

(12) **FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO**

(22) Data de pedido: 2002.11.08	(73) Titular(es): ABBOTT BIOTHERAPEUTICS CORP. 1500 SEAPORT BOULEVARD, REDWOOD CITY CALIFÓRNIA 94063 US
(30) Prioridade(s): 2001.11.08 US 337509 P	
(43) Data de publicação do pedido: 2004.08.04	
(45) Data e BPI da concessão: 2012.05.09 155/2012	(72) Inventor(es): ELIZABET A. KAISHEVA US SUPRIYA GUPTA US SHANTI G. DUVUR US MALATHY SUBRAMANIAN US
	(74) Mandatário: MANUEL ANTÓNIO DURÃES DA CONCEIÇÃO ROCHA AV LIBERDADE, Nº. 69 - 3º D 1250-148 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA LÍQUIDA ESTÁVEL DE ANTICORPOS IGG**

(57) Resumo:

ESTA INVENÇÃO É DIRIGIDA A UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA LÍQUIDA ESTÁVEL QUE COMPREENDE UM ALTA CONCENTRAÇÃO, POR EXEMPLO, 50 MG/ML OU MAIS, DE ANTICORPO EM CERCA DE 20-60 MM DE TAMPÃO SUCCINATO OU 30-70 MM DE TAMPÃO DE HISTIDINA, QUE TEM PH DESDE CERCA DE PH 5,5 ATÉ CERCA DE PH 6,5, CERCA DE 0,01-0,1 % DE POLISSORBATO, E UM MODIFICADOR DE TONICIDADE QUE CONTRIBUI PARA A ISOTONICIDADE DA FORMULAÇÃO. ESTA FORMULAÇÃO LÍQUIDA É ESTÁVEL A TEMPERATURA REFRIGERADA (2-8 °C) DURANTE PELO MENOS 1 ANO, E PREFERENTEMENTE 2 ANOS. ESTA FORMULAÇÃO LÍQUIDA É ADEQUADA PARA INJEÇÃO SUBCUTÂNEA. ESTA INVENÇÃO É EXEMPLIFICADA POR DACLIZUMAB, UM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-RECEPTOR DE IL-2 HUMANIZADO; HAIL-12, UM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-IL-2 HUMANIZADO; HUEP5C7, UM ANTICORPO MONOCLONAL ANTI-SELECTINA L HUMANIZADO; E FLINTOZUMAB, UM ANTICORPO MONOCLONAL ANTIINTERFERÃO GAMA HUMANIZADO.

RESUMO**"FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA LÍQUIDA ESTÁVEL DE ANTICORPOS IGG"**

Esta invenção é dirigida a uma formulação farmacêutica líquida estável que compreende um alta concentração, por exemplo, 50 mg/ml ou mais, de anticorpo em cerca de 20-60 mM de tampão succinato ou 30-70 mM de tampão de histidina, que tem pH desde cerca de pH 5,5 até cerca de pH 6,5, cerca de 0,01-0,1 % de polissorbato, e um modificador de tonicidade que contribui para a isotonicidade da formulação. Esta formulação líquida é estável a temperatura refrigerada (2-8 °C) durante pelo menos 1 ano, e preferentemente 2 anos. Esta formulação líquida é adequada para injeção subcutânea. Esta invenção é exemplificada por Daclizumab, um anticorpo monoclonal anti-receptor de IL-2 humanizado; HAIL-12, um anticorpo monoclonal anti-IL-2 humanizado; HuEP5C7, um anticorpo monoclonal anti-selectina L humanizado; e Flintozumab, um anticorpo monoclonal anti-interferão gama humanizado.

DESCRIÇÃO

"FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA LÍQUIDA ESTÁVEL DE ANTICORPOS IGG"

CAMPO DA INVENÇÃO

A presente invenção refere-se geralmente ao campo da formulação farmacêutica de anticorpos. Especificamente, a presente invenção refere-se a uma formulação de anticorpo estável, líquida, de alta concentração. Esta invenção é exemplificada por uma formulação líquida estabilizada de Daclizumab, um anticorpo anti-receptor de IL-2; HAIL-12, um anticorpo monoclonal anti-IL-2 humanizado; e HuEP5C7, um anticorpo monoclonal anti-selectina L humanizado.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

Muitas preparações de proteína destinadas a uso humano requerem estabilizantes para prevenir a desnaturação, agregação e outras alterações às proteínas antes do uso da preparação. Esta instabilidade é manifestada na formação de partículas solúveis/insolúveis, e aumenta com frequência quando a preparação de proteína é armazenada ao longo do tempo e durante o envio da remessa. Um objectivo principal no desenvolvimento de formulações de fármacos à base de proteína é manter a solubilidade, estabilidade e bioactividade da proteína.

Sabe-se que as imunoglobulinas, em particular, possuem características que tendem a formar agregados e partículas em solução, e como tal, podem requerer filtração antes do uso para injeção intravenosa ou subcutânea. A formação de agregados e partículas de proteína tem sido um problema no desenvolvimento de produtos de imunoglobulina parentérica, especialmente quando as imunoglobulinas são formuladas em altas concentrações. Synagis™ (MedImmune) é um anticorpo IgG1 monoclonal humanizado produzido por meio de tecnologia ADN recombinante, dirigida a um epítipo no local antigénico

A da proteína T do vírus sincicial respiratório (RSV). Synagis™ é um composto de sequências de anticorpo humano (90 %) e murino (10 %). Synagis™ é fornecido como um produto liofilizado estéril para reconstrução com água estéril para injeção. O Synagis™ reconstituído é para ser administrado por meio de injeção intramuscular somente. Após a reconstituição, Synagis™ contém os seguintes excipientes: 47 mM de histidina, 3,0 mM de glicina, 5,6 % de manitol, e o ingrediente activo, anticorpo IgG1, a uma concentração de 100 miligramas por fraco. O Synagis™ reconstituído é para ser administrado dentro de 6 horas após a reconstituição.

O documento WO 89/11297 revela uma formulação de anticorpo monoclonal liofilizada que compreende uma formulação liofilizada de 1-25 mg/ml de anticorpo monoclonal IgG, 2-10 % de maltose, e acetato de sódio, fosfato, ou tampão citrato que tem um pH entre 3,0 e 6,0.

O documento WO 97/45140 revela uma preparação aquosa de anticorpo anti-CD4 concentrado a aproximadamente 100 mg/ml em 100 mM de citrato de sódio, 0,05 mM de EDTA, pH 6,0. O pedido de patente revela um ligeiro aumento em turbidez após a concentração do anticorpo, que provavelmente reflecte agregação de proteína. A retirada desta agregação requer a adição de Polissorbato 80 e filtração estéril.

O documento WO 90/11091 revela composições aquosas injectáveis que compreendem cerca de 5 mg/ml de IgM, 2,5-5 % (p/v) de albumina de soro humana, em 8-20 mM de tampão fosfato, 270 mM de cloreto de sódio, pH 6,8-7,4.

Patente U.S. No. 6.171.586 revela uma formulação farmacêutica aquosa estável que compreende uma quantidade terapeuticamente eficaz de um anticorpo não submetido a liofilização anterior, um tampão acetato desde cerca de pH 4,8 até cerca de 5,5, um tensioactivo, e um poliol, em que a formulação não possui um quantidade tonificante de

cloreto de sódio.

A Publicação de pedido de patente U.S. No. US 2001/0014326A1 revela uma formulação de anticorpo pré-liofilizada contendo anticorpo anti-IgE de 25 mg/ml, 5 mM de histidina, pH 6,0, 85 mM de sacarose, e 0,01 % de polissorbato 20.

A Patente U.S. No. 5.744.132 revela uma composição que compreende 1-1000 µg/ml de anticorpo IL-12, 2 % de sacarose, 4,15 % de manitol, 10 mM de succinato de sódio, e cerca de 0,02 % de Tween® 20, que tem um pH de cerca de 5,6.

A Patente U.S. No. 6.267.958 revela uma formulação reconstituída de 100 mg/ml de rhuMab E25, em 20 mM de histidina, pH 6,0, 340 mM de sacarose, 0,04 % de polissorbato 20, e 0,9 % de álcool benzílico.

A Patente U.S. No. 6.165.467 revela um processo para estabilizar uma composição de anticorpo monoclonal humano produzido por meio de linha de células de hibridoma que tem número de acesso HB8307, que compreende submeter a diálise o anticorpo monoclonal humano numa solução de tampão estabilizada de sal de fosfato que tem um pH desde 7,2 até 7,4, dita solução que compreende 1-20 mg de D-manitol por mg de dito anticorpo monoclonal, 0,005-0,2 milimol de glicina por mg de dito anticorpo monoclonal, e uma quantidade de sal de fosfato estabilizante de pH para estabilizar o pH de dita solução.

Existe uma necessidade de uma preparação de anticorpo líquido estável, em que a concentração de anticorpo é 50 mg/ml ou maior; tal preparação é adequada para administração parentérica, incluindo intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, ou injeção subcutânea a um ser humano.

SUMÁRIO DA INVENÇÃO

Esta invenção é dirigida a uma formulação farmacêutica líquida estável que compreende uma alta concentração, por

exemplo, superior a 50 mg/ml, de um anticorpo em 20-60 mM de tampão succinato ou 30-70 mM de tampão de histidina (pH desde cerca de pH 5,5 até cerca de pH 6,5), um modificador de tonicidade, e cerca de 0,01 - 0,1 % de polissorbato. Esta formulação retém a estabilidade física, química, e biológica do anticorpo e previne que as imunoglobulinas destinadas para administração a seres humanos de formar agregados e particulados no produto final. Anticorpos preferidos desta invenção incluem Daclizumab, um anticorpo monoclonal anti-receptor de IL-2 humanizado; HAIL-12, um anticorpo monoclonal anti-IL-2 humanizado; e HuEP5C7, um anticorpo monoclonal anti-selectina L humanizado; e fontolizumab, um anticorpo monoclonal anti-interferon gama humanizado.

A formulação líquida de anticorpo é estável a temperatura refrigerada (2-8 °C) durante pelo menos 1 ano e preferentemente 2 anos. Esta formulação líquida é também estável a temperatura ambiente (23-27 °C) durante pelo menos seis meses. Esta formulação líquida é adequada para injeção subcutânea.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

A Figura 1A mostra a percentagem de formação de clips, e a Figura 1B mostra a percentagem de agregados, em vários níveis de pH seguindo uma incubação de quatro semanas de a amostra a 45 °C, como avaliado por meio de SEC-HPLC.

A Figura 2 mostra a percentagem de degradação obtida em vários níveis de pH como avaliado por meio de CIEF seguindo uma incubação de quatro semanas da amostra a 45 °C.

A Figura 3 mostra a percentagem de ácido iso-aspartico formado em vários níveis de pH como avaliado por meio do kit Promega IsoQuant seguindo uma incubação de quatro semanas da amostra a 45 °C.

A Figura 4 mostra o efeito de diferentes tampões ao longo do tempo sobre a potência seguindo incubação a 37 °C.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

I. Definição

Como é usado no presente documento, o termo "tampão" abrange aqueles agentes que mantêm o pH da solução num intervalo aceitável e pode incluir succinato (sódio), histidina, fosfato (sódio ou potássio), Tris (tris (hidroximetil) aminometano), dietanolamina, e similares. O tampão desta invenção tem um pH no intervalo desde cerca de 5,5 até cerca de 6,5; e preferentemente tem um pH de cerca de 6,0. Exemplos de tampões que controlarão o pH neste intervalo incluem succinato (tal como succinato de sódio), gluconato, histidina, citrato fosfato e outros tampões de ácido orgânico.

"Excipientes farmacêuticamente aceitáveis" (veículos, aditivos) são aquelas substâncias inertes que podem de maneira razoável ser administradas a um sujeito mamífero e proporcionar um dose eficaz do ingrediente activo empregado. Estas substâncias são adicionadas a uma formulação para estabilizar a estrutura física, química e biológica do anticorpo. O termo também refere-se a aditivos que podem ser necessários para atingir uma formulação isotónica, adequada para o modo pretendido de administração.

O termo "formulação farmacêutica" refere-se a preparações que são de tal forma como para permitir a actividade biológica dos ingredientes activos para ser eficazes de maneira inequívoca, e que não contêm componentes adicionais que são tóxicos aos sujeitos aos quais a formulação seria administrada.

Uma formulação "estável" é uma em que a proteína na mesma essencialmente retém sua estabilidade física, estabilidade química, e actividade biológica após o armazenamento. Várias técnicas analíticas para a medição de estabilidade da proteína estão disponíveis na especialidade e são revistas em Peptide e Proteína Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nova Iorque,

N.Y., Pubs. (1991) e Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90 (1993). A estabilidade pode ser medida a uma temperatura seleccionada durante um período de tempo seleccionado.

Uma formulação líquida de anticorpo "estável" é uma formulação líquida de anticorpo sem mudanças significativas observadas a uma temperatura refrigerada (2-8 °C) durante pelo menos 12 meses, preferentemente 2 anos, e mais preferentemente 3 anos; ou a temperatura ambiente (23 -27 °C) durante pelo menos 3 meses, preferentemente 6 meses, e mais preferentemente 1 ano. Os critérios para estabilidade são como segue. No mais de 10 %, preferentemente 5 %, de monómero de anticorpo é degradado como medido por meio de SEC-HPLC. A solução é incolor, ou clara a ligeiramente opalescente por meio de análise visual. A concentração, pH e a osmolalidade da formulação não têm mais de +/-10 % de mudança. A potência está dentro de 70-130 %, preferentemente 80-120 % do controlo. Não mais de 10 %, preferentemente 5 % de aparas (hidrólise) é observada. No mais de 10 %, preferentemente 5 % de agregação é formada.

Um anticorpo "retém sua estabilidade física" numa formulação farmacêutica se não mostra aumento significativo de agregação, precipitação e/ou desnaturação após exame visual de cor e/ou limpidez, ou como medida por meio de dispersão de luz UV, cromatografia por exclusão de tamanho (SEC-HPLC) e dispersão de luz dinâmica. Além da conformação da proteína não ser alterada. As mudanças de conformação da proteína podem ser avaliadas por meio de espectroscopia de fluorescência, que determine a estrutura terciária da proteína, e por meio de espectroscopia de FTIR, que determina a estrutura secundária da proteína.

Um anticorpo "retém sua estabilidade química" numa formulação farmacêutica, se não mostra significativa alteração química. A estabilidade química pode ser avaliada por meio de detecção e quantificação de formas quimicamente

alteradas da proteína. Processos de degradação que com frequência alteram a estrutura química da proteína incluem hidrólise ou aparas (avaliadas por meio de métodos tais como cromatografia por exclusão de tamanho e SDS-PAGE), oxidação (avaliadas por meio de métodos tal como por meio de mapeamento de péptido juntamente com espectroscopia de massa ou MALDI/TOF/MS), desamidação (avaliadas por meio de métodos tal como cromatografia de permuta iónica, enfocamento isoeléctrico capilar, mapeamento de péptido, medição de ácido isoaspártico), e isomerização (avaliadas pela medição do conteúdo de ácido isoaspártico, mapeamento de péptido, etc.).

Um anticorpo "retém sua actividade biológica" numa formulação farmacêutica, se a actividade biológica do anticorpo num dado momento está dentro de um intervalo predeterminado da actividade biológica exibida no momento em que a formulação farmacêutica foi preparada. A actividade biológica de um anticorpo pode ser determinada, por exemplo, por meio de um ensaio ELISA de ligação a antígeno.

O termo "isotónico" significa que a formulação de interesse tem essencialmente a mesma pressão osmótica como sangue humano. Formulações isotónicas geralmente terão uma pressão osmótica desde cerca de 270-328 mOsm. Pressão osmótica ligeiramente hipotónica é de 250-269 e pressão osmótica ligeiramente hipertónica é de 328-350 mOsm. A pressão osmótica pode ser medida, por exemplo, usando uma osmómetro de pressão de vapor ou congelamento por gelo tipo.

"Modificadores de tonicidade" são aquelas substâncias inertes farmacêuticamente aceitáveis que podem ser adicionadas à formulação para proporcionar uma isotonicidade da formulação. Modificadores de tonicidade adequados para esta invenção incluem sais e aminoácidos.

II Métodos analíticos

Os seguintes critérios são importantes no desenvolvimento uma formulação farmacêutica estável de anticorpo. A formulação de anticorpo contém excipientes farmacêuticamente aceitáveis. A formulação de anticorpo é formulada tal que o anticorpo retém sua actividade física, química e biológica. A formulação é preferentemente estável durante pelo menos 1 ano a temperatura refrigerada (2-8 °C) e 6 meses a temperatura ambiente (23-27 °C).

Os métodos analíticos para avaliar a estabilidade do produto incluem cromatografia por exclusão de tamanho (SEC-HPLC), teste de dispersão de luz dinâmica (DLS), calorimetria de varrimento diferencial (DSC), quantificação iso-asp, potência, UV a 340 nm, e espectroscopia de UV. SEC (J. Pharm. Scien., 83:1645-1650, (1994); Pharm. Res., 11:485 (1994); J. Pharm. Bio. Anal., 15:1928 (1997); J. Pharm. Bio. Anal., 14:1133-1140 (1986)) mede a percentagem de monómero no produto e dá informação da quantidade de agregados solúveis e clips. DSC (Pharm. Res., 15:200 (1998); Pharm. Res., 9:109 (1982)) dá informação de temperatura de desnaturação de proteína e temperatura de transição vítrea. DLS (American Lab., Nov. (1991)) mede o coeficiente de difusão média, e dá informação da quantidade de agregados solúveis e insolúveis. UV a 340 nm mede a intensidade de luz dispersa a 340 nm e dá informação sobre as quantidades de agregados solúveis e insolúveis. A espectroscopia de UV mede a absorvância a 278 nm e dá informação de concentração de proteína.

O conteúdo de iso-Asp nas amostras é medido usando o kit de Detecção de Isoaspartato Isoquant (Promega). O kit usa a enzima Proteína Isoaspartato Metiltransferase (PIMT) para especificamente detectar a presença de resíduos de ácido isoaspártico numa proteína alvo. PIMT catalisa a transferência de um grupo metilo da S-adenosil-L-metionina para o ácido isoaspártico na posição α -carboxilo, gerando S-adenosil-L-homocisteína (SAH) no processo. Isto é uma

molécula relativamente pequena, e pode usualmente ser isolada e quantificada por meio de HPLC de fase reversa usando os padrões de SAH HPLC proporcionados no kit.

A potência ou bioactividade de um anticorpo pode ser medida pela sua capacidade de se ligar a seu antigénio. A ligação específica de um anticorpo a seu antigénio pode ser quantificada por meio de qualquer método conhecido a aqueles peritos na especialidade, por exemplo, um imunoensaio, tal como ELISA (ensaio imunoabsorvente ligado a enzima).

III. Preparação de Anticorpo

A invenção no presente documento refere-se a uma formulação aquosa estável que compreende um anticorpo. O anticorpo na formulação é preparado usando técnicas disponíveis na especialidade para gerar anticorpos, métodos de exemplo dos quais são descritos em mais detalhe nas seguintes secções.

O anticorpo é dirigido contra um antigénio de interesse. Preferentemente, o antigénio é um polipéptido biologicamente importante e a administração do anticorpo a um mamífero pode prevenir ou tratar um distúrbio. No entanto, anticorpos dirigidos contra antigénios não polipeptídicos (tal como antigénios glicolipídicos associados a tumor; veja-se a Pat. U.S. No. 5.091.178) são também contemplados.

Onde o antigénio é um polipéptido, pode ser uma molécula transmembrana (por exemplo, receptor) ou ligando tal como um factor de crescimento. Antigénios de exemplo incluem moléculas tais como renina; um hormona de crescimento, incluindo hormona de crescimento humana e hormona de crescimento bovina; factor de libertação de hormona de crescimento; hormona paratiróide; hormona estimulante da tiróide; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; insulina de cadeia A; insulina de cadeia B; proinsulina; hormona estimulante do folículo; calcitonina; hormona

luteinizante; glucagon; factores de coagulação tal como factor VIIIC, factor IX, factor de tecido, e factor de von Willebrands; anti- factores de coagulação tal como Proteína C; factor natriurético atrial; surfactante pulmonar; um activador de plasminogénio, tal como urocinase ou activador de plasminogénio de tipo tecido ou urina humana (t-PA); bombesina; trombina; factor de crescimento hematopoiético; factor de necrose tumoral-alfa e -beta; encefalinase; RANTES (regulada por activação expressa e segregada por células T normais); proteína inflamatória de macrófago humano (MIP-1-alfa); uma albumina de soro tal como albumina de soro humana; substância de inibição muelleriana; relaxina de cadeia A; relaxina de cadeia B; prorelaxina; péptido associado a gonadotrofina de ratinho; uma proteína microbiana, tal como beta-lactamase; DNase; IgE; um antigénio associado a linfócito T citotóxico (CTLA), tal como CTLA-4; inibina; activina; factor de crescimento endotelial vascular (VEGF); receptores para hormonas ou factores de crescimento; proteína A ou D; factores reumatóides; um factor neurotrófico tal como factor neurotrófico derivado do osso (BDNF), neurotrofina-3, -4, -5, ou -6 (NT-3, NT4, NT-5, ou NT-6), ou um factor de crescimento do nervo tal como NGF-P; factor de crescimento derivado de plaqueta (PDGF); factor de crescimento de fibroblasto tal como aFGF e bFGF; factor de crescimento epidérmico (EGF); factor de crescimento transformante (TGF) tal como TGF- α e TGF- β , incluindo TGF- β_1 , TGF- β_2 , TGF- β_3 , TGF- β_4 , ou TGF- β_5 ; factor de crescimento similar a insulina-I e -II (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), proteínas de ligação de factor de crescimento similar a insulina; proteínas CD tal como CD3, CD4, CD8, CD19 e CD20; eritropoietina; factores osteoinductores; imunotoxinas; uma proteína morfogenética óssea (BMP); um interferon tal como interferon- α , - β , e - γ ; factores estimulantes de colónia (CSFs), por exemplo, M-CSF, GM-CSF,

e G-CSF; interleucinas (ILs), por exemplo, IL-1 a IL-12; receptores para interleucinas IL-1 a IL-12; selectinas tal como L, E, e P-selectina; superóxido dismutase; receptores de célula T; proteínas de superfície de membrana; factor de aceleração de decaimento; antigénio viral tal como, por exemplo, uma porção do envelope da AIDS; proteínas de transporte; receptores internos; adressin; proteínas reguladoras; integrinas tal como CD11a, CD11b, CD11c, CD18, um ICAM, VLA-4 e VCAM; um antigénio associado a tumor tal como receptor HER2, HER3 ou HER4; e fragmentos de qualquer dos polipéptidos listados anteriormente.

Quando se usa técnicas recombinantes, o anticorpo pode ser produzido intracelularmente, no espaço periplásmico, ou directamente secretado no meio. Se o anticorpo é produzido intracelularmente, como uma primeira etapa, os detritos particulados, células hospedeiras ou células lisadas, são retirados, por exemplo, por meio de centrifugação ou ultrafiltração. Quando o anticorpo é secretado no meio, os sobrenadantes desses sistemas de expressão são geralmente concentrados em primeiro lugar usando um filtro de concentração de proteína comercialmente disponível, por exemplo, uma unidade de ultrafiltração Amicon ou Millipore Pellicon. Um inibidor de protease tal como PMSF pode ser incluído em qualquer das etapas anteriores para inibir proteólise e antibióticos podem ser incluídos para prevenir o crescimento de contaminantes imprevistos.

A composição de anticorpo preparada a partir das células pode ser purificada usando, por exemplo, cromatografia hidroxilapatita, electroforese em gel, diálise, e cromatografia de afinidade, com cromatografia de afinidade sendo a técnica de purificação preferida. A adequabilidade da proteína A como um ligando de afinidade depende das espécies e isótipo de qualquer domínio Fc de imunoglobulina que está presente no anticorpo. A proteína A pode ser usada para purificar anticorpos que são baseados

em cadeias pesadas humanas Υ_1 , Υ_2 , ou Υ_4 (Lindmark *et al.*, J. Immuno/. Met. 62:1-13 (1983)). Proteína G é recomendada para todos os isótipos de ratinho e para Υ_3 humana (Guss *et al.*, EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). A matriz a qual o ligando de afinidade é unido é com mais frequência agarose, mas outras matrizes estão disponíveis. Matrizes mecanicamente estáveis tal como vidro de poro controlado ou poli(estirenodivinil)benzeno permitem taxas de fluxo mais rápidas e tempos de processamento mais curtos que pode ser conseguidos com agarose. Onde o anticorpo compreende um domínio C_{H3} , a resina Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) é útil para purificação. Outras técnicas para purificação de proteína tal como fraccionamento numa coluna de permuta iónica, precipitação de etanol, HPLC de fase reversa, cromatografia em sílica, cromatografia em heparina SEPHAROSE™ cromatografia em uma resina de permuta aniónica ou catiónica (tal como uma coluna de ácido poliaspártico), cromatoenfocamento, SDS-PAGE, e precipitação de sulfato de amónio são também disponíveis dependendo do anticorpo a ser recuperado.

Anticorpos preferidos abrangidos pela presente invenção incluem Daclizumab (USAN, United States Adopted Names), um anticorpo anti-receptor de IL-2 humanizado. Daclizumab está actualmente sendo comercializado como Zenapax® para a prevenção de rejeição de órgão após transplantação renal e é administrado através da via intravenosa. Daclizumab é também útil para tratar psoríase, pelo qual, a administração subcutânea é a via preferida de administração. Para uma administração subcutânea de anticorpo, alta concentração de anticorpo é preferida. Daclizumab é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante, subclasse IgG1. A molécula é composta de duas subunidades de cadeia pesada idênticas e duas de cadeia leve idênticas. Pontes dissulfureto ligam as quatro cadeias. O monómero de Daclizumab é de aproximadamente

150.000 daltons em peso molecular. Daclizumab se liga à subunidade p55 do receptor de IL-2 expresso em células T activadas. O antigénio alvo é designado CD25. Daclizumab é produzido a partir de um linha de células GS-NS0 contendo os genes das cadeias e cadeia leve por meio de cultura com fermentação descontínua. As colectas no biorreactor são processadas para retirar células e detritos e purificadas usando um combinação de cromatografia de filtração de permuta iónica e gel e uma série de técnicas de ultrafiltração e filtração para produzir substância de fármaco contendo mais de 95 % de espécies monoméricas.

Outro anticorpo preferido é anticorpo anti-interleucina 12 (IL-12). IL-12 é uma citocina sintetizada por células apresentadoras de antigénio. É composto de duas subunidades (p35 e p40), ambas têm que estar presentes para actividade funcional. IL-12 funcional é também chamado IL-12p70. Esta citocina preferencialmente age sobre célula T helper tipo 1 (Th1) linfócitos e células assassinas naturais pelo aumento de sua taxa proliferativa. Um efeito a jusante é a secreção de interferon gama (IFN γ) por células Th1. Ambas destas funções (proliferativa e produção de IFN γ) pode ser facilmente ensaiadas para e foram usadas para detectar actividade de IL-12 em amostras. Certos anticorpos contra IL-12 têm mostrado que "neutralizam" as actividades anteriores. Uma vez que células Th1 têm sido implicadas em desempenhar um papel crucial numa variedade de doenças, um anticorpo com características neutralização teria valor terapêutico potencial. 16G2 (Hoffman La Roche) é um anticorpo murino criado contra IL-12p70. 16G2 tem mostrado que age em quantidades estequiométricas próximas s IL-12 num ensaio funcional a inibição de proliferação de células T activadas de sangue periférico humano (PBMC). Isto é uma característica importante porque dímeros p40 de IL-12 existem em soro e anticorpos criados para a subunidade p40 necessitam ser usados em quantidades em

excesso para neutraliza a capacidade proliferativa de uma dada quantidade de IL-12. 16G2 foi humanizado em Protein Design Labs. (Fremont, CA) para produzir HAIL-12 (humanized anti-IL-12, um anticorpo IgG1).

Outro anticorpo preferido é anticorpo anti-selectina L. Descobriu-se que as selectinas, tal como L, E, e P-selectina estão associadas a dano nos tecidos durante o desenvolvimento de isquemia e reperfusão. Neutrófilos desempenham um importante papel nesta ligação. Assume-se que a selectina é requerida para o recrutamento de neutrófilos. A L-selectina é importante para o desenvolvimento completo de danos no músculo esquelético bem como no pulmão (Seekamp, *et al.*, Am. J. Pathol. 11:592-598 (1994). Mulligan, *et al.*, J. Immunol. 151:832-840 (1994). HuEP5C7 (SMART Anti-L Selectin) é um anticorpo monoclonal anti-selectina L humanizado, que contém IgG2 Fc mutante, reage de forma cruzada com os antigénios contra selectina E e P humana. Actualmente está a ser desenvolvida pela Protein Design Labs, Inc. para várias indicações tal como asma, acidente vascular cerebral, traumatismo, e certas doenças autoimunes.

Outro anticorpo preferido é fontolizumab, um anticorpo anti-interferon gama. Fontolizumab é um anticorpo monoclonal humanizado IgG1 desenvolvido por Protein Design Labs, Inc. para o tratamento de distúrbios imunes mediados por interferon-gama (IFN-g), uma citocina pró-inflamatória. IFN-g induz a expressão de antigénios de complexo de histocompatibilidade principal (MHC) classe I e/ou classe II (HLA-DR), melhora a actividade citolítica de células assassinas naturais, activa macrófagos, e modula o perfil de isótipo de imunoglobulina da resposta humoral. Como um linfocina, IFN-g também melhora o desenvolvimento de célula T helper tipo 1 (Th1), enquanto suprime o desenvolvimento de célula T helper tipo 2 (Th2) células. Aberrações na razão Th1/Th2 tem sido implicada numa

variedade de condições auto-imunes.

IV. Preparação da formulação

Após o anticorpo de interesse ser preparado como descrito anteriormente, uma formulação farmacêutica que compreende o anticorpo é preparada. A abordagem de desenvolvimento da formulação é como segue: seleccionando o pH óptimo da solução, seleccionando tipo e concentração de tampão, avaliando o efeito de vários excipientes da estabilidade de líquido, e optimizando a concentração dos excipientes rastreados usando um desenho de experiência I-óptimo (Statistics for Experimenters: Um Introduction to Design, Data Assay, and Model Building, Box, George E.P. et al., John Wiley e Sons, Inc., 1978).

As composições desta invenção minimizam a formação de agregados e particulados de anticorpo e asseguram que o anticorpo mantém sua bioactividade ao longo do tempo. A composição é uma formulação líquida farmacêuticamente aceitável contendo uma alta concentração de um anticorpo num tampão que tem um pH neutro ou ligeiramente ácido (pH 5,5-6,5), um tensioactivo, e um modificador de tonicidade.

O anticorpo na composição é uma alta concentração de 50 mg/ml ou superior, preferentemente 100 mg/ml ou superior. Uma composição preferida desta invenção contém Daclizumab, um anticorpo anti-receptor de IL-2 humanizado; HAIL12, um anticorpo anti-IL-12 humanizado; HaEP5C7, um anticorpo anti-selectina L humanizado; e fontolizumab, um anticorpo anti-interferon gama humanizado.

Um tampão de pH 5,5-6,5 é usado na composição. Um tampão de pH 6,0-6,5 é preferido. Exemplos de tampões que controlam o pH neste intervalo incluem succinato (tal como succinato de sódio), gluconato, histidina, citrato, fosfato, e outros tampões de ácido orgânico. Succinato (pKa 5,63) é um tampão preferido para injeção subcutânea. Histidina (pK 5,97) é menos preferido devido a sua susceptibilidade a oxidação, embora tal oxidação possa ser

retardada substituindo o espaço de cabeça fraco com N_2 ou adicionando um antioxidante. Tampões citrato e fosfato são muito menos preferidos porque causam uma reacção dolorosa quando são injectados subcutaneamente. Um tampão preferido contém cerca de 20-60 mM de succinato de sódio. Outro tampão preferido é 30-70 mM de tampão de histidina revestido com N_2 .

Um tensioactivo é também adicionado à formulação de anticorpo. Tensioactivos de exemplo incluem tensioactivos não iónicos tais como polissorbatos (por exemplo, polissorbatos 20, 80, tal como Tween® 20, Tween® 80) ou poloxamers (por exemplo, poloxamer 188). A quantidade de tensioactivo adicionado é tal que reduz a agregação do anticorpo formulado e/ou minimiza a formação de particulados na formulação e/ou reduz a adsorção. O tensioactivo pode estar presente na formulação numa quantidade desde cerca de 0,005 % até cerca de 0,5 %, preferentemente desde cerca de 0,01 % até cerca de 0,1 %, mais preferentemente desde cerca de 0,01 % até cerca de 0,05 %, e o mais preferentemente desde cerca de 0,02 % até cerca de 0,04 %.

Um modificador de tonicidade, que contribui para a isotonicidade de as formulações, é adicionado à presente composição. O modificador de tonicidade útil para a presente invenção inclui sais e aminoácidos. Sais que são farmacologicamente aceitáveis e adequados para esta invenção incluem cloreto de sódio, succinato de sódio, sulfato de sódio, cloreto de potássio, cloreto de magnésio, sulfato de magnésio, e cloreto de cálcio. Sais preferidos para esta invenção são NaCl e $MgCl_2$. $MgCl_2$ pode também melhorar a estabilidade de anticorpo protegendo a proteína de desamidação. Uma concentração preferida de NaCl é cerca de 75-150 mM. Uma concentração preferida de $MgCl_2$ é cerca de 1-100 mM. Aminoácidos que são farmacologicamente aceitáveis e adequados para esta invenção incluem prolina, alanina, L-

arginina, asparagina, ácido L-aspartico, glicina, serina, lisina, e histidina. Um aminoácido preferido para esta invenção é prolina. Uma concentração preferida de prolina é de 200 mM.

EDTA, que é comumente usado para estabilizar uma formulação proteína, pode também ser incluído na formulação. EDTA, como um agente quelante, pode inibir a oxidação catalisada por metal dos grupos sulfidrílo, assim reduzindo a formação de agregados ligados por dissulfureto. Uma concentração preferida de EDTA é de 0,01-0,2 %.

Composições líquidas de exemplo são formulações que compreendem anticorpo a cerca de 100 mg/ml ou superior, cerca de 20-60 mM de succinato de sódio (pH 6), cerca de 0,01-0,1 % de polissorbato 20 ou 80, e cerca de 75-150 mM de NaCl. Esta formulação retém a estabilidade da actividade biológica do anticorpo monoclonal, e previne a degradação física, química e biológica no final produto das imunoglobulinas destinadas para administração a seres humanos.

A formulação líquida de anticorpo desta invenção é adequada para administração parentérica tal como injeção intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, ou subcutânea; particularmente adequada para injeção subcutânea.

A invenção é ilustrada adicionalmente pelos seguintes exemplos, que não são para ser interpretados como limitantes do âmbito da invenção do procedimentos específicos descritos anteriormente.

EXEMPLOS

Exemplo 1: Optimização de pH

Para identificar a formulação óptima para intervalo de pH e para identificar vias de degradação principais, um estudo de perfil de pH foi conduzido. Formulações de amostra continham 5,0 mg/ml de anticorpo anti-receptor de IL-2 (Dacilizumab) em um de três tampões: 50 mM de tampão acetato de sódio a pH 4,0 ou 5,0, 50 mM de histidina a pH

5,5, 6,0, ou 6,5, ou 50 mM de tampão fosfato de sódio a pH 7,0 ou 8. 5. Formulações independentes foram incubadas a 5 °C ou 45 °C com 100 RPM agitando durante 4 semanas. A estabilidade física e química de cada amostra foi avaliada a 0 e 4 semanas por meio de métodos analíticos incluindo: pH e análise visual, espectroscopia de UV a 340 nm, cromatografia por exclusão de tamanho (SEC-HPLC), espectroscopia de fluorescência, dispersão de luz dinâmica (DLS), calorimetria diferencial de varrido (DSC), Ensaio Promega IsoQuant, enfocamento isoelétrico capilar (cIEF), SDS-PAGE (reduzido e não reduzido), e avaliações de bioactividade (ELISA).

SEC-HPLC realizado nas amostras após quatro semanas de incubação a 45 °C mostrou que clipping é um via de degradação principal para a formulação líquida, como mostrado em Figura 1A pela percentagem de clips recuperados em vários níveis de pH com SEC. Tanto a percentagem de clips como a percentagem de agregados (Figura 1B) determinada por meio de SEC foram reduzidos no intervalo médio valores de pH de 5,5 a 6,5.

A Figura 2 mostra a percentagem de degradação obtida em vários níveis de pH como avaliado por meio de cIEF seguindo uma incubação quatro semanas da amostra a 45 °C. Degradação mínima foi obtida a um valor de pH de cerca de 5,5.

A Figura 3 mostra a percentagem de ácido iso-aspartico formado em vários níveis de pH como avaliado por meio do kit Promega IsoQuant seguindo uma incubação de quatro semanas da amostra a 45 °C. A formação de ácido iso-aspartico (desamidação) foi minimizada a valores de pH de 6 e 6,5, e aumentou rapidamente a pH 8,0.

Os resultados desta experiência indicam que o pH 5,5 a 6,5 e preferível pH 6,0 a 6,5, são o pH ótimo que minimizam degradação e agregação de anticorpos.

Exemplo 2: Otimização de Tampões

Nesta experiência, formulações independentes continham 5,0 mg/ml de anticorpo Daclizumab em 50 mM de succinato de sódio, pH 6,0; e 50 mM de histidina, pH 6,0, com e sem gaseificação com N₂. Tampão citrato de sódio não foi incluído devido aos relatórios de dor por injeção subcutânea. A bioactividade (potência) no momento 0, e após 4, 8, e 12 semanas de incubação a 37° C foi medida por meio de ELISA usando microplacas cobertas com receptor de IL2 alfa recombinante humano (II,-2 sRa) antigénio, e conjugado de IgG-HRP anti-humano de cabra.

A Figura 4 mostra o efeito de diferentes tampões ao longo do tempo sobre potência seguindo incubação a 37 °C. A maior estabilidade da formulação de anticorpo foi conseguida ao longo de 8 semanas com 50 mM de tampão succinato de sódio a pH 6,0. Formulações em histidina somente rapidamente (menos de 8 semanas) perderam sua potência como o tampão oxidado. A potência da formulação permanecia superior a 80 % durante pelo menos 12 semanas em tampão succinato de sódio ou tampão de histidina gaseificado com N₂ para prevenir oxidação.

Exemplo 3: Rastreo de Excipientes

Objectivos

Este estudo foi conduzido para rastrear vários excipientes para a formulação de anticorpo Daclizumab a 50 mg/mL. A partir do estudo de optimização de pH conduzido anteriormente (Exemplo 1), a estabilidade da formulação foi maximizada no intervalo de pH de 6,0-6,5. Portanto neste estudo, excipientes foram rastreados em dois tampões; 50 mM de fosfato, pH 6,5 e 50 mM de succinato, pH 6,0. A estabilidade de anticorpo foi monitorizada nos dois tampões for 3 semanas a 5 °C e 45 °C com agitação a 100 RPM a uma concentração de 50 mg/mL. Os excipientes examinados incluíram: tensioactivos (Tween 80® e Tween 20®), sais (NaCl e MgCl₂), antioxidantes (EDTA e metionina), aminoácidos (glicina, lisina, serina e prolina), e co-

solventes (glicerol e etanol). Várias técnicas analíticas (limpidez, pH, SEC-HPLC, UV-Vis, e cIEF) foram usadas para caracterizar as formulações contendo excipiente.

Preparação da amostra

O anticorpo Daclizumab estava numa formulação de 67 mM de fosfato de sódio (sem Tween® 80) a uma concentração de 6,6 mg/mL. Este material foi concentrado até cerca de 30 mg/mL na unidade Pellicon II (Millipore), e subsequentemente, tampão foi trocado em dois tampões seleccionados (50 mM de fosfato de sódio pH 6,5, e 50 mM de succinato de sódio pH 6,0) usando a célula de agitação de 50 mL amicon (Millipore). Durante a terceira etapa e final de troca de tampão, o material foi também concentrado a uma concentração final de ~125 mg/mL. Finalmente, o anticorpo foi filtrado através de membrana de 0,8 µm (Uniflo). A concentração de proteína após a filtração foi determinada como sendo aproximadamente 100 mg/mL para a amostra de tampão fosfato e 97 mg/mL para a amostra de tampão succinato.

A concentração alvo dos excipientes ao qual foram rastreados é mostrada no Quadro 1. As formulações foram preparadas pesando a quantidade requerida dos excipientes directamente no frasco (por exemplo, todos os aminoácidos) ou preparando soluções stock concentrada dos excipientes. Os excipientes foram adicionados a 0,5 mL da solução de tampão apropriada e o pH foi ajustado ao valor desejado com 1 N de HCl ou 10 % de NaOH. Subsequentemente, 0,5 mL da solução de anticorpo concentrada no tampão apropriado (~100 mg/mL) foi adicionado para atingir a concentração alvo de 50 mg/mL. Este procedimento foi adoptado para prevenir a degradação da proteína devido a contacto directo com excipientes concentrados. A solução de 1 mL foi dividida em dois frascos com 0,5 mL de enchimento cada. Um frasco foi usado para análise inicial T = 0 e então foi armazenada a 2-8 °C para a análise ponto de tempo 3 semanas a 2-8 °C. O

outro frasco foi incubado a 45 °C com agitação a 100 RPM durante 3 semanas e analisado no final desse período de tempo.

Quadro 1: Lista de excipientes e suas concentrações de acordo com o usado no estudo.

n°	Excipiente	Conc. alvo
1	Tween 80	0,05 %
2	EDTA	0,05 %
3	NaCl	150 mM
4	Metionina	100 mM
5	Glicina	200 mM
6	Serina	200 mM
7	Prolina	200 mM
8	Lisina	200 mM
9	MgCl ₂	100 mM
10	Tween 20	0,05 %
11	Glicerol	5,0 %
12	Etanol	5,0 %

Métodos analíticos

Em cada um dos dois pontos de tempo, as amostras foram analisadas usando várias técnicas analíticas. A limpidez da solução foi visualmente examinada segurando os frascos de amostra contra um fundo preto sob iluminação fluorescente. A solução foi inspeccionada para espécies solúveis e mudanças de cor foram registradas. Cromatografia por exclusão de tamanho foi realizada usando uma unidade de HPLC Perkin Elmer com detecção por sistema de diodos e duas colunas Tosohaas ligadas em série. As amostras foram diluídas aproximadamente 5 vezes com o correspondente tampão para trazer a concentração a cerca de 1 mg/mL e 100 µL da amostra foi injectada sobre a coluna. A concentração da amostra foi medida por meio de espectroscopia por UV usando o espectrofotômetro Perkin Elmer Lambda Bio 40.

As amostras do ponto de tempo de 3 semanas foram analisadas por meio de focagem isoelétrica capilar no

Sistema BioRAD CE (BioFocus 3000). Todas as amostras foram diluídas a 0,25 mg/mL com água e uma diluição 1:1 (a um concentração final de 0,125 mg/mL) foi feita com a solução de farmalito contendo TEMED e dois marcadores pI internos, 8,4 e 10,1. A capilaridade usada foi um eCAP com revestimento neutro (Beckmann, 56 cm de comprimento, 50 µm ID).

A potência de amostras formuladas no tampão succinato com os excipientes, Tween-80, EDTA, NaCl e $MgCl_2$ foi testada após 3 semanas de incubação a 5 e 45 °C. Foi um bioensaio que envolvia células KIT-225-K6.

Resultados

Haviam 24 amostras no ponto de tempo $T = 0$ uma vez que 12 excipientes diferentes foram monitorizados em dois tampões diferentes. No ponto de tempo de 3 semanas, havia 48 amostras a serem analisadas (12 diferentes excipientes x 2 temperaturas x 2 tampões = 48). Os ensaios realizados incluem determinação de concentração por UV-Vis, pH, Limpidez, SEC-HPLC, e CIEF.

(a) Limpidez de Amostra

A aparência da amostra é indicada no **Quadro 2**. Todas as amostras eram claras em ambos os tampões no ponto de tempo inicial $T = 0$. No ponto de tempo de 3 semanas, todas as amostras no tampão fosfato excepto a contendo lisina eram claras a 5 °C. No mesmo tampão, a 45 °C, as amostras contendo aminoácidos (glicina, serina, prolina e lisina) apareceram claras, mas tinham alguns corpos flutuantes como fios nos frascos. A amostra com $MgCl_2$ tinha cristais claros precipitados no fundo do frasco.

No tampão succinato, todas as amostras excepto as formulações contendo aminoácidos eram claras após três semanas de incubação a 5 °C. As amostras com prolina e lisina eram as mais túrbidas. A 45 °C, todas as amostras em tampão succinato eram claras no ponto de tempo de 3 semanas.

Quadro 2: Limpidez de amostra determinada por luz de fluorescência a T = 0 e T = 4 semanas a 5 e 45 °C nos tampões Na-succinato (pH 6,0) e Na-fosfato (pH 6,5).

Amostra	Fosfato T = 0 Limpidez	Fosfato T = 3 sem Limpidez, 5 °C	Fosfato T = 3 sem Limpidez, 45 °C	Succinato T = 0 Limpidez	Succinato T = 3 sem Limpidez, 5 °C	Succinato T = 3 sem Limpidez, 45 °C
Tween-80	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro
EDTA	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro
NaCl	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro
Metionina	Claro	Claro	Claro	Claro	Túrbido	Claro
Glicina	Claro	Claro	Claro	Claro	Túrbido	Claro
Serina	Claro	Claro	Claro	Claro	Túrbido	Claro
Prolina	Claro	Claro	Claro	Claro	Túrbido	Claro
Lisina	Claro	Túrbido	Claro	Claro	Túrbido	Claro
MgCl ₂	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro
Tween-20	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro
Glicerol	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro
Etanol	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro	Claro

(b) SEC-HPLC

Os resultados de SEC-HPLC são tabulados no Quadro 3 (A-C). O Quadro 3A indica a % de monómero para todas as amostras a serem investigadas neste estudo. A % de monómero a $T = 0$ para todas as amostras foi $>99\%$. No ponto de tempo de três semanas, nenhuma mudança significativa foi observada na % de monómero para as amostras a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em ambos os tampões. No entanto, a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, todas as amostras indicaram um ligeira queda na % de monómero ($<5\%$). Para as amostras formuladas no tampão fosfato, a % de monómero variou desde 94,08 (metionina) até 97,29 (prolina), enquanto para as amostras formuladas no tampão succinato, a % de monómero variou desde 95,86 (metionina) até 97,55 (Tween-80). Em ambos os tampões, as formulações contendo metionina e glicina mostraram a queda mais significativa em % de monómero. A diminuição em % de monómero foi na sua maior parte devido a formação de clip.

O Quadro 3B coloca em lista a % de formação de agregados em todas as amostras a serem investigadas neste estudo. É claro a partir destes resultados que o aumento em formação de agregados durante a duração de 3 semanas é mínima para todas as amostras a $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ em ambos os tampões. Após 3 semanas de incubação a $45\text{ }^{\circ}\text{C}$, amostras no tampão fosfato mostrou um aumento em % de agregados que varia desde 0,40 % (EDTA) até 2,40 % (glicina). No tampão succinato, a formação de agregados foi ligeiramente mais baixa; que varia desde 0,7 % (metionina) até 1,09 % (glicina) após o período de incubação de 3 semanas. Uma das hipóteses que suporta estes resultados é que se a formação de agregados é devido a oxidação, pode ser mais lenta no tampão succinato devido às propriedades quelantes do metal do tampão succinato.

O Quadro 3C coloca em lista a % de formação de clip em todas as amostras a serem investigadas neste estudo. No ponto de tempo inicial, a % de clipping variou desde $\sim 0,2\%$

0,4 % em todas as amostras. Para todas as amostras incubadas a 5 °C, a % de aumento em clips foi insignificativa ao longo do período de 3 semanas. A 45 °C, um aumento significativo na taxa de formação de clip foi observada. Para as amostras formuladas no tampão fosfato, a % de clipping variou desde 4,74 (metionina) até 1,5 % (prolina, glicerol e etanol), enquanto no tampão succinato, o intervalo foi de 1,48 % (Tween-80) a 3,44 (metionina). Em geral, um aumento na formação de clip foi observada nas formulações contendo aminoácidos. Além disso, a taxa de formação de clip parece ser maior no tampão fosfato. Isto pode ser atribuído à diferença dos tampões succinato de Na e fosfato de Na (pH 6,0 e 6,5, respectivamente), indicando hidrólise catalisada por base como sendo a razão primária para a formação de clip

Quadro 3A: % de monómero como determinada por meio de SEC a T = 0 e 3 semanas a 5 °C e 45 °C nos tampões succinato de Na (pH 6,0) e fosfato de Na (pH 6,5) .

Amostra	Fosfato = 0 % de Mono	Fosfato T = 3 sem % de Mono, 5 °C	Fosfato T = 3 sem % de Mono, 45 °C	Succinato T = 0 % de Mono	Succinato T = 3 sem % de Mono, 5 °C	Succinato T = 3 sem % de Mono, 45 °C
Tween-80	99,36	99,48	96,71	99,43	99,51	97,55
EDTA	99,37	99,42	96,43	99,42	99,53	97,51
NaCl	99,37	99,41	96,84	99,42	99,53	97,31
Metionina	99,42	99,42	94,08	99,47	99,53	95,86
Glicina	99,41	99,42	95,90	99,46	99,53	96,46
Serina	99,41	99,45	96,15	99,45	99,53	97,29
Prolina	99,40	99,43	97,29	99,45	99,52	97,06
Lisina	99,34	99,62	95,45	99,45	99,57	96,28
MgCl ₂	99,37	99,44	97,12	99,47	99,53	96,62
Tween-20	99,17	99,53	96,33	99,44	99,53	97,27
Glicerol	99,41	99,59	96,32	99,43	99,48	97,46
Etanol	99,41	99,42	97,24	99,31	99,19	97,42

Quadro 3B: % de agregados como determinada por meio de SEC a T = 0 e 3 semanas a 5 °C e 45 °C nos tampões succinato de Na (pH 6,0) e fosfato de Na (pH 6,5).

Amostra	Fosfato T = 0 % de Agr.	Fosfato T = 3 sem % de Agr., 5 °C	Fosfato T = 3 sem % de Agr., 45 °C	Succinato T = 0 % de Agr.	Succinato T = 3 sem % de Agr., 5 °C	Succinato T = 3 sem % de Agr., 45 °C
Tween-80	0,41	0,00	1,61	0,36	0,36	0,96
EDTA	0,39	0,43	0,40	0,35	0,35	0,96
NaCl	0,40	0,43	1,23	0,33	0,34	0,85
Metionina	0,36	0,41	1,18	0,32	0,34	0,70
Glicina	0,38	0,42	2,40	0,33	0,35	1,09
Serina	0,38	0,40	2,15	0,32	0,33	0,91
Prolina	0,38	0,41	1,14	0,35	0,34	0,86
Lisina	0,39	0,36	1,50	0,32	0,30	0,64
MgCl ₂	0,38	0,42	0,60	0,32	0,34	0,82
Tween-20	0,40	0,44	1,55	0,34	0,34	1,00
Glicerol	0,37	0,40	2,13	0,35	0,32	0,94
Etanol	0,37	0,43	1,26	0,28	0,38	0,91

Quadro 3C: % de Clipping como determinada por meio de SEC a T = 0 e 3 semanas a 5 °C e 45 °C nos tampões succinato de Na (pH 6,0) e fosfato de Na (pH 6,5).

Amostra	Fosfato T = 0 % de Clip	Fosfato T = 3 sem % de Clip, 5 °C	Fosfato T = 3 sem % de Clip, 45 °C	Succinato T = 0 % de Clip	Succinato T = 3 sem % de Clip, 5 °C	Succinato T = 3 sem % de Clip, 45 °C
Tween-80	0,21	0,52	1,67	0,22	0,11	1,48
EDTA	0,22	0,15	2,00	0,22	0,12	1,53
NaCl	0,24	0,16	1,93	0,21	0,12	1,85
Metionina	0,21	0,16	4,74	0,21	0,13	3,44
Glicina	0,20	0,15	1,70	0,21	0,12	2,41
Serina	0,21	0,14	1,69	0,23	0,12	1,81
Prolina	0,22	0,16	1,58	0,21	0,13	2,08
Lisina	0,24	0,02	3,05	0,23	0,12	3,09
MgCl ₂	0,21	0,14	2,28	0,21	0,13	2,55
Tween-20	0,44	0,03	2,12	0,22	0,11	1,73
Glicerol	0,23	0,01	1,54	0,22	0,20	1,61
Etanol	0,22	0,14	1,51	0,41	0,40	1,67

(c) Electroforese de capilaridade

Todas as amostras deste estudo foram analisadas por electroforese de capilaridade (cIEF) no sistema BioRAD. Um perfil cIEF típico de Daclizumab mostra quatro picos. Tipicamente em envelhecimento acelerado altas temperaturas, a área do pico de isoforma principal diminui seguido por um aumento nos outros picos de isoforma, que indica a conversão de uma isoforma na outra isoforma. A % de degradação é calculada pela percentagem de diminuição na área de pico da isoforma principal:

$$\% \text{ de Degradação} = \frac{[\text{Área de pico a } T = 0 - \text{Área de pico a } 45 \text{ }^{\circ}\text{C}]}{[\text{Área de pico a } T = 0]} \times 100 \%$$

Nossos resultados indicam que as amostras de 45 °C são mais degradadas no tampão fosfato (pH 6,5) em comparação com amostras similares no tampão succinato (pH 6,0). Os melhores electroferogramas foram vistos para os excipientes, EDTA, NaCl, lisina e MgCl₂. A % de degradação após 3 semanas para 5 °C versus 45 °C não pode ser calculada para as amostras contendo Tween 80, Tween 20, serina e prolina já que seus electroferogramas foram muito colapsados e os picos indistinguíveis.

(d) Potência

Com base nos resultados deste estudo, o tampão succinato de Na parece ser mais promissor que o tampão fosfato de Na. Assim, as avaliações de potência foram feitas para os excipientes mais estabilizantes no tampão succinato de Na somente. Este incluía as formulações contendo Tween-80, EDTA, NaCl e MgCl₂, submetido a três semanas de incubação a 5 e 45 °C. Os resultados (**Quadro 4**) mostraram que a potência de todas as formulações estava dentro das especificações, indicando que os processos físicos e químicos subjacentes de degradação não estão significativamente alterando a actividade da proteína.

Quadro 4: resultados de potência de formulações seleccionadas em tampão succinato a T = 3 semanas a 5 e 45 °C.

Amostra	pH	% de Potência
Tween-80, 5 °C	6,0	105
Tween-80, 45 °C	6,0	80
EDTA, 5 °C	6,0	103
EDTA, 45 °C	6,0	74
NaCl, 5 °C	6,0	105
NaCl, 45 °C	6,0	98
MgCl ₂ , 5 °C	6,0	112
MgCl ₂ , 45 °C	6,0	96

Discussão

Com base nos resultados deste estudo, a estabilidade de formulação foi maior no tampão succinato de Na a pH 6,0, em comparação com o tampão fosfato de Na a pH 6,5. Isto é principalmente devido a hidrólise catalisada por base é que acelerada a pH superior a 6,5, causando um aumento na taxa de formação de clip. Assim, o tampão succinato de Na a pH 6,0 é o tampão seleccionado para todos os futuros estudos. Os resultados deste estudo também claramente indicaram que em ambos os tampões, os aminoácidos (glicina, lisina, serina, prolina, e metionina) não tiveram um efeito estabilizante sobre a estabilidade da proteína. Como mostrado pelos dados de limpeza de amostra, todas as formulações contendo aminoácidos indicaram a formação de agregados insolúveis a 45 °C.

O excipiente MgCl₂ foi seleccionado neste estudo com base na hipótese de que possa proteger a proteína contra dimidiação. Enquanto MgCl₂ precipitou no tampão fosfato de Na; no tampão succinato de Na, com base nos dados de cIEF, MgCl₂ tem um efeito estabilizante sobre a proteína. Etanol foi também incluído como um excipiente para testar se estabilizou a proteína contra desamidação diminuindo a constante dieléctrica da solução. Os resultados, no

entanto, não suportam esta hipótese. Finalmente, Tween-80, EDTA, e NaCl, os excipientes mais comumente usados para estabilizar formulações de proteína, não mostram qualquer efeito desestabilizante sobre a proteína em tampão.

Experiências adicionais foram conduzidas no tampão succinato de Na a pH 6,0; o efeito dos excipientes (MgCl_2 , Tween-80, NaCl, e EDTA) foi ainda examinado para a estabilidade da proteína. Os resultados indicam que para formular um anticorpo a 100 mg/mL com 100 mM de NaCl, a concentração ótima de Tween 80 está no intervalo de 0,02-0,03 %. Resultados também indicam que aumentando a concentração de sal (100-150 mM) poderia estabilizar adicionalmente a formulação. Assim, a concentração de NaCl deveria ser maximizada enquanto mantém os requerimentos de tonicidade. Os resultados também indicam que a estabilidade da formulação contendo Tween 80 e NaCl poderia ser melhorada pela adição de EDTA no intervalo de concentração de 0,35-0,5 %. A adição de MgCl_2 no intervalo de concentração de 0-50 mM também poderia ter um efeito favorável. Os resultados também indicam que o excipiente concentrações para a formulação mais estável são: 150 mM de NaCl, 0,05 % de Tween 80, 0,03-0,04 % de EDTA e 60-70 mM de MgCl_2 , no entanto, estas condições não são práticas porque não proporcionam condições isotônicas.

Exemplo 4: Dados de estabilidade de Duas formulações de anticorpo Daclizumab em Tampão succinato

Formulações 1 e 2 foram preparadas de acordo com o Exemplo 3.

Formulação 1: 100 mg/ml de anticorpo Daclizumab, 30 mM de succinato de sódio (pH 6,0) 100 mM de NaCl e 0,03 % de Tween®-80.

Formulação 2: igual que a formulação 1, mais 0,05 % de EDTA.

Os resultados de estabilidade de Formulações 1 e 2 a T = 0, 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas, e 12 semanas são

mostrados como segue a 5, 25, e 37 °C (Quadro 5).

Quadro 5: Resultados de estabilidade de Formulações 1 e 2.

T = 0						
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% de Potência	
F1	Claro	98,27	0,77	0,96	100	
F2	Claro	98,27	0,77	0,96	90	
T = 2 Semanas						
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% de Potência	
F1-5C	Claro	98,31	0,73	0,95	NA	
F1-25C	Claro	98,03	0,82	1,14	NA	
F1-37C	Claro	97,11	1,21	1,69	NA	
F2-5C	Claro	98,20	0,92	0,90	NA	
F2-25C	Claro	97,90	1,09	1,06	NA	
T = 4 Semanas						
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% de Potência	
F1-5C	Claro	98,30	0,74	0,96	93	
F1-25C	Claro	97,80	0,92	1,28	88	
F1-37C	Claro	96,20	1,77	2,03	84	
F2-5C	Claro	98,30	0,77	0,93	94	
F2-25C	Claro	97,85	0,95	1,20	92	
F2-37C	Claro	96,30	1,83	1,87	80	
T = 8 Semanas						
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% de Potência	
F1-5C	Claro	98,24	0,73	0,95	96	

T = 8 Semanas						
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência	
F1-25C	Claro	97,51	0,82	1,14		96
F1-37C	Claro	94,76	1,21	1,69		90
F2-5C	Claro	98,34	0,78	0,88		90
F2-25C	Claro	97,42	1,20	1,38		90
F2-37C	Claro	94,63	3,06	2,31		85
T = 12 Semanas						
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência	
F1-5C	Claro	98,25	0,73	1,02		98
F1-25C	Claro	97,07	1,26	1,62		90
F1-37C	Claro	93,31	3,88	2,81		84
F2-5C	Claro	98,30	0,70	1,00		94
F2-25C	Claro	97,22	1,30	1,48		88
F2-37C	Claro	92,88	4,05	1,54		82

Exemplo 5: Dados de estabilidade de Duas formulações de Daclizumab em Tampão de histidina

Formulações 3 e 4 são preparadas de acordo com Exemplo 3.

Formulação 3: 100 mg/ml de anticorpo Daclizumab, 50 mM de histidina (pH 6,0), 115 mM de NaCl, 0,03 % de Tween®-80, purgado com azoto.

Formulação 4: igual que a formulação 3, mais 0,05 % de EDTA.

Os resultados de estabilidade de Formulações 3 e 4 a T = 0, 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas, e 12 semanas são mostrados como segue a 5, 25, e 37 °C (Quadro 6).

Quadro 6: Resultados de estabilidade de Formulações 3 e 4.

T = 0						
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência	
F3	Claro	99,24	0,43	0,33	79	
F4	Claro	99,01	0,68	0,32	89	
T = 2 Semanas						
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência	
F3-5C	Claro	99,24	0,38	0,38	ND	
F3-25C	Claro	99,09	0,47	0,44	ND	
F3-37C	Claro	98,32	1,01	0,67	ND	
F4-5C	Claro	99,19	0,44	0,37	ND	
F4-25C	Claro	99,11	0,47	0,42	ND	
F4-37C	Claro	98,41	0,93	0,66	ND	
T = 4 Semanas						
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência	
F3-5C	Claro	99,26	0,37	0,35	91	
F3-25C	Claro	98,99	0,56	0,45	76	
F3-37C	Claro	97,96	1,42	0,62	83	
F4-5C	Claro	99,28	0,38	0,34	81	
F4-25C	Claro	99,00	0,56	0,44	85	
F4-37C	Claro	97,94	1,44	0,63	79	
T = 8 Semanas pH 6,0						
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência	
F3-5C	Claro	99,24	0,38	0,38	86	
F3-25C	Claro	98,74	0,72	0,54	82	
F3-37C	Claro	96,87	2,37	0,76	75	
F4-5C	Claro	99,23	0,39	0,38	97	
F4-25C	Claro	98,71	0,75	0,54	92	
F4-37C	Claro	96,90	2,34	0,76	86	

T = 12 Semanas pH 6,0					
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência
F3-5C	Claro	98,89	0,63	0,49	99
F3-25C	Claro	98,04	1,21	0,75	96
F3-37C	Claro	94,79	4,06	1,17	90
F4-5C	Claro	98,92	0,60	0,48	91
F4-25C	Claro	98,06	1,23	0,72	87
F4-37C	Claro	95,02	3,83	1,15	78

Exemplo 6. Dados de estabilidade de Formulação de Daclizumab a temperatura ambiente durante um Ano

Uma formulação líquida de anticorpo de 100 mg/ml de Daclizumab em 30 mM de succinato de sódio, pH 6, 100 mM de NaCl, e 0,03 % de Tween® 80 foi testado para estabilidade após um ano de armazenamento a 25 °C. Os resultados de estabilidade indicam que a formulação é estável durante pelo menos um ano a 25 °C (Quadro 7).

Quadro 7. Resultados de estabilidade de Daclizumab formulação após um Ano de Armazenamento a 25 °C.

Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência
T = 0	Claro	98,27	0,77	0,96	100
T = 1 ano	Claro	94,32	3,14	2,53	86

Exemplo 7. Dados de estabilidade de Formulação de Daclizumab a 5 °C durante 18 Meses

Uma formulação líquida de anticorpo de 100 mg/ml de Daclizumab em 30 mM de succinato de sódio, pH 6, 100 mM de NaCl, e 0,03 % de Tween® 80 foi incubada a 5 °C (2-8 °C) e testada para estabilidade a diferentes pontos de tempo. Os resultados de estabilidade indicam que a formulação é estável durante pelo menos 18 meses a temperatura refrigerada (Quadro 8).

Quadro 8. Resultados de estabilidade de Daclizumab a 5 °C.

Tempo (Mês)	% de monómero	% de Agregado
0	99,0	N/Um
3	99,1	0,2 %
6	99,1	0,2 %
9	98,8	0,2 %
12	98,9	0,2 %
18	98,6	0,2 %

Exemplo 8. Dados de estabilidade de HAIL-12 (tampão de histidina)

HAIL-12 (anticorpo anti-IL12, 50 mg/mL) foi formulado em 50 mM de tampão de histidina, 120 mM de cloreto de sódio, 0,03 % de Tween 80, pH 6,0. O teste estabilidade em curso indica que a formulação é estável a 5 °C durante pelo menos 9 meses (Quadro 9).

Quadro 9. Resultados de estabilidade de HAIL-12 a 5 °C.

Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência
T = 0	Claro	99,47	0,18	0,35	95
T = 7 meses	Claro	98,90	0,65	0,45	—
T = 8 meses					100
T = 9 meses		98,52			

Exemplo 9. Dados de estabilidade de HAIL-12 (tampão succinato)

HAIL-12 (50 e 100 mg/mL) foi formulada em 40 mM tampão succinato de Na, 100 mM de NaCl, e 0,03 % de Tween- 80, pH 6,0. O teste estabilidade em curso indica que a formulação é estável a 5, 25, e 37 °C durante pelo menos 12 semanas (Quadros 10 e 11).

Quadro 10. Resultados de estabilidade de HAIL-12 (50 mg/mL) a várias temperaturas.

T = 0					
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência
5 °C	Claro	99,27	0,27	0,47	99
T = 12 Semanas					
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência
5 °C	Claro	99,00	0,34	0,67	109
25 °C	Claro	98,05	0,92	1,04	76
37 °C	Claro	93,86	4,25	1,90	75
T = 6 Meses					
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência
5 °C	Claro	98,63	0,61	0,76	97
25 °C	Claro	97,1	1,67	1,22	78

Quadro 11. Resultados de estabilidade de HAIL-12 (100 mg/ml) a várias temperaturas.

T = 0				
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado
5 °C	Claro	99,2	0,31	0,49
T = 12 Semanas				
Amostra	Limpidez	% de monómero	% de Clip	% de Agregado
5 °C	Claro	98,9	0,31	0,78
25 °C	Claro	97,67	0,95	1,38
37 °C	Claro	93,26	4,14	2,6

Exemplo 11. Dados de estabilidade de HuEP5C7.

HuEP5C7 (anticorpo anti-selectina L, 50 e 100 mg/mL) foi formulada em 50 mM de tampão de histidina, 125 mM de cloreto de sódio, 0,01 % de Tween 80, pH 6,0. O teste estabilidade em curso indica que a formulação é estável

durante três meses a 25 °C e 45 °C e durante pelo menos 9 meses a 5 °C. Os resultados do teste de estabilidade de 9 meses a 5 °C são mostrados no Quadro 12. Os resultados de teste de estabilidade acelerado de 3 meses são mostrados no Quadro 13.

Quadro 12. Resultados de estabilidade de HuEP5C7 a 5 °C.

50 mg/mL				
Amostra	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência
T = 0	98,54	0,30	1,17	83
T = 9 meses	99,08	0	0,91	99
100 mg/mL				
Amostra	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência
T = 0	98,56	0,23	1,21	79
T = 9 meses	98,05	0,03	1,47	90

Quadro 13. Resultados de estabilidade de HuEP5C7 a várias temperaturas.

T = 3 meses				
Amostra	% de monómero	% de Clip	% de Agregado	% Potência
50 mg/mL 5 °C	99,48	0,14	0,39	121
50 mg/mL 25 °C	98,81	0,31	0,88	72
50mg/mL 45 °C	98,26	0,99	0,76	107
100 mg/mL 5 °C	99,03	0	0,97	93
100 mg/mL 25 °C	98,56	0,40	1,06	78
100 mg/mL 45 °C	97,88	0,92	1,20	91

A invenção, e a maneira e processo de preparar e usá-la, são agora descritos em tal termos completos, claros, concisos e exatos como para possibilitar qualquer perito na especialidade a que pertence, para preparar e usar a mesma. É para ser entendido que o anterior descreve formas de realização preferida da presente invenção e que modificações podem ser feitas na mesma sem se afastar do âmbito da presente invenção como exposto nas reivindicações. Para particularmente indicar reivindicar de forma distinta o objeto relacionado com a invenção, as seguintes reivindicações concluem este documento.

DOCUMENTOS REFERIDOS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de documentos referidos pelo autor do presente pedido de patente foi elaborada apenas para informação do leitor. Não é parte integrante do documento de patente europeia. Não obstante o cuidado na sua elaboração, o IEP não assume qualquer responsabilidade por eventuais erros ou omissões.

Documentos de patente referidos na descrição

- WO 8911297 A [0004]
- WO 9745140 A [0005]
- WO 9011091 A [0006]
- US 6171586 B [0007]
- US 20010014326 A1 [0008]
- US 5744132 A [0009]
- US 6267958 B [0010]
- US 6165467 A [0011]
- US 5091178 A [0030]

Literatura não relacionada com patentes, citada na descrição

- Peptide and Protein Drug Delivery. Marcel Dekker, 1991, 247-301 [0018]
- **Jones, A.** *Adv. Drug Delivery Rev.*, 1993, vol. 10, 29-90 [0018]
- *J. Pharm. Scien.*, 1994, vol. 83, 1645-1650 [0026]
- *Pharm. Res.*, 1994, vol. 11, 485 [0026]
- *J. Pharm. Bio. Anal.*, 1997, vol. 15, 1928 [0026]
- *J. Pharm. Bio. Anal.*, 1986, vol. 14, 1133-1140 [0026]
- *Pharm. Res.*, 1998, vol. 15, 200 [0026]
- *Pharm. Res.*, 1982, vol. 9, 109 [0026]
- *American Lab.*, November 1991 [0026]
- **Lindmark et al.** *J. Immuno/. Meth.*, 1983, vol. 62, 1-13 [0033]
- **Guss et al.** *EMBO J.*, 1986, vol. 5, 1567-1575 [0033]

- **Seekamp et al.** *Am. J. Pathol.*, 1994, vol. 11, 592-598 [0036]
- **Mulligan et al.** *J. Immunol.*, 1994, vol. 151, 832-840 [0036]
- **Box, George E.P. et al.** *Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building.* John Wiley and Sons, Inc, 1978 [0038]

REIVINDICAÇÕES

1. Uma formulação farmacêutica líquida estável que compreende:

20-60 mM de tampão succinato que tem pH desde pH 5,5 até pH 6,5,

0,02 % - 0,04 % de polissorbato,

75-150 mM de cloreto de sódio, e

um anticorpo que tem uma concentração de 50 mg/ml ou mais, em que o anticorpo é um anticorpo monoclonal humanizado recombinante de subclasse IgG1 chamado "daclizumab" que se liga à subunidade p55 do receptor de IL-2 expresso em células T activadas e tem um peso de monómero de aproximadamente 150.000 daltons.

2. A formulação farmacêutica líquida estável de acordo com a reivindicação 1, em que o dito anticorpo tem uma concentração de 100 mg/ml ou mais.

3. A formulação farmacêutica líquida estável de acordo com a reivindicação 1, em que o dito tampão succinato é succinato de sódio.

4. A formulação farmacêutica líquida estável de acordo com a reivindicação 3, em que a dita formulação é adequada para administração parentérica.

5. A formulação farmacêutica líquida estável de acordo com a reivindicação 3, em que a dita formulação é adequada para administração subcutânea.

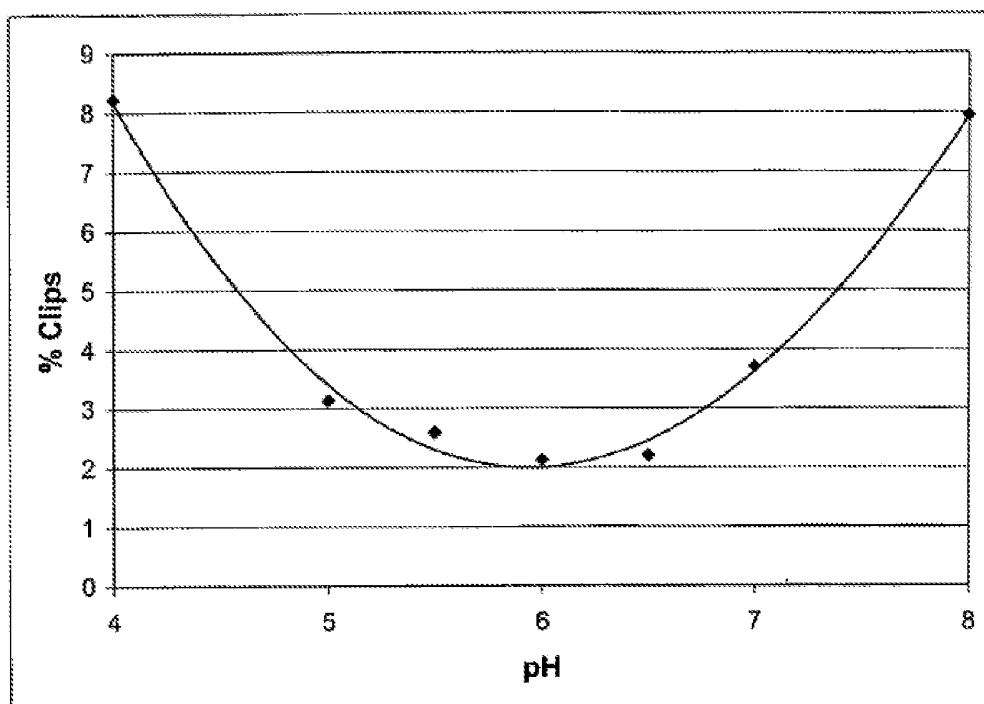


FIG. 1A

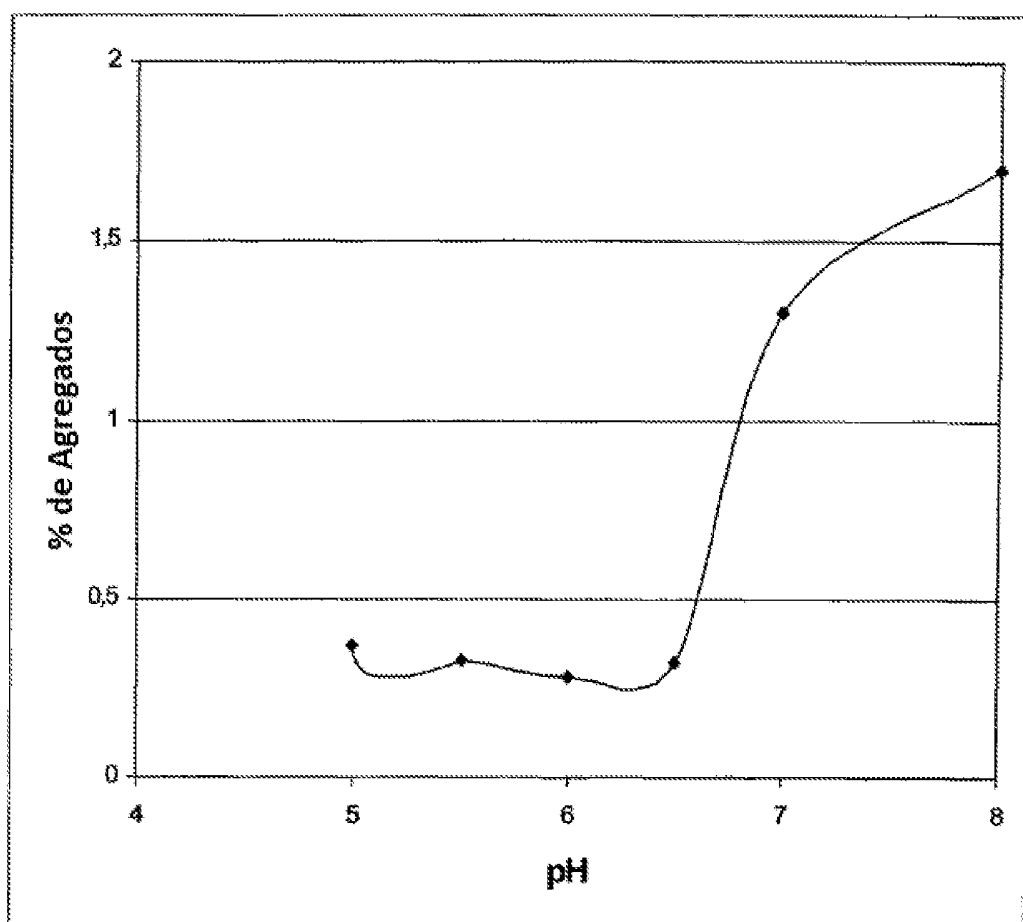


FIG. 1B

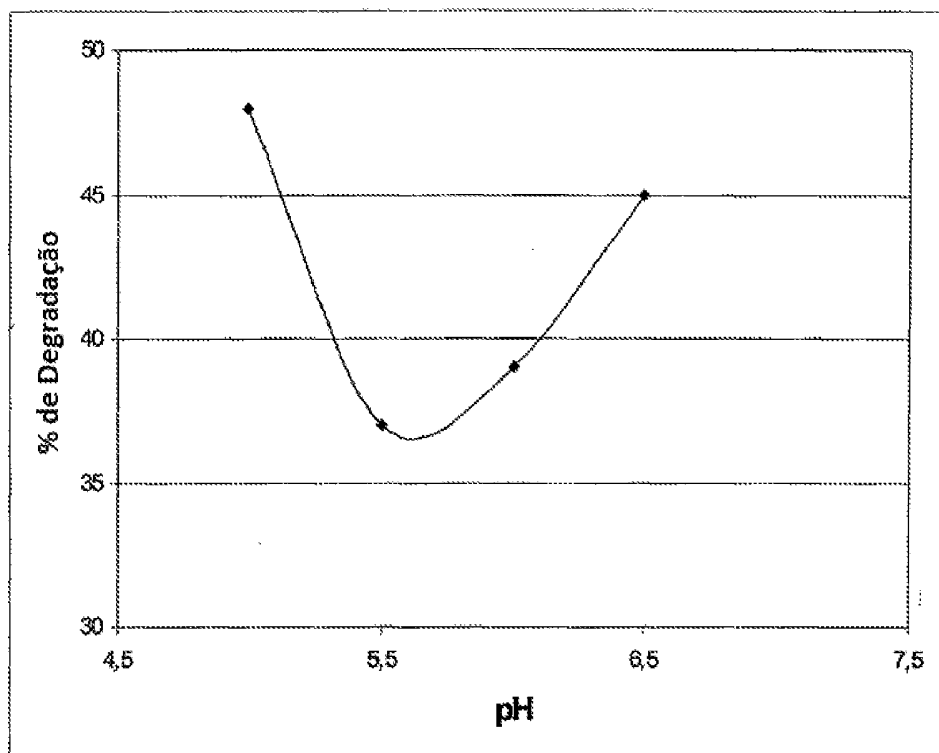
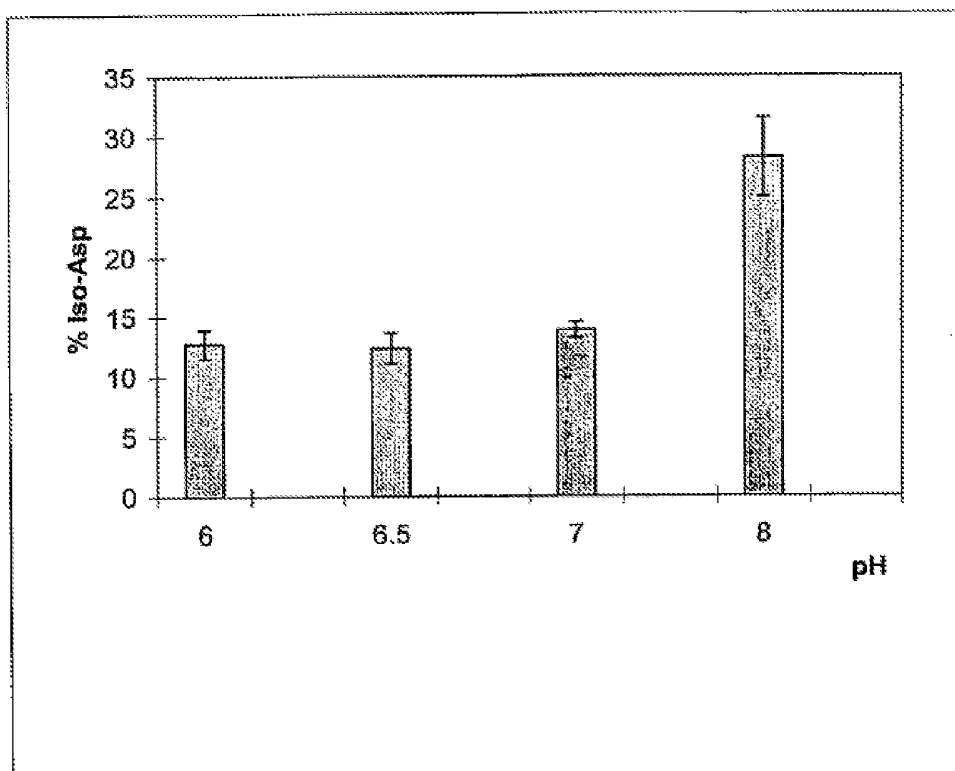


FIG. 2

**FIG. 3**

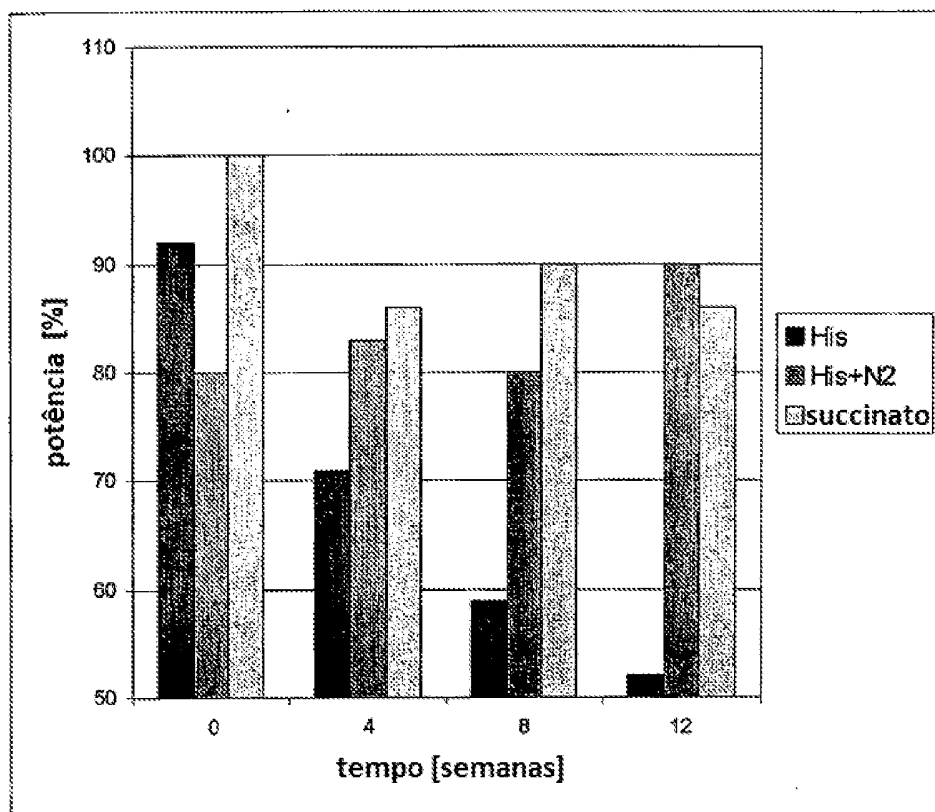


FIG. 4