla en diferentes relaciones. En una realización, el tensioactivo se incorpora en una concentración de aproximadamente el 0 % a aproximadamente el 5 % en peso/volumen. En otra realización, el tensioactivo se incorpora en una concentración de al menos el 0,001, 0,002, 0,005, 0,007, 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0 o el 4,5 % en peso/volumen. En otra realización, el tensioactivo se incorpora en una concentración de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 0,5 % en peso/volumen. En otra realización adicional, el tensioactivo se incorpora en una concentración de aproximadamente el 0,004, 0,005, 0,007, 0,01, 0,05 o el 0,1 % en peso/volumen a aproximadamente el 0,2 % en peso/volumen. En otra realización más, el tensioactivo se incorpora en una concentración de aproximadamente el 0,01 % a aproximadamente el 0,1 % en peso/volumen.

En algunas realizaciones, la reducción de viscosidad se logra con relativamente poco o ningún tensioactivo, por ejemplo 0,1 % o menos de tensioactivo total, o 0,05 % o menos, o 0,01 % o menos.

#### D. Aminoácidos

Los aminoácidos han encontrado un uso versátil en las formulaciones de proteína como tampones, agentes de carga, estabilizadores y antioxidantes. Se emplean histidina y ácido glutámico para tamponar formulaciones de proteína en el intervalo de pH de 5,5 - 6,5 y 4,0 - 5,5, respectivamente. El grupo imidazol de la histidina tiene un pKa = 6,0 y el grupo carboxilo de la cadena lateral de ácido glutámico tiene un pKa de 4,3, que los hace adecuados para tamponar en sus intervalos respectivos de pH. El ácido glutámico se encuentra en algunas formulaciones (por ejemplo, Stemgen®). La histidina se encuentra comúnmente en formulaciones de proteína comercializadas (por ejemplo, Xolair®, Herceptin®, Recombinate®). Proporciona una buena alternativa al citrato, un tampón que se sabe que escuece tras la inyección. De forma interesante, también se ha informado que la histidina tiene un efecto estabilizante cuando se usa a altas concentraciones en presentaciones tanto líquidas como liofilizadas (Chen B, *et al.*, *Pharm Res.*, 20(12): 1952-60 (2003)). También se observó que la histidina (hasta 60 mM) reducía la viscosidad de una formulación de alta concentración de este anticuerpo. Sin embargo, en el mismo estudio, los autores observaron una elevada agregación y decoloración en formulaciones que contenían histidina durante estudios de congelación-descongelación del anticuerpo en recipientes de acero inoxidable. Los autores atribuyeron esto a un efecto de iones hierro lixiviados de la corrosión de recipientes de acero. Otra llamada a la precaución con la histidina es que experimenta foto-oxidación en presencia de iones metálicos (Tomita M, *et al.*, *Biochemistry*, 8(12): 5149-60 (1969)). El uso de metionina como antioxidante en formulaciones parece prometedor; se ha observado que es eficaz contra varios estreses oxidativos (Lam XM, *et al.*, *J Pharm Sci.*, 86(11): 1250-5 (1997)).

Los aminoácidos glicina, prolina, serina y alanina estabilizan proteínas. La glicina también es un agente de carga comúnmente usado en formulaciones liofilizadas (por ejemplo, Neumega®, Genotropin®, Humatrope®). Se ha mostrado que la arginina es un agente eficaz en inhibir la agregación y se ha usado en tanto formulaciones líquidas como liofilizadas (por ejemplo, líquido Activase®, Avonex®, Enbrel®).

#### E. Antioxidantes

La oxidación de restos de proteína surge de varias fuentes diferentes. Más allá de la adición de antioxidantes específicos, la prevención del daño de proteínas oxidativas implica el cuidadoso control de varios factores durante todo el proceso de fabricación y almacenamiento del producto tal como oxígeno atmosférico, temperatura, exposición a luz y contaminación química. Los antioxidantes farmacéuticos más comúnmente usados son agentes reductores, secuestrantes de oxígeno/radicales libres o agentes quelantes. Los antioxidantes en formulaciones de proteína terapéutica deben ser solubles en agua y seguir siendo activos durante toda la estabilidad en almacén del producto. Agentes reductores y secuestrantes de oxígeno/radicales libres funcionan destruyendo las especies activas de

oxígeno en solución. Agentes quelantes tales como EDTA puede ser eficaces uniendo contaminantes de metales traza que promueven la formación de radicales libres. Por ejemplo, se utilizó EDTA en la formulación líquida de factor de crecimiento de fibroblastos ácido para inhibir la oxidación catalizada por iones metálicos de restos de cisteína. Se ha usado EDTA en productos comercializados como Kineret® y Ontak®.

Sin embargo, los propios antioxidantes pueden inducir otros cambios covalentes o físicos a la proteína. Se ha informado de varios de tales casos en la bibliografía. Los agentes reductores (como el glutatión) pueden producir la rotura de los enlaces disulfuro intramoleculares, que puede conducir a la reorganización de disulfuros. En presencia de iones metálicos de transición, se ha mostrado que el ácido ascórbico y EDTA promueven la oxidación de metionina en varias proteínas y péptidos (Akers MJ, and Defelippis MR. Peptides and Proteins as Parenteral Solutions. En: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard, editors. Pharmaceutical Science. Taylor and Francis, UK (1999)); Fransson J.R., J. Pharm. Sci. 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J, *et al.*, Pharm Res., 21(12): 2377-83 (2004)). Se ha informado que el tiosulfato de sodio reduce los niveles de oxidación de metionina inducida por luz y temperatura en rhuMab HER2; sin embargo, también se informó de la formación de un aducto de tiosulfato-proteína en este estudio (Lam XM, Yang JY, *et al.*, J Pharm Sci. 86(11): 1250-5 (1997)). La selección de un antioxidante apropiado se hace según los estreses y sensibilidades de la proteína específicos.

#### F. Iones metálicos

En general, no se desean iones de metales de transición en formulaciones de proteína debido a que pueden catalizar reacciones de degradación físicas y químicas en proteínas. Sin embargo, iones metálicos específicos están incluidos en formulaciones cuando son co-factores para proteínas y en formulaciones en suspensión de proteínas donde forman complejos de coordinación (por ejemplo, suspensión de cinc de insulina). Recientemente, se ha propuesto el uso de iones magnesio (10 - 120 mM) para inhibir la isomerización de ácido aspártico a ácido isoaspártico (documento WO 2004/039337).

Dos ejemplos donde los iones metálicos confieren estabilidad o elevada actividad en proteínas son desoxirribonucleasa humana (rhADNsa, Pulmozyme®) y factor VIII. En el caso de rhADNsa, los iones  $Ca^{+2}$  (hasta 100 mM) aumentaron la estabilidad de la enzima mediante un sitio de unión específica (Chen B, *et al.*, J Pharm Sci., 88(4): 477-82 (1999)). En realidad, la eliminación de iones calcio de la solución con EGTA causó un aumento en la desamidación y agregación. Sin embargo, este efecto se observó solo con iones  $Ca^{+2}$ ; se observó que otros cationes divalentes,  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ , desestabilizaron la rhADNsa. Se observaron efectos similares en factor VIII. Los iones  $Ca^{+2}$  y  $Sr^{+2}$  estabilizaron la proteína, mientras que otros como  $Mg^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$  y  $Zn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Fe^{+2}$  desestabilizaron la enzima (Fatouros, A., *et al.*, Int. J. Pharm., 155, 121-131 (1997)). En un estudio separado con el factor VIII, se observó un aumento significativo en la velocidad de agregación en presencia de iones  $Al^{+3}$  (Derrick TS, *et al.*, J. Pharm. Sci., 93(10): 2549-57 (2004)). Los autores mencionan que otros excipientes como sales de tampón están frecuentemente contaminados con iones  $Al^{+3}$  e ilustran la necesidad de usar excipientes de calidad apropiados en productos formulados.

#### G. Conservantes

Son necesarios conservantes cuando se desarrollan formulaciones parenterales multiuso que implican más de una extracción del mismo recipiente. Su función primaria es inhibir el crecimiento microbiano y garantizar la esterilidad del producto mediante la estabilidad en almacén o condiciones de uso del medicamento. Conservantes comúnmente usados incluyen fenol, alcohol bencílico, meta-cresol, alquilparabenos tales como metilparabeno o propilparabeno, cloruro de benzalconio y cloruro de bencetonio. Otros ejemplos de compuestos con actividad de conservante antimicrobiano incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametONIO. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como alcohol butílico, fenol, alcohol bencílico; catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol. Aunque los conservantes tienen una larga historia de uso, el desarrollo de formulaciones de proteína que incluyen conservantes puede ser exigente. Los conservantes casi siempre tienen un efecto desestabilizante (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha convertido en un factor importante en limitar su uso en formulaciones de proteína multi-dosis (Roy S, *et al.*, J Pharm Sci., 94(2): 382-96 (2005)).

Las presentaciones de pluma de inyección multi-uso incluyen formulaciones conservadas. Por ejemplo, están actualmente disponibles en el mercado formulaciones conservadas de hGH. Norditropin® (líquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ® (líquido, Genentech) y Genotropin (lío filizado - cartucho de cámara doble, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol mientras que Somatrop® (Eli Lilly) se formula con m-cresol.

Necesitan considerarse varios aspectos durante el desarrollo de formulaciones de formas de dosificación conservadas. Debe optimizarse la concentración de conservante eficaz en el medicamento. Esto requiere probar un conservante dado en la forma de dosificación con intervalos de concentración que confieren eficacia antimicrobiana sin comprometer la estabilidad de la proteína. Por ejemplo, se cribaron satisfactoriamente tres conservantes en el desarrollo de una formulación líquida para el receptor de interleucina-1 (tipo I), usando calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los conservantes se ordenaron jerárquicamente basándose en su impacto sobre la estabilidad a concentraciones comúnmente usadas en productos comercializados (Remmele RL Jr., *et al.*, Pharm Res., 15(2): 200-

8 (1998)).

Algunos conservantes pueden producir reacciones del sitio de inyección, que es otro factor que necesita considerarse cuando se elige un conservante. En ensayos clínicos que se basan en la evaluación de conservantes y tampones en Norditropin, se observó que la percepción de dolor era más baja en formulaciones que contenían fenol y alcohol bencílico en comparación con una formulación que contenía m-cresol (Kappelgaard A.M., Horm Res. 62 Supl. 3:98-103 (2004)). De forma interesante, de entre los conservantes comúnmente usados, el alcohol bencílico posee propiedades anestésicas (Minogue SC, y Sun DA., Anesth Analg., 100(3): 683-6 (2005)).

#### IV. Kits

Como un aspecto adicional, se describe en el presente documento son kits que comprenden una o más formulaciones descritas en el presente documento envasadas de un modo que facilita su uso para la administración a sujetos. Un kit tal puede incluir una formulación descrita en el presente documento (por ejemplo, una composición que comprende cualquiera de los anticuerpos descritos en su interior), envasada en un recipiente tal como un frasco sellado, recipiente, vial de un solo uso o multiuso, jeringa precargada o dispositivo de inyección precargado, opcionalmente con una etiqueta fijada al recipiente o incluida en el envase que describe el uso del compuesto o composición en la práctica del método. El compuesto o composición puede envasarse en una forma de dosificación unitaria. El kit puede incluir además un dispositivo adecuado para administrar la composición según una vía de administración específica. Preferentemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de un anticuerpo descrito en el presente documento o formulación descrita en el presente documento.

#### V. Dosificaciones

La pauta de dosificación implicada en un método de tratamiento de una afección descrita en el presente documento se determinará por el médico adjunto, considerando diversos factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo la edad, afección, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, tiempo de administración y otros factores clínicos. En diversos aspectos, la pauta diaria está en el intervalo de 0,1-50 mg de una preparación de anticuerpo por kilogramo de peso corporal (calculando la masa de la proteína sola, sin modificación química). En algunas realizaciones, la dosificación es aproximadamente 0,5 mg/kg a 20 mg/kg, o aproximadamente 0,5-10 mg/kg.

Las formulaciones se administran generalmente por vía parenteral, por ejemplo por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía intramuscular, mediante aerosol (administración intrapulmonar o por inhalación), o mediante depósito para liberación a largo plazo. En algunas realizaciones, la formulación se administra por vía intravenosa por un bolo inicial, seguido de una infusión continua para mantener los niveles circulantes terapéuticos de medicamento. En otras realizaciones, la formulación se administra como una dosis única. Aquellos expertos habituales en la materia optimizarán fácilmente las dosificaciones eficaces y las pautas de administración como se ha determinado por la buena práctica médica y el estado clínico del paciente individual. La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de los agentes y la vía de administración. La formulación farmacéutica óptima se determinará por un experto en la materia dependiendo de la vía de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042), páginas 1435-1712. Tales formulaciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo* y velocidad de eliminación *in vivo* de los agentes administrados. Dependiendo de la vía de administración, puede calcularse una dosis adecuada según el peso corporal, área de la superficie corporal o tamaño del órgano. El refinamiento adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento que implican cada una de las formulaciones anteriormente mencionadas se hace rutinariamente por aquellos expertos habituales en la materia sin excesiva experimentación, especialmente en vista de la información de dosificación y ensayos desvelados en el presente documento, además de los datos farmacocinéticos observados en los ensayos clínicos humanos tratados anteriormente. Dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante el uso de ensayos establecidos para determinar las dosificaciones del nivel en sangre conjuntamente con datos de respuesta a dosis apropiados. La pauta de dosificación final se determinará por el médico adjunto, considerando diversos factores que modifican la acción de fármacos, por ejemplo la actividad específica del fármaco, la gravedad del daño y la sensibilidad del paciente, la edad, afección, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquiera infección, tiempo de administración y otros factores clínicos. A medida que se realicen estudios, surgirá información adicional referente a los niveles de dosificación apropiados y la duración del tratamiento para diversas enfermedades y afecciones.

#### VI. Usos terapéuticos de la formulación

Las formulaciones descritas en el presente documento son útiles para tratar o prevenir trastornos óseos relacionados, tales como trastornos óseos relacionados asociados a actividad anormal de osteoblastos u osteoclastos. En algunas realizaciones, la formulación se administra a un sujeto que padece un trastorno óseo relacionado seleccionado del grupo que consiste en acondroplasia, disostosis cleidocraneal, encondromatosis, displasia fibrosa, enfermedad de Gaucher, raquitismo hipofosfatémico, síndrome de Marfan, exostosis múltiple hereditaria, neurofibromatosis, osteogénesis imperfecta, osteopetrosis, osteopoiquilosis, lesiones escleróticas, pseudoartrosis, osteomielitis piogénica, enfermedad periodontal, pérdida ósea inducida por fármacos antiepilépticos, hiperparatiroidismo primario y

secundario, síndromes de hiperparatiroidismo familiar, pérdida de peso inducida por ingravidez, osteoporosis en el hombre, pérdida ósea postmenopáusica, osteoartritis, osteodistrofia renal, trastornos infiltrativos del hueso, pérdida de hueso oral, osteonecrosis de la mandíbula, enfermedad de Paget juvenil, melorreostosis, enfermedades óseas metabólicas, mastocitosis, anemia/enfermedad de células falciformes, pérdida ósea relacionada con trasplante de órganos, pérdida ósea relacionada con trasplante de riñón, lupus eritematoso sistémico, espondilitis anquilosante, epilepsia, artritis juvenil, talasemia, mucopolisacaridosis, enfermedad de Fabry, síndrome de Turner, síndrome de Down, síndrome de Klinefelter, lepra, enfermedad de Perthe, escoliosis idiopática del adolescente, enfermedad inflamatoria multisistémica infantil, síndrome de Winchester, enfermedad de Menkes, enfermedad de Wilson, enfermedad ósea isquémica (tal como enfermedad de Legg-Calve-Perthes y osteoporosis migratoria regional), estados anémicos, afecciones producidas por esteroides, pérdida ósea inducida por glucocorticoides, pérdida ósea inducida por heparina, trastornos de la médula ósea, escorbuto, desnutrición, deficiencia de calcio, osteoporosis, osteopenia, alcoholismo, enfermedad hepática crónica, estado posmenopáusico, afecciones inflamatorias crónicas, artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, colitis inflamatoria, enfermedad de Crohn, oligomenorrea, amenorrea, embarazo, diabetes mellitus, hipertiroidismo, trastornos tiroideos, trastornos paratiroideos, enfermedad de Cushing, acromegalia, hipogonadismo, inmovilización o descuido, síndrome de distrofia simpática refleja, osteoporosis regional, osteomalacia, pérdida ósea asociada a sustitución de articulación, pérdida ósea asociada a VIH, pérdida ósea asociada a pérdida de hormona de crecimiento, pérdida ósea asociada a fibrosis quística, pérdida ósea asociada a quimioterapia, pérdida ósea inducida por tumor, pérdida ósea relacionada con cáncer, pérdida ósea por ablación hormonal, mieloma múltiple, pérdida ósea inducida por fármacos, anorexia nerviosa, pérdida de hueso facial asociada a enfermedad, pérdida de hueso craneal asociada a enfermedad, pérdida de hueso de la mandíbula asociada a enfermedad, pérdida de hueso del cráneo asociada a enfermedad, pérdida ósea asociada al envejecimiento, pérdida de hueso facial asociada al envejecimiento, pérdida de hueso craneal asociada al envejecimiento, pérdida de hueso de la mandíbula asociada al envejecimiento, pérdida de hueso craneal asociada al envejecimiento, y pérdida ósea asociada a viaje al espacio.

En algunas realizaciones, las formulaciones descritas en el presente documento son útiles para mejorar los resultados en procedimientos ortopédicos, procedimientos dentales, cirugía de implante, sustitución de articulación, injerto de hueso, cirugía cosmética ósea y reparación ósea tal como consolidación de fracturas, consolidación de pseudoartrosis, retraso de consolidación y reconstrucción facial. Una o más composiciones pueden administrarse antes, durante y/o después del procedimiento, sustitución, injerto, cirugía o reparación.

La formulación no necesita curar al sujeto del trastorno o proteger completamente contra la aparición de un trastorno óseo relacionado para lograr una respuesta biológica beneficiosa. La formulación puede usarse profilácticamente, que significa que protege, por completo o en parte, contra un trastorno óseo relacionado o síntoma del mismo. La formulación también puede usarse terapéuticamente para mejorar, por completo o en parte, un trastorno óseo relacionado o síntoma del mismo, o para proteger, por completo o en parte, contra la progresión adicional de un trastorno óseo relacionado o síntoma del mismo. De hecho, las formulaciones y formulaciones para uso de la invención son particularmente útiles para aumentar la densidad mineral ósea y mantener la elevada densidad mineral ósea durante un periodo de tiempo.

Pueden llevarse a cabo una o más administraciones de una formulación descrita en el presente documento durante un periodo terapéutico de, por ejemplo, aproximadamente 1 mes a aproximadamente 12 meses (por ejemplo, aproximadamente 2 meses, aproximadamente 3 meses, aproximadamente 4 meses, aproximadamente 5 meses, aproximadamente 6 meses, aproximadamente 7 meses, aproximadamente 8 meses, aproximadamente 9 meses, aproximadamente 10 meses o aproximadamente 11 meses). En algunas realizaciones, un sujeto se administra con una o más dosis de formulación para mantener la densidad mineral ósea. El término "mantener la densidad mineral ósea", como se usa en el presente documento, significa que el aumento de la densidad mineral ósea resultante de la dosis inicial de formulación no disminuye más de aproximadamente el 1 % a aproximadamente el 5 % durante el transcurso de aproximadamente 6 meses, aproximadamente 9 meses aproximadamente 1 año, aproximadamente 18 meses, aproximadamente 2 años, o durante el transcurso de la vida del paciente). Se apreciará que un paciente puede requerir fases de tratamiento alternas para aumentar la densidad ósea y mantener la densidad ósea.

Además, puede ser ventajoso administrar múltiples dosis de la formulación o espaciar la administración de dosis, dependiendo de la pauta terapéutica seleccionada para un sujeto particular. La formulación puede administrarse periódicamente durante un periodo de tiempo de un año o menos (por ejemplo, 9 meses o menos, 6 meses o menos, o 3 meses o menos). A este respecto, la formulación puede administrarse al ser humano una vez cada aproximadamente 7 días, o 2 semanas, o 3 semanas, o 1 mes, o 5 semanas, o 6 semanas, o 7 semanas, o 2 meses, o 9 semanas, o 10 semanas, o 11 semanas, o 3 meses, o 13 semanas, o 14 semanas, o 15 semanas, o 4 meses, o 17 semanas, o 18 semanas, o 19 semanas, o 5 meses, o 21 semanas, o 22 semanas, o 23 semanas, o 6 meses, o 12 meses.

## VII. Terapia de combinación

El tratamiento de una patología combinando dos o más agentes que se dirigen al mismo patógeno o vía bioquímica produce algunas veces mayor eficacia y efectos secundarios reducidos con respecto al uso de la dosis terapéuticamente relevante de cada agente solo. En algunos casos, la eficacia de la combinación de fármacos es

aditiva (la eficacia de la combinación es aproximadamente igual a la suma de los efectos de cada fármaco solo), pero en otros casos el efecto puede ser sinérgico (la eficacia de la combinación es mayor que la suma de los efectos de cada fármaco administrado solo). Como se usa en el presente documento, el término "terapia de combinación" significa que los dos compuestos pueden administrarse de una forma simultánea, por ejemplo simultáneamente, o en la que uno de los compuestos se administra primero, seguido del segundo agente, por ejemplo, secuencialmente. El resultado deseado puede ser tanto un alivio subjetivo de uno o más síntomas como una mejora objetivamente identificable en el receptor de la dosificación.

En algunas realizaciones, la formulación se administra junto con un terapéutico del tratamiento de referencia para el tratamiento de disminución de la densidad mineral ósea. Como se usa en el presente documento, el término "tratamiento de referencia" se refiere a un tratamiento que es generalmente aceptado por los profesionales clínicos para un cierto tipo de paciente diagnosticado con un tipo de enfermedad. En algunas realizaciones, el terapéutico del tratamiento de referencia está seleccionado del grupo que consiste en un fármaco antirresortivo, un agente formador de hueso, un antagonista de los receptores de estrógeno (que incluyen, pero no se limitan a, raloxifeno, bazedoxifeno y lasofoxifeno) y un fármaco que tiene un efecto estimulante sobre osteoclastos. En algunas realizaciones, el fármaco antirresortivo incluye, pero no se limita a, un bisfosfonato (que incluye, pero no se limita a, alendronato, risedronato, ibandronato y zoledronato), un estrógeno o análogo de estrógeno, un modulador selectivo de los receptores de estrógeno (SERM) y una fuente de calcio, tibolona, calcitonina, un calcitriol y terapia de reemplazo hormonal. En algunas realizaciones, el agente formador de hueso incluye, pero no se limita a hormona paratiroidea (PTH) o un fragmento de péptido de la misma, proteína relacionada con PTH (PTHrp), proteína morfogenética ósea, osteogenina, NaF, un agonista de PGE<sub>2</sub>, una estatina y un ligando de RANK (RANKL). En algunas realizaciones, el fármaco que tiene un efecto estimulante sobre los osteoclastos incluye, pero no se limita a, vitamina D, o un derivado de vitamina D o mimético de la misma.

En algunas realizaciones, la formulación se administra a un sujeto cuando está contraindicado el tratamiento de un terapéutico del tratamiento de referencia descrito en el presente documento.

### Ejemplos

#### Ejemplo 1 - El acetato de calcio redujo la viscosidad eficaz de las formulaciones de anticuerpo de esclerostina

Se dializaron 10 ml de un anticuerpo anti-esclerostina seleccionado (75,7 mg/ml) contra 2 litros de Na(OAc) 10 mM y 9 % de sacarosa a 4 °C durante 2 horas. Se concentró un anticuerpo anti-esclerostina seleccionado (75,7 mg/ml) a aproximadamente 160 mg/ml y se diluyó con agua a aproximadamente 140 mg/ml y 120 mg/ml. Se determinó que la absorbancia de las muestras diluidas era 120, 142 y 157 mg/ml, respectivamente.

Se añadieron 10 µl de Ca(OAc)<sub>2</sub> 1,0 M a 1 ml de las muestras de 120 mg/ml, 140 mg/ml y 160 mg/ml. Se determinaron la viscosidad absoluta, pH y osmolaridad de las muestras (Véase la Tabla 2). La viscosidad absoluta de las muestras (500 µl) se midió usando el viscosímetro de cono y plato Brookfield LV-DVII con un husillo CPE-40 con temperatura del vaso de muestras coincidente regulada por un baño de circulación de agua constante a 25 °C.

Tabla 2

Muestra	Viscosidad (cP)	pH	Osmolaridad
120 mg/ml (Control)	18	5,3	375
120 mg/ml + Ca(OAc) <sub>2</sub> 10 mM	8,4	5,4	398
142 mg/ml + Ca(OAc) <sub>2</sub> 10 mM	17	5,4	450
157 mg/ml + Ca(OAc) <sub>2</sub> 10 mM	36	5,4	610

Los resultados indicaron que Ca(OAc)<sub>2</sub> 10 mM añadido a una composición líquida del anticuerpo seleccionado redujo la viscosidad a aproximadamente la mitad. Este experimento se realiza para cada uno de los anticuerpos Ab-4, Ab-5, Ab-13, Ab-14, Ab-19, Ab-20 y Ab-23.

#### Ejemplo 2 - Ajuste de formulaciones

Se dializaron 10 ml de un anticuerpo anti-esclerostina seleccionado (75,7 mg/ml) contra 2 litros de Na(OAc) 10 mM, 6 % de sacarosa o 4 % de sacarosa a 4 °C durante 2 horas. Entonces se concentró cada formulación de sacarosa usando Amicon a aproximadamente 140 mg/ml, luego se diluyó con agua de nuevo a las concentraciones diana (es decir, 120 mg/ml, 140 mg/ml y 160 mg/ml). Se determinó que los valores de absorbancia de las muestras eran 124 mg/ml (4 % de sacarosa), 119,5 mg/ml (6 % de sacarosa), 137,5 mg/ml (4 % de sacarosa) y 142 mg/ml (6 % de sacarosa), respectivamente.

Se añadieron 10 µl de Ca(OAc)<sub>2</sub> 1,0 M a 1 ml de las muestras. Se determinaron la viscosidad, osmolaridad y pH de las muestras (Véase la Tabla 3)

## ES 3 008 262 T3

Tabla 3

Muestra	mM	mg/ml	pH	Osmolaridad	Viscosidad (cP)
120 mg/ml + CaOAC 10 mM + 4 % de sacarosa	10	124	5,285	214	6,2
120 mg/ml + CaOAC 10 mM + 6 % de sacarosa	10	119,5	5,25	282	5,7
140 mg/ml + CaOAC 10 mM + 4 % de sacarosa	10	137,5	5,303	231	9,5
140 mg/ml + CaOAC 10 mM + 6 % de sacarosa	10	142	5,307	294	11

El ensayo se repitió del siguiente modo: Se dializaron 10 ml de un anticuerpo anti-esclerostina seleccionado (75,7 mg/ml) contra 2 litros de Na(OAc) 10 mM, 6 % de sacarosa o 4 % de sacarosa a 4 °C durante 2 horas. Entonces se concentró cada formulación de sacarosa usando filtro Amicon a aproximadamente 140 mg/ml, luego se diluyó con agua de nuevo a las concentraciones diana (es decir, 70 mg/ml, 100 mg/ml y 120 mg/ml). Se determinó que los valores de absorbancia de las muestras diluidas eran 71 mg/ml (4 % de sacarosa), 68,2 mg/ml (6 % de sacarosa), 99,4 mg/ml (4 % de sacarosa), 100,5 (6 % de sacarosa), 122 mg/ml (4 % de sacarosa) y 113 mg/ml (6 % de sacarosa), respectivamente.

Se determinaron el pH, osmolaridad y viscosidad de las muestras. Véase la Tabla 4.

Tabla 4

Muestra	mM	mg/ml	pH	Osmolaridad	Viscosidad (cP)
70 mg/ml + 4 % de sacarosa	10	71	5,205	154	3,5
70 mg/ml + CaOAC 10 mM + 4 % de sacarosa	10	71	5,233	183	2,2
70 mg/ml + 6 % de sacarosa	10	68,2	5,201	231	3,4
70 mg/ml + CaOAC 10 mM + 6 % de sacarosa	10	68,2	5,279	256	2,4
100 mg/ml + 4 % de sacarosa	10	99,4	5,265	165	8,1
100 mg/ml + CaOAC 10 mM + 4 % de sacarosa	10	99,4	5,288	191	4,1
100 mg/ml + 6 % de sacarosa	10	100,5	5,273	241	8,4
100 mg/ml + CaOAC 10 mM + 6 % de sacarosa	10	100,5	5,303	270	4,3
120 mg/ml + 4 % de sacarosa	10	122	5,295	177	15,6
120 mg/ml + CaOAC 10 mM + 4 % de sacarosa	10	122	5,306	202	6,9
120 mg/ml + 6 % de sacarosa	10	113	5,3	249	15,4
120 mg/ml + CaOAC 10 mM + 6 % de sacarosa	10	113	5,311	274	6,6

La reducción del pH del tampón Ca(OAc)<sub>2</sub> a 5,2 mantuvo todos los pH de formulación final entre 5,25 y 5,307. Las formulaciones al 4 % de sacarosa estuvieron por debajo del intervalo isotónico (250-350 mOsm/kg), pero las formulaciones al 6 % de sacarosa estuvieron cerca del medio del intervalo isotónico.

Para evaluar adicionalmente el efecto del 6 % de sacarosa con Ca(OAc)<sub>2</sub> 10 mM en la reducción de la viscosidad, el ensayo anterior se repitió con concentraciones adicionales de anticuerpo anti-esclerostina hasta 160 mg/ml.

Las muestras se prepararon como se ha descrito anteriormente con las siguientes concentraciones: 120 mg/ml, 140 mg/ml y 160 mg/ml. Se añadieron 10 µl de Ca(OAc)<sub>2</sub> 1,0 M, pH 5,2, a cada una de las muestras. Se determinaron el pH, osmolaridad y viscosidad de las muestras. Véase la Tabla 5.

Tabla 5

Muestra	mM	mg/ml	pH	Osmolaridad	Viscosidad (cP)
100 mg/ml + CaOAC 10 mM + 6 % de sacarosa	10	107	5,285	271	4,3
100 mg/ml + CaOAC 10 mM + 6 % de sacarosa	10	107	5,285	277	4,3
120 mg/ml + CaOAC 10 mM + 6 % de sacarosa	10	120	5,311	279	6,1
120 mg/ml + CaOAC 10 mM + 6 % de sacarosa	10	120	5,311	278	6
140 mg/ml + CaOAC 10 mM + 6 % de sacarosa	10	145	5,329	X	12
140 mg/ml + CaOAC 10 mM + 6 % de sacarosa	10	145	5,329	309	11,7
160 mg/ml + CaOAC 10 mM + 6 % de sacarosa	10	168,7	5,343	X	18,8
160 mg/ml + CaOAC 10 mM + 6 % de sacarosa	10	168,7	5,343	X	18,8

Los experimentos anteriormente descritos se realizan para cada uno de los anticuerpos Ab-4, Ab-5, Ab-13, Ab-14, Ab-19, Ab-20 y Ab-23.

Ejemplo 3 - Efecto del acetato de calcio en otras formulaciones de alta concentración de proteína.

El siguiente ejemplo determinó si el acetato de calcio reducía la viscosidad de formulaciones que contienen alta concentración de proteína distinta de un anticuerpo contra esclerostina.

Se determinó que los anticuerpos contra no esclerostina N.º 1-N.º 5 tenían una concentración de 131,6 mg/ml, 94 mg/ml, 113,2 mg/ml, 50 mg/ml y 106,3, respectivamente. El término "anticuerpo contra no esclerostina", como se usa en el presente documento, significa un anticuerpo distinto de un anticuerpo contra esclerostina descrito en el presente documento.

Se añadieron 10 µl de Ca(OAc)<sub>2</sub> 1,0 M a 1 ml de las 5 muestras tratadas anteriormente. Se determinaron la viscosidad, pH y osmolaridad de las muestras (Véase la Tabla 6).

Tabla 6

Muestra	mg/ml	Viscosidad (cP)
Anticuerpo no esclerostina N.º 1	94	6,8
Anticuerpo no esclerostina N.º 1 + Ca(OAc) <sub>2</sub> 10 mM	94	5,10
Anticuerpo no esclerostina N.º 2	135	9,8
Anticuerpo no esclerostina N.º 2 + Ca(OAc) <sub>2</sub> 10 mM	135	8,3
Proteína N.º 1	50	3,3
Proteína N.º 1 + Ca(OAc) <sub>2</sub> 10 mM	50	3,2
Proteína N.º 1	106,3	16,6
Proteína N.º 1 + Ca(OAc) <sub>2</sub> 10 mM	106,3	15,6

El acetato de calcio no redujo significativamente la viscosidad de ninguna de las muestras.

Ejemplo 4 - Efecto de sales no de calcio sobre la viscosidad de la formulación de anticuerpo anti-esclerostina de alta concentración.

Se realizó el siguiente experimento para determinar si sales no de calcio serían capaces de reducir la viscosidad de una formulación de anticuerpo anti-esclerostina.

Se concentró un anticuerpo anti-esclerostina seleccionado (el mismo que en los Ejemplos 1-2 anteriores) a ~130 mg/ml. Se añadieron 10 µl de tanto (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1,0 M como MgSO<sub>4</sub> 1,0 M a 1 ml de muestra de anticuerpo. Se determinó que la viscosidad del control era 30 cP. Se determinó que MgSO<sub>4</sub> redujo significativamente la viscosidad de la muestra (MgSO<sub>4</sub> + muestra = 16 cP). (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> no redujo significativamente la viscosidad de la muestra.

Ejemplo 5 - Efecto de otras sales de calcio sobre la viscosidad de la formulación de anticuerpo anti-esclerostina de alta concentración.

Se realizó el siguiente experimento para determinar si sales de calcio distintas de acetato de calcio serían capaces de reducir la viscosidad de una formulación de anticuerpo anti-esclerostina.

Se concentró un anticuerpo anti-esclerostina seleccionado (el mismo que en los Ejemplos 1-2 anteriores) a ~125 mg/ml. Se añadieron 10 µl de tanto CaCl<sub>2</sub> 25 mM como MgCl<sub>2</sub> 25 mM a 1 ml de muestra de anticuerpo. Se determinó que la viscosidad del control era 18,5 cP. Se determinó que CaCl<sub>2</sub> y MgCl<sub>2</sub> redujeron significativamente la viscosidad de la muestra (CaCl<sub>2</sub> + muestra = 9 cP y MgCl<sub>2</sub> + muestra = 8).

Ejemplo 6 - Efecto del acetato de calcio sobre otro anticuerpo anti-esclerostina.

Se realizó el siguiente experimento para determinar si el acetato de calcio sería capaz de reducir la viscosidad de una formulación de anticuerpo anti-esclerostina que comprende un anticuerpo anti-esclerostina diferente de aquél en los Ejemplos 1-2 anteriores.

Se concentró un anticuerpo anti-esclerostina seleccionado a ~131 mg/ml. Se añadieron 10 µl de Ca(OAc)<sub>2</sub> 1,0 M a 1 ml de muestra de anticuerpo. Se determinó que la viscosidad del control era 17,3 cP. Se determinó que Ca(OAc)<sub>2</sub> redujo ligeramente la viscosidad de la muestra (15,3 cP)

Se espera que numerosas modificaciones y variaciones en la práctica de la invención sean producidas por aquellos

expertos en la materia tras la consideración de las realizaciones presentemente preferidas de la misma. Por consiguiente, las únicas limitaciones que deben imponerse al alcance de la invención son aquellas que aparecen en las reivindicaciones adjuntas.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Una formulación estéril que comprende un anticuerpo anti-esclerostina a una concentración de al menos 70 mg/ml, en la que el anticuerpo comprende las secuencias de aminoácidos expuestas en SEQ ID NOs: 88 y 90, y una sal de calcio a una concentración que oscila de 1 mM a 20 mM, en la que la formulación tiene una viscosidad de 10 cP o menos.
- 10 2. La formulación de la reivindicación 1, en la que la concentración de sal de calcio es de al menos 5 mM y no superior a 15 mM.
3. La formulación de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, que comprende además un tampón de acetato.
- 15 4. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación comprende una concentración total de acetato de al menos 50 mM.
5. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que la formulación comprende además un poliol en una cantidad que oscila de 4 % p/v a 6 % p/v.
- 20 6. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que la formulación tiene un pH que oscila de 4,5 a 6, o de 5 a 5,5.
7. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el anticuerpo anti-esclerostina está presente a una concentración de 140 mg/ml.
- 25 8. La formulación de la reivindicación 5, en la que el poliol es sacarosa.
9. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además un tensioactivo.
- 30 10. La formulación de la reivindicación 9, en la que la concentración del tensioactivo es de 0,004 % p/v a 0,2 % p/v.
11. La formulación de la reivindicación 9, en la que el tensioactivo es polisorbato 20.
- 35 12. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la sal de calcio es cloruro de calcio, acetato de calcio o carbonato de calcio.
13. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en un método de tratamiento de cualquier trastorno asociado a disminución de la densidad ósea en un paciente.
- 40 14. La formulación de cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en un método de tratamiento o prevención de trastornos óseos relacionados asociados a actividad anormal de osteoblastos u osteoclastos en un paciente.