



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 974 895**

⑫ Int. Cl.:

<b>A61K 39/395</b>	(2006.01)	<b>A61P 17/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/10</b>	(2007.01)	<b>A61P 11/06</b>	(2006.01)
<b>A61K 38/00</b>	(2006.01)	<b>A61P 37/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 39/00</b>	(2006.01)	<b>C07K 16/24</b>	(2006.01)
<b>A61K 47/18</b>	(2007.01)	<b>A61P 43/00</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/08</b>	(2006.01)		
<b>A61K 47/26</b>	(2006.01)		
<b>A61P 37/08</b>	(2006.01)		
<b>A61P 29/00</b>	(2006.01)		
<b>A61P 19/02</b>	(2006.01)		

⑫

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

⑬ Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.05.2015 PCT/EP2015/059709**

⑭ Fecha y número de publicación internacional: **12.11.2015 WO15169742**

⑮ Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.05.2015 E 15720968 (5)**

⑯ Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.01.2024 EP 3139960**

⑭ Título: **Formulación líquida que comprende un compuesto neutralizante de GM-CSF**

⑩ Prioridad:

07.05.2014 EP 14167405  
16.05.2014 US 201461994319 P  
29.08.2014 US 201462043636 P

⑮ Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**02.07.2024**

⑬ Titular/es:

**TAKEDA PHARMACEUTICAL COMPANY LIMITED (100.0%)**  
1-1, Doshomachi 4-chome, Chuo-ku  
Osaka-shi, Osaka, JP

⑯ Inventor/es:

**DILUZIO, WILLOW y  
NGUYEN, PHUONG**

⑭ Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

Observaciones:

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

**ES 2 974 895 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

Formulación líquida que comprende un compuesto neutralizante de GM-CSF

5 La presente invención se refiere a formulaciones acuosas estables que comprenden un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo que neutraliza el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF). Los ingredientes de las formulaciones proporcionan preferiblemente estabilidad durante ciclos de almacenamiento a largo plazo y de congelación-descongelación. En un aspecto preferido, las formulaciones son para uso en terapia, preferiblemente para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, 10 incluidos preferiblemente trastornos alérgicos y psoriásicos, así como trastornos artríticos y asmáticos.

15 Se usan proteínas en una amplia gama de aplicaciones en los campos de los productos farmacéuticos, productos veterinarios, cosméticos y otros productos de consumo, alimentos, pienso, diagnósticos, química industrial y descontaminación. A veces, tales usos han estado limitados por restricciones inherentes a las propias proteínas o impuestas por el medio o entorno en el que se usan. Tales restricciones pueden dar como resultado una mala 20 estabilidad de las proteínas, variabilidad del rendimiento o alto coste. Debido a la llegada de la biotecnología, es posible producir una amplia variedad de proteínas para aplicaciones terapéuticas. Después de su producción, los productos farmacéuticos proteicos habitualmente se almacenan antes de su uso. Debido al hecho de que las proteínas son generalmente más grandes y más complejas que los productos farmacéuticos "tradicionales", la formulación y el procesamiento de productos farmacéuticos proteicos que son adecuados para almacenamiento pueden ser particularmente desafiantes. Para revisiones de la formulación farmacéutica de proteínas y el diseño del proceso, véanse Carpenter *et al.* (1997), Pharm. Res. 14: 969-975; Wang (2000), Int. J. Pharmaceutics 203: 1 -60; y Tang y 25 Pikal (2004), Pharm. Res. 21: 191-200.

30 25 Pueden considerarse varios factores en el diseño de formulaciones y procesos para la producción farmacéutica de proteínas. Una preocupación principal es la estabilidad de la proteína a través de cualquiera o todas las etapas de fabricación, transporte y etapas de manipulación, que pueden incluir preparación de la composición, congelación, liofilización, secado, almacenamiento, envío, reconstitución, ciclos de congelación/descongelación y almacenamiento posterior a la reconstitución por parte del usuario final. Otras posibles consideraciones incluyen facilidad y economía 35 de fabricación, manipulación y distribución; composición del producto final para la administración al paciente; y facilidad de uso por parte del usuario final, incluida la solubilidad de la formulación liofilizada tras la reconstitución.

40 35 Las formulaciones líquidas pueden satisfacer ciertos objetivos. Las posibles ventajas de las formulaciones líquidas incluyen facilidad y economía de fabricación y conveniencia para el usuario final. Con frecuencia, cuando se almacenan durante períodos prolongados, los polipéptidos son inestables en disolución (Manning *et al.* (1989), Pharm. Res. 6: 903-918). Por consiguiente, se han desarrollado etapas de procesamiento adicionales para permitir una vida útil más prolongada, incluido secado, por ejemplo, liofilización. Las formulaciones liofilizadas también pueden proporcionar ciertas ventajas. Los posibles beneficios de la liofilización incluyen una estabilidad mejorada de las proteínas, así como facilidad y economía de envío y almacenamiento. Sin embargo, las composiciones farmacéuticas 45 liofilizadas pueden ser menos convenientes para el usuario final.

50 45 Además de la elección de la forma básica de la composición (por ejemplo, liofilizada, líquida, congelada, etc.), la optimización de una formulación proteica implica normalmente variar los componentes de la formulación y sus concentraciones respectivas para maximizar la estabilidad de la proteína. Una variedad de factores pueden afectar a la estabilidad de la proteína, incluida la fuerza iónica, el pH, la temperatura, los ciclos de congelación/descongelación, las fuerzas de cizallamiento, la congelación, la liofilización, el secado, la agitación y la reconstitución. La inestabilidad de las proteínas puede estar provocada por degradación física (por ejemplo, desnaturalización, agregación o precipitación) o degradación química (por ejemplo, desamidación, oxidación o hidrólisis). La optimización de los componentes y concentraciones de la formulación se basa únicamente en estudios empíricos y/o enfoques racionales 50 para superar las fuentes de inestabilidad.

55 50 A veces, en almacenamiento a largo plazo de composiciones farmacéuticas que contienen polipéptidos, incluidas formulaciones acuosas y liofilizadas, pueden perderse polipéptidos activos debido a agregación y/o degradación.

60 55 Por consiguiente, las prácticas típicas para mejorar la estabilidad del polipéptido pueden abordarse variando la concentración de elementos dentro de la formulación, o añadiendo excipientes para modificar la formulación (patentes estadounidenses n.ºs 5.580.856 y 6.171.586 y solicitudes de patente estadounidense n.ºs US 2003/0202972, US 2003/0180287). El documento US 5.580.856 es una patente prototípica que da a conocer agentes tales como polímeros naturales, tensioactivos, polisacáridos sulfatados, proteínas y tampones que pueden añadirse para estabilizar una proteína seca durante o después de la rehidratación. Sin embargo, aparte de muchas opciones, la patente estadounidense 5.580.856 no enseña qué estabilizador debe añadirse para qué proteína. Por consiguiente, aunque el lector experto es consciente de esas muchas opciones, tendría que averiguar para su proteína las mejores condiciones entre las muchas opciones descritas por el documento US 5.580.856. La solicitud de patente estadounidense 2003/0202972 describe una formulación liofilizada estable de un anticuerpo anti-Her2, en la que el estabilizador es azúcar, trehalosa o un tampón. Sin embargo, aunque estos estabilizadores pueden ser útiles para un anticuerpo, no 65 60 pueden extrapolarse a otras proteínas. La solicitud de patente estadounidense 2003/0180287 es similar al documento

US 2003/0202972 en que también describe una disolución estable de una proteína similar a inmunoglobulina, es decir, una proteína que contiene un dominio Fc. El estabilizador puede ser fosfato de sodio, fosfato de potasio, citrato de sodio o potasio, ácido maleico, acetato de amonio, tampón Tris, acetato, dietaolamina, histidina, lisina o cisteína. Entre estos estabilizadores químicamente distintos que podría elegir el lector experto, la lisina resultó ser adecuada. Sin embargo, como con el documento US 2003/0202972, el estabilizador específico es simplemente adecuado para una proteína específica, en este caso una proteína que contiene dominio Fc, y no puede extrapolarse *per se* a otra proteína. Lo mismo se aplica al documento US2001/014326, que también se refiere a formulaciones liofilizadas estables de anticuerpos anti-HER2, así como de anticuerpos anti-IgE. Las formulaciones según el documento US2001/014326 están liofilizadas, y después se reconstituyen. Tales formulaciones reconstituidas se han sometido a prueba para determinar su estabilidad, en concentraciones de 25 mg/ml o de 100 mg/ml, durante hasta 90 días. Por consiguiente, el uso de aditivos no puede extrapolarse de una proteína específica a otra proteína no relacionada. De hecho, el uso de aditivos, aunque mejora el almacenamiento, todavía puede dar como resultado polipéptidos inactivos. Además, en el caso de la liofilización, la etapa de rehidratación puede introducir condiciones que dan como resultado la inactivación del polipéptido mediante, por ejemplo, agregación o desnaturización (Hora *et al.* (1992), Pharm. Res., 9: 33-36; Liu *et al.* (1991), Biotechnol. Bioeng., 37: 177-184). De hecho, la agregación de polipéptidos no es deseable, ya que puede dar como resultado inmunogenicidad (Cleland *et al.* (1993), Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Systems, 10: 307-377; y Robbins *et al.* (1987), Diabetes, 36: 838-845).

El mantenimiento de la actividad biológica durante el desarrollo y la fabricación de productos farmacéuticos depende de la estabilidad inherente de la macromolécula, así como de las técnicas de estabilización empleadas. Existe una variedad de técnicas de estabilización de proteínas; incluida la adición de "estabilizadores" químicos a la disolución o suspensión acuosa de una proteína. Por ejemplo, la patente estadounidense 4.297.344 da a conocer la estabilización de los factores de coagulación II y VIII, antitrombina III y plasminógeno frente al calor mediante la adición de aminoácidos seleccionados. La patente estadounidense 4.783.441 da a conocer un método para estabilizar proteínas mediante la adición de sustancias tensioactivas. La patente estadounidense 4.812.557 da a conocer un método para estabilizar interleucina-2 usando albúmina sérica humana. Métodos de congelación/descongelación en los que la preparación se mezcla con un crioprotector y se almacena a temperaturas muy bajas son otra opción para estabilizar una proteína. Sin embargo, no todas las proteínas sobrevivirán a un ciclo de congelación/descongelación. El almacenamiento en frío con aditivo crioprotector, normalmente el glicerol, es una opción adicional. También podría realizarse almacenamiento en forma de cristal, como se describe en la patente estadounidense 5.098.893. En este caso, las proteínas se disuelven en sustancias solubles en agua o hinchables en agua que están en estado amorfo o vítreo. El método más ampliamente usado para la estabilización de proteínas es el secado por congelación o liofilización. Siempre que no pueda lograrse suficiente estabilidad de la proteína en disolución acuosa, la liofilización proporciona la alternativa más viable. Una desventaja de la liofilización es que requiere un procesamiento sofisticado, requiere mucho tiempo y es costosa. Además, si la liofilización no se lleva a cabo cuidadosamente, la mayoría de las preparaciones se desnaturizan al menos parcialmente por las etapas de congelación y deshidratación de la técnica. El resultado es frecuentemente la agregación irreversible de una porción de moléculas de proteína, haciendo que la formulación sea inaceptable para la administración parenteral.

En términos generales, la degradación de proteínas se ha descrito bien en la bibliografía, pero el almacenamiento y la solubilidad de compuestos que neutralizan el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (denominado además GM-CSF), en particular de polipéptidos y anticuerpos anti-GM-CSF, no se ha descrito.

Además, aunque se sabía en la técnica que estaban disponibles una multitud de opciones para agentes estabilizadores de proteínas, así como para agentes que permiten una alta concentración de una proteína mientras se mantiene estable, hasta la presente invención, no se reconoció en la técnica que una formulación que comprende compuestos que neutralizan GM-CSF en altas concentraciones podría ser inestable y, por lo tanto, requerir mejora.

El documento WO2014/044768 da a conocer una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-GM-CSF, que comprende además histidina 30 mM, pH 6,0, sorbitol 200 mM y Tween-80 al 0,02 % para estabilizar dicho compuesto que neutraliza GM-CSF (véase la pág. 13, líneas 16-20 del documento WO2014/044768). Sin embargo, el anticuerpo anti-GM-CSF del documento WO2014/044768 se refiere al MOR103 (también denominado MOR04357) que comprende seis secuencias de CDR diferentes en comparación con el anticuerpo frente a GM-CSF de la presente invención. Además, el documento WO2014/044768 tampoco da a conocer la concentración particular del anticuerpo de al menos 50 mg/ml y menos de 200 mg/ml. El documento WO2014/068026 también se refiere a formulaciones de anticuerpos frente a GM-CSF. La diferencia entre el documento WO2014/068026 y la presente solicitud es que el solicitante encontró sorprendentemente que el uso del tensioactivo polisorbato 80 en concentraciones específicas estabiliza la formulación y permite una alta concentración para dicho anticuerpo. Por el contrario, el documento WO2014/068026 mostró que la adición de un tensioactivo, tal como polisorbato 80, no fue eficaz en absoluto (véase el ejemplo 7 del documento WO2014/068026).

En la preparación de una composición farmacéutica que comprende una proteína, tal como un anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal, es un objetivo desarrollar formulaciones líquidas de alta concentración debido al potencial de la administración subcutánea que da como resultado una mayor comodidad para el paciente. Sin embargo, existe un consenso general de que el desarrollo de formulaciones de anticuerpos de alta concentración, en particular anticuerpos monoclonales, plantea serios desafíos con respecto a la estabilidad física y química de los anticuerpos

monoclonales, como un aumento de la formación de agregados o partículas solubles e insolubles que potencian la probabilidad de una respuesta inmunogénica, así como dan lugar a una baja bioactividad.

- 5 La formación de partículas o agregados por un polipéptido durante el almacenamiento de una composición farmacéutica líquida puede afectar negativamente a la actividad biológica de ese polipéptido, dando como resultado la pérdida de eficacia terapéutica de la composición farmacéutica. Además, la formación de agregados o partículas puede causar otros desafíos, como el bloqueo de tubos, membranas o bombas cuando la composición farmacéutica que contiene polipéptido se administra usando un sistema de infusión.
- 10 Además, se ha notificado que las formulaciones de anticuerpos de alta concentración dan como resultado una viscosidad aumentada, creando de ese modo serios desafíos para la capacidad de fabricación y la inyectabilidad. Las formulaciones altamente viscosas son difíciles de fabricar, aspirar en una jeringa e inyectar. El uso de fuerza en la manipulación de las formulaciones viscosas conduce a una excesiva formación de espuma, lo que puede conducir a la desnaturalización e inactivación de anticuerpos monoclonales activos.
- 15 Por lo tanto, existe una gran necesidad de una composición farmacéutica de proteínas estable y altamente concentrada que comprenda un compuesto que neutraliza GM-CSF, por ejemplo, un anticuerpo y que tenga una viscosidad baja y factible que sea adecuada para administración subcutánea, tal como en un dispositivo listo para usar. Además, desde el punto de vista del paciente, sería sumamente deseable tener productos estables a temperatura ambiente. En este momento, en particular, no hay formulaciones de anticuerpos comercializadas donde el almacenamiento a temperatura ambiente sea una posibilidad durante toda la vida útil del medicamento. Normalmente, se produce un aumento de la agregación de proteínas que provoca un nivel inaceptablemente alto de agregados e impurezas relacionadas con proteínas, lo que puede dar lugar a reacciones inmunogénicas.
- 20 25 El factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), inicialmente identificado como un factor de crecimiento hematopoyético, se ha mostrado más recientemente que es una citocina importante en la inflamación y autoinmunidad. Se miden niveles elevados de ARNm o proteína de GM-CSF en una variedad de sitios inflamatorios, incluido en pacientes alérgicos y psoriásicos, pacientes artríticos y asmáticos. Numerosos estudios *in vivo* han demostrado en los últimos años que el bloqueo de GM-CSF por medio de anticuerpos neutralizantes puede prevenir o incluso curar enfermedades proinflamatorias en diversos modelos de inflamación, incluidos modelos para artritis experimental, encefalitis autoinmunitaria, psoriasis y enfermedad pulmonar. Por lo tanto, es altamente deseable tener disponible una formulación con un compuesto neutralizante de GM-CSF que sea, en particular, estable, contenga altas cantidades de un compuesto neutralizante de GM-CSF y/o pueda administrarse por medio de la vía subcutánea.
- 30 35 Por lo tanto, el desafío técnico de la presente invención es cumplir con las necesidades descritas anteriormente.
- La presente invención aborda estas necesidades y, por lo tanto, proporciona como solución al desafío técnico las realizaciones relativas a formulaciones, así como métodos y usos que aplican estas formulaciones en el tratamiento de sujetos que padecen enfermedades que se beneficiarían de la administración de compuestos que neutralizan GM-CSF. Estas realizaciones se caracterizan y describen en el presente documento, se ilustran en los ejemplos y se reflejan en las reivindicaciones.
- 40 45 Debe indicarse que, como se usan en el presente documento, las formas singulares "un", "una" y "el/la", incluyen referencias en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a "un anticuerpo" incluye uno o más de tales anticuerpos diferentes.
- 50 55 A menos que se indique lo contrario, debe entenderse que el término "al menos" que precede a una serie de elementos se refiere a cada elemento de la serie. A lo largo de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto requiera lo contrario, la palabra "comprender", y variaciones tales como "comprende" y "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas establecidos, pero no la exclusión de ningún otro número entero o etapa o grupo de números enteros o etapas. Cuando se usa en el presente documento, el término "que comprende" puede sustituirse con el término "que contiene" o, a veces, cuando se usa en el presente documento, con el término "que tiene" o incluso podría reemplazarse por que consiste en.
- 60 65 Cuando se usa en el presente documento "que consiste en" excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de la reivindicación. Cuando se usa en el presente documento, "que consiste esencialmente en" no excluye materiales o etapas que no afecten materialmente a las características básicas y novedosas de la reivindicación. En cada caso en el presente documento, cualquiera de los términos "que consiste esencialmente en" y "que consiste en" pueden reemplazarse entre sí.
- 70 Como se usa en el presente documento, se entiende que el término conjuntivo "y/o" entre múltiples elementos enumerados abarca tanto opciones individuales como combinadas. Por ejemplo, donde dos elementos están unidos por "y/o", una primera opción se refiere a la aplicabilidad del primer elemento sin el segundo. Una segunda opción se refiere a la aplicabilidad del segundo elemento sin el primero. Una tercera opción se refiere a la aplicabilidad de los elementos primero y segundo juntos. Se entiende que cualquiera de estas opciones está dentro del significado y, por

lo tanto, satisface el requisito del término "y/o" como se usa en el presente documento. También se entiende que la aplicabilidad concurrente de más de una de las opciones se encuentra dentro del significado y, por lo tanto, satisface el requisito del término "y/o" como se usa en el presente documento.

5 A continuación se describen diversos aspectos y realizaciones de la invención.

La presente invención se refiere a una composición acuosa que comprende

10 i) un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo que se une a GM-CSF, en la que el anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 34 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 35, que está presente en una concentración de desde 50 mg/ml hasta 180 mg/ml,

15 ii) sorbitol al 5 % (p/v);

iii) L-histidina 30 mM;

iv) de desde el 0,01 % hasta el 0,08 % (p/v) de polisorbato 80,

20 y tiene un pH de 5,8.

Además, la presente invención se refiere a la composición anterior que comprende además un antioxidante.

25 La presente invención también se refiere a la composición como se mencionó anteriormente, en la que la cantidad de polisorbato 80 está por encima de la CAC.

La presente invención también se refiere a la composición como se mencionó anteriormente, en la que la razón de polisorbato 80 con respecto a proteína es de desde aproximadamente 0,3:1 hasta aproximadamente 0,6:1.

30 Además, la presente invención se refiere a la composición como se mencionó anteriormente que comprende aproximadamente 80 mg/ml o 150 mg/ml del anticuerpo o un fragmento funcional del mismo que se une a GM-CSF.

La presente invención también se refiere a la composición como se mencionó anteriormente, que es estable durante al menos 24 meses a aproximadamente 2-8 °C o al menos 28 días a temperatura ambiente.

35 La presente invención también se refiere a la composición como se mencionó anteriormente, que se envasa en una jeringa precargada.

40 Finalmente, la presente invención se refiere a la composición como se mencionó anteriormente para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, en donde los trastornos se seleccionan de trastornos alérgicos, psoriásicos, artríticos y asmáticos.

45 Teniendo en cuenta el objetivo de proporcionar una formulación que tenga una alta concentración de compuestos que neutralizan GM-CSF, los presentes inventores reconocieron que los compuestos que neutralizan GM-CSF pueden ser inestables a altas concentraciones y también pueden ser inestables durante un período prolongado de almacenamiento.

50 De hecho, hay muchas formas en que los compuestos que neutralizan GM-CSF, como proteínas, puede ser inestables. Por ejemplo, la inestabilidad de las proteínas podría estar provocada por la agregación o degradación de las proteínas, pero también por inestabilidad química debida a desaminación, desamidación, oxidación, rotura y formación de enlaces disulfuro, hidrólisis, succinimidación, reticulación sin disulfuro, desglicosilación o "pardeamiento enzimático" (reacción de Maillard) o cualquier combinación de estos fenómenos; véase, por ejemplo, Wang *et al.* (1999), Int. J. Pharm. 185: 129-188. Además, parámetros fisicoquímicos tales como temperatura, valor de pH, adsorción superficial, sales, iones metálicos, agentes quelantes, fuerzas físicas tales como fuerzas de cizallamiento, desnaturizantes de proteínas, disolventes no acuosos, concentración de proteína, fuente y pureza de la proteína, morfismo o presión de las proteínas pueden influir en la estabilidad de las proteínas.

60 Sin embargo, aunque muchos factores pueden influir en la estabilidad de la proteína, también podrían tomarse muchas medidas para estabilizar una proteína. Por ejemplo, una proteína puede estabilizarse internamente (mediante el cambio de aminoácidos) o externamente. La estabilización externa podría lograrse mediante la adición de agentes quelantes, iones metálicos, agentes reductores, polímeros, polietilenglicoles/polioles, albúmina sérica, tensioactivos, azúcares y polioles, ácidos grasos y fosfolípidos, aminoácidos, tampones, etc., véanse, por ejemplo, Wang, Y y Hanson M (1988), J. Parental Sci. & Technology, 42, suplemento: 4-26; Wang *et al.* (1999), Int. J. Pharm. 185: 129-188. En resumen, para estabilizar compuestos neutralizantes de GM-CSF tales como anticuerpos en una formulación, el experto habría tenido muchas opciones disponibles.

En el presente caso, los inventores observaron que los compuestos que neutralizan GM-CSF pueden mostrar agregación y/o pueden no disolverse en concentraciones más altas. Muchos factores diferentes pueden provocar la agregación de una proteína en una formulación. Los procedimientos típicos de purificación y almacenamiento pueden exponer las formulaciones de proteínas a condiciones y componentes que hacen que la proteína se agregue en dímeros, trímeros o multímeros de proteínas, partículas subvisibles más grandes y partículas visibles. Por ejemplo, las proteínas en una formulación pueden agregarse como resultado de uno cualquiera o más de los siguientes: almacenamiento, exposición a temperaturas elevadas, el pH de la formulación, la fuerza iónica de la formulación y la presencia de ciertos tensioactivos y agentes emulsionantes. De manera similar, las proteínas pueden agregarse cuando se exponen a tensión de cizallamiento, tal como, reconstitución de una torta de proteína liofilizada en disolución, purificación por filtración de una muestra de proteína, congelación-descongelación, agitación o transferencia de una disolución de proteína a través de una jeringa. La agregación también puede producirse como resultado de interacciones de moléculas de polipéptidos en disolución y en las interfaces líquido-aire dentro de los viales de almacenamiento. Pueden producirse cambios conformacionales en polipéptidos adsorvidos en interfaces aire-líquido y sólido-líquido durante la compresión o extensión de las interfaces resultantes de la agitación durante el transporte. Tal agitación puede hacer que la proteína de una formulación se agregue y finalmente precipite con otras proteínas adsorvidas. El crecimiento de partículas subvisibles puede indicar una tendencia a formar partículas visibles. En general, la formación de diferentes tipos de agregados y partículas puede analizarse mediante diferentes sistemas de medición basados en el tamaño de los agregados o partículas. Por ejemplo, SEC, DLS, AUC miden dímeros, trímeros, multímeros que están en el intervalo de tamaño nanométrico; oscurecimiento de la luz, microscopía, obtención de imágenes dinámicas, citometría de flujo y Coulter miden partículas subvisibles por encima de 1  $\mu\text{m}$  y partículas visibles pequeñas.

Además, la exposición de una formulación de proteína a la luz puede hacer que la proteína se agregue. Por lo tanto, la presente invención proporciona formulaciones que permiten altas concentraciones de compuestos que neutralizan GM-CSF y que reducen la agregación de estos compuestos. Sin estar limitado por la teoría, se cree que la reducción de la agregación se logra controlando uno o más de los mecanismos de agregación mencionados anteriormente. Esto puede dar como resultado, por ejemplo, estabilidad mejorada del producto y mayor flexibilidad en los procesos de fabricación y las condiciones de almacenamiento.

Los presentes inventores tenían como objetivo proporcionar una formulación con una alta concentración de compuestos que neutralizan GM-CSF, para, por ejemplo, permitir un menor volumen de inyección que sea adecuado para reducir los efectos secundarios como el dolor debido al alto volumen de inyección o que permita la administración subcutánea a un volumen bajo.

Siendo así, los presentes inventores han observado durante sus estudios cierta inestabilidad de compuestos que neutralizan GM-CSF y, por lo tanto, han tenido como objetivo mejorar esta observación no deseada. Por consiguiente, tenían como objetivo concentrar compuestos neutralizantes de GM-CSF mientras se mantenían en disolución, es decir, en una fase disuelta. Al hacerlo, tenían una multitud de opciones y alternativas disponibles, sin embargo, sin ninguna indicación de que ninguna de ellas fuera adecuada para resolver el problema objetivo.

"Fase disuelta" significa que el compuesto que neutraliza GM-CSF, preferiblemente en una concentración de al menos aproximadamente 20 mg/ml, está en disolución, es decir, disuelto y/o dispersado directamente en la disolución acuosa (es decir, en la fase acuosa) de la formulación. Preferiblemente, el compuesto que neutraliza GM-CSF está disuelto y/o disperso homogéneamente. Homogéneamente significa que el compuesto que neutraliza GM-CSF que está disuelto y/o disperso en la formulación acuosa está distribuido casi uniformemente, de manera preferible uniformemente distribuido en la formulación acuosa de modo que la concentración ("c") del compuesto que neutraliza GM-CSF ("n" en caso de masa molar o "m" en caso de masa) es casi idéntica, preferiblemente idéntica en (o en todo) el volumen ("v") de la disolución acuosa, es decir,  $c=n/v$  o  $c=m/v$ , respectivamente, es casi constante, preferiblemente constante. Preferiblemente, no hay gradiente de concentración dentro de la formulación.

Por consiguiente, la formulación estable de la presente invención que comprende un compuesto que neutraliza GM-CSF, que es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo que se une a GM-CSF como se define en el presente documento, se considera como una disolución acuosa, en la que dicho compuesto que neutraliza GM-CSF se disuelve y/o dispersa directamente en el mismo.

Una "disolución" es una mezcla homogénea de dos o más sustancias/componentes. En tal mezcla, un soluto (en la presente invención, un compuesto que neutraliza GM-CSF) se disuelve (como se describió anteriormente) en otra sustancia (en la presente invención, preferiblemente una formulación acuosa), también conocido como disolvente.

Dado lo anterior, el compuesto que neutraliza GM-CSF preferiblemente no se disuelve y/o dispersa heterogéneamente en la disolución acuosa. El término "estado disuelto" también incluye que el compuesto que neutraliza GM-CSF preferiblemente no está emulsionado esencialmente, o más preferiblemente no emulsionado en absoluto en la disolución acuosa.

Además, el término "estado disuelto" incluye que el compuesto que neutraliza GM-CSF preferiblemente no esté esencialmente encapsulado y/o atrapado (preferiblemente menos del 2 %, 1 % o 0,5 % del compuesto que neutraliza

GM-CSF puede estar encapsulado y/o atrapado, o más preferiblemente no encapsulado y/o atrapado en absoluto, por ejemplo, en liposomas, liposomas multilamelares o similares.

- Por consiguiente, una realización preferida de la presente invención es una formulación líquida que contiene un compuesto que neutraliza GM-CSF, que es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo que se une a GM-CSF como se define en el presente documento, que es estable y no experimenta la formación de conjugados/agregados/partículas o fragmentos/productos de degradación cuando se almacenan durante un largo período, y formulación que es adecuada para administración subcutánea.
- 10 Específicamente, después de someter a prueba muchos agentes estabilizadores diferentes, los presentes inventores encontraron que el compuesto que neutraliza GM-CSF, que es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo que se une a GM-CSF como se define en el presente documento, podría estabilizarse si se añade un modificador de la tonicidad a la disolución que va a almacenarse. Los ejemplos de modificadores de la tonicidad incluyen, pero no se limitan a, azúcares y alcoholes de azúcar. Los azúcares simples se denominan monosacáridos e incluyen glucosa, fructosa, galactosa, xilosa, ribosa, manosa, lactulosa, alosa, altrosa, gulosa, idosa, talosa, arabinosa y lixosa. También pueden estar comprendidos disacáridos que incluyen, por ejemplo, sacarosa, maltosa, lactosa, isomaltosa, trehalosa y celubiosa. Los alcoholes de azúcar incluyen sorbitol, manitol, glicerina, eritritol, maltitol, xilitol, poliglicitol. El azúcar puede ser un azúcar no reductor tal como sacarosa o trehalosa. Los azúcares no reductores se caracterizan por la ausencia de una estructura de cadena abierta, por lo que no son susceptibles a reacciones de oxidación-reducción. Por lo tanto, podría añadirse uno o más de los azúcares no reductores, tales como sacarosa o trehalosa, o uno o más de los alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol a la formulación que comprende un compuesto neutralizante de GM-CSF. También podrían añadirse combinaciones de azúcares no reductores y alcoholes de azúcar a la disolución, tales como sacarosa y manitol, sacarosa y sorbitol, trehalosa y manitol, o trehalosa y sorbitol. Más preferiblemente, se añaden los alcoholes de azúcar manitol y/o sorbitol, preferiblemente en su forma D. El modificador de la tonicidad de la presente invención es sorbitol que se añade a la disolución. La concentración del modificador de la tonicidad, específicamente sorbitol, es del 5 % (p/v).
- 30 Otra sustancia específicamente preferida para estabilizar el compuesto que neutraliza GM-CSF, que es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo que se une a GM-CSF como se define en el presente documento, a una alta concentración con respecto al almacenamiento a largo plazo es un sistema tampón con un pH de 5,8. El tampón de la invención es un tampón de histidina. Cuando se hace referencia en el presente documento, se pretende que un aminoácido sea un L-aminoácido o D-aminoácido, en donde se prefiere L-amino. Específicamente, se usa histidina o una sal de la misma para el sistema tampón. Preferiblemente, la sal es un cloruro, fosfato, acetato o sulfato, más preferiblemente, la sal es un cloruro. El pH del sistema tampón de histidina de la presente invención es 35 5,8. El pH puede ajustarse mediante el uso de bases y ácidos usados convencionalmente, preferiblemente NaOH o puede usarse una mezcla de histidina y una sal de histidina de modo que no se requiera ajuste del pH. La concentración del sistema tampón, específicamente el sistema tampón de histidina de la presente invención, es de 30 mM.
- 40 Además, los presentes inventores descubrieron que el compuesto que neutraliza GM-CSF, que es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo que se une a GM-CSF como se define en el presente documento, podría estabilizarse si se añaden uno o más de tensioactivos, aminoácidos, antioxidantes y/o quelantes a la disolución que va a almacenarse.
- 45 La combinación del sistema tampón, específicamente el tampón de histidina, el modificador de la tonicidad, específicamente sorbitol, y el tensioactivo, específicamente polisorbato 80 (PS80; TWEEN® 80) se usa para estabilizar el compuesto que neutraliza GM-CSF en la disolución, que es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo que se une a GM-CSF como se define en el presente documento, para evitar la agregación y hacer que la formulación sea suficientemente estable para el almacenamiento a largo plazo y/o uno o más ciclos de congelación/descongelación. Se demostró que es preferible en cuanto a la estabilidad tener aproximadamente un 6 % (p/v) y más de alcohol de azúcar, preferiblemente sorbitol, en la formulación. Sin embargo, el límite superior para la osmolalidad de la formulación se establece en aproximadamente 500 mOsm/kg, que todavía es hiperosmótico pero similar a la osmolalidad de un producto aprobado (Synagis; administración Lm.). Por tanto, tenía que encontrarse compromiso entre estabilidad óptima, tonicidad y concentración del compuesto que neutraliza GM-CSF, como se describe en los ejemplos de la presente invención. La concentración de sorbitol, que se usa en la presente invención, es por lo tanto del 5 % (p/v).
- 60 En algunas realizaciones de la presente invención, las formulaciones o composiciones de la invención que comprenden un compuesto neutralizante de GM-CSF están libres o esencialmente libres de cloruro de sodio. Por "esencialmente libre" quiere decirse que la concentración de cloruro de sodio está en o muy cerca de 0 (cero) mM, por ejemplo, menos de aproximadamente 50 mM, preferiblemente menos de aproximadamente 20 mM, más preferiblemente menos de aproximadamente 10 mM, incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 5 mM y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 2 mM o incluso menos de aproximadamente 1 mM.
- 65 La concentración del compuesto respectivo que neutraliza GM-CSF usado, que es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo que se une a GM-CSF como se define en el presente documento, es de desde 50

mg/ml hasta 180 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 60 mg/ml en la formulación líquida que va a almacenarse, congelarse/descongelarse y/o lista para usar. Pueden usarse concentraciones de aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 170 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 165 mg/ml, y lo más preferido de aproximadamente 80 mg/ml o aproximadamente 150 mg/ml en la presente invención.

5 La vida útil de la formulación líquida producida tiene un requisito mínimo preferido de 24 meses a de 2 a 8 °C, preferiblemente 36 meses a de 2 a 8 °C, más preferiblemente 48 meses a de 2 a 8 °C, lo más preferiblemente 60 meses a de 2 a 8 °C, o al menos 28 días a temperatura ambiente (25 °C ± 2 °C).

10 La presente invención se refiere a una formulación estable, preferiblemente una formulación líquida estable que, sorprendentemente, permite el almacenamiento a largo plazo de compuestos que neutralizan GM-CSF, que son anticuerpos monoclonales humanos como se definen en el presente documento. Esta formulación es útil, en parte, debido a que es más conveniente de usar para el paciente, ya que los compuestos que neutralizan GM-CSF de esta formulación están altamente concentrados para reducir los efectos secundarios como el dolor debido a un alto volumen de inyección.

15 Por consiguiente, un aspecto de la invención se basa en el descubrimiento de que formulaciones que comprenden

20 - un compuesto que neutraliza GM-CSF, que es un anticuerpo monoclonal humano como se define en el presente documento,

25 - un sistema tampón de histidina con un pH de 5,8,

30 - un modificador de la tonicidad de sorbitol,

35 - un tensioactivo de polisorbato 80, aminoácidos, antioxidantes y/o quelantes,

se vuelven lo suficientemente estables para almacenamiento a largo plazo y/o ciclos de congelación/descongelación y/o tensión de cizallamiento (estabilidad de agitación/sacudida). La formulación de la invención tiene muchas ventajas

40 sobre formulaciones tamponadas estándar. En un aspecto, la formulación muestra un comportamiento de agregación mínimo tras el almacenamiento a largo plazo sin efectos perjudiciales que podrían esperarse con formulaciones con alto contenido de proteínas. Otras ventajas de la formulación según la invención son: fragmentación mínima del compuesto que neutraliza GM-CSF y sin impacto significativo sobre la bioactividad del compuesto que neutraliza GM-CSF durante el almacenamiento a largo plazo, y baja viscosidad de la composición.

45 Dichas realizaciones que no se refieren a la presente invención y están presentes solo con fines ilustrativos son las siguientes: Formulaciones, en las que el compuesto que neutraliza GM-CSF es un polipéptido, un peptidomimético, un ácido nucleico o una molécula pequeña.

50 En una realización preferida, el compuesto que neutraliza GM-CSF (que es según la presente invención un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo como se define en el presente documento) se une o se une específicamente a GM-CSF. Se prevé que el GM-CSF o receptor de GM-CSF sea de un animal, incluidos, pero sin limitarse a, mamíferos tales como animales de laboratorio (roedores tales como ratas, cobayas, hámsteres o ratones, primates no humanos tales como mono *cynomolgus* (macaco cangrejero) o macaco), animales domésticos o mascotas (por ejemplo, perros o gatos), animales de granja o agrícolas (por ejemplo, animales bovinos, ovinos, caprinos y porcinos) y/o seres humanos. Preferiblemente, el GM-CSF o receptor de GM-CSF es GM-CSF humano (*Homo sapiens*) o receptor de GM-CSF humano, respectivamente. GM-CSF de primate no humano o receptor de GM-CSF de primate no humano también pueden estar comprendidos en el presente documento, pero no son parte de la invención. Las variantes (homólogos) de GM-CSF de primate no humano o receptor de GM-CSF de primate no humano de la divulgación y que no forman parte de la presente invención incluyen las de mono gibón (*Nomascus concolor*, también conocido como gibón de cresta negra occidental) y de monos de la familia de los macacos, por ejemplo, mono rhesus (*Macaca mulatta*) y mono *cynomolgus* (*Macaca fascicularis*). Según una realización particularmente preferida de la invención, el compuesto que se une a GM-CSF (específicamente el anticuerpo monoclonal humano o fragmento del mismo como se define en el presente documento que se une a GM-CSF) puede presentar reactividad cruzada entre tanto ser humano como al menos una de las especies de mono mencionadas anteriormente. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento del mismo es capaz de unirse a (y neutralizar) tanto el GM-CSF humano como el GM-CSF del mono *cynomolgus* (*Macaca fascicularis*). Esto es especialmente ventajoso para una molécula de anticuerpo que está destinada a la administración terapéutica en sujetos humanos, dado que tal anticuerpo normalmente tendrá que continuar a través de una multitud de pruebas antes de la aprobación reguladora, de las cuales ciertas pruebas tempranas implican especies animales no humanas. Al realizar tales pruebas, en general, es deseable usar como especie no humana una especie que tenga un alto grado de similitud genética con los seres humanos (por ejemplo, primates no humanos tales como mono *cynomolgus*), dado que los resultados así obtenidos generalmente serán altamente predictivos de los resultados correspondientes que pueden esperarse cuando se administra la misma molécula a seres humanos. Sin embargo, tal poder predictivo basado en pruebas en animales depende al menos parcialmente de la capacidad de comparación de la molécula, y es muy alto cuando, debido a una reactividad entre especies, la misma molécula terapéutica puede administrarse a seres humanos y modelos animales. Como en esta

- realización de la invención, cuando una molécula de anticuerpo es reactiva de manera cruzada para el mismo antígeno en seres humanos y en otras especies estrechamente relacionadas, pueden realizarse pruebas usando la misma molécula de anticuerpo en seres humanos y en esta especie estrechamente relacionada, por ejemplo, en una de las especies de mono mencionadas anteriormente. Esto aumenta tanto la eficiencia de las propias pruebas como el poder predictivo proporcionado por tales pruebas con respecto al comportamiento de tales anticuerpos en seres humanos, la especie final de interés desde un punto de vista terapéutico. El compuesto que neutraliza GM-CSF de la presente invención es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo que se une a GM-CSF. Lo mismo es válido para realizaciones alternativas con compuestos que neutralizan GM-CSF, que no son anticuerpos o no se derivan de anticuerpos, pero que no están comprendidos por la presente invención.
- El compuesto que neutraliza GM-CSF es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo que se une a un epítopo de GM-CSF humano. Este epítopo comprende preferiblemente los aminoácidos 23-27 (RRLLN) y/o los aminoácidos 65-77 (GLR/QGS<sub>n</sub>TKLKG<sub>m</sub>P). La variabilidad en la posición 67 dentro del tramo de secuencia de aminoácidos 65-77 refleja la heterogeneidad en esta porción de GM-CSF entre, por un lado, GM-CSF de ser humano y de gibón (en cuya posición 67 es R) y, por otro lado, monos de la familia de los macacos, por ejemplo, monos *cynomolgus* y *rhesus* (en cuya posición 67 es Q). Si el epítopo comprende dos tramos de secuencia de aminoácidos que no son adyacentes, tales como 23-27 (RRLLN) y 65-77 (GLR/QGS<sub>n</sub>TKLKG<sub>m</sub>P), el epítopo también puede denominarse epítopo "discontinuo". Dicho epítopo de GM-CSF o dicho epítopo discontinuo de GM-CSF puede comprender además los aminoácidos 28-31 (LSRD), los aminoácidos 32-33 (TA) y/o los aminoácidos 21-22 (EA).
- El anticuerpo monoclonal humano o el fragmento funcional del mismo de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 34 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 35. También se da a conocer en el presente documento, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo monoclonal humano o el fragmento funcional del mismo que comprende en su región variable de cadena pesada una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las expuestas en las SEQ ID NO: 1, 3-13 y 56.
- Cualquiera de dichas secuencias de CDR3 de región variable de cadena pesada como se dio a conocer anteriormente, pero que no forma parte de la invención, pueden existir además juntas en una región variable de cadena pesada con la CDR1 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 14 y la CDR2 de región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 15.
- También se da a conocer en el presente documento, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo monoclonal humano o el fragmento funcional del mismo de la presente invención que comprende en su región variable de cadena ligera una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 16, una CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 17 y una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 18, y en su región variable de cadena pesada una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 14, una CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las expuestas en las SEQ ID NO: 1, 3-13 y 56.
- También se da a conocer en el presente documento, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo monoclonal humano o fragmento funcional del mismo que comprende en su región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las expuestas en las SEQ ID NO: 54 y 55. Además, se da a conocer en el presente documento, pero que no forma parte de la invención, un anticuerpo monoclonal humano o fragmento funcional del mismo que comprende en su región variable de cadena pesada una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las expuestas en las SEQ ID NO: 20, 22-33, 52 y 53. También se da a conocer en el presente documento, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo monoclonal humano o el fragmento funcional del mismo que comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 34 y/o una secuencia de aminoácidos de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las expuestas en cualquiera de las SEQ ID NO: 36-48.
- También se da a conocer un anticuerpo monoclonal humano o el fragmento funcional del mismo que puede comprender una o más secuencias de aminoácidos que llevan al menos el 70%, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de homología con la secuencia de aminoácidos respectiva como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-48 y 52-56, preferiblemente a la secuencia de aminoácidos respectiva como se establece en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-18 y 56 y/o a la secuencia de aminoácidos de las regiones marco (FR) dentro de la secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 19-48 y 52-55. Además se da a conocer un anticuerpo monoclonal humano o el fragmento funcional del mismo que puede comprender una o más secuencias de aminoácidos que llevan al menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98% o 99% de homología con la secuencia de aminoácidos respectiva como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-18 y 56.
- Además, se da a conocer, pero no forma parte de la invención, que en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de una CDR expuesta en cualquiera de las SEQ ID NO: 1-18 y 56, pueden sustituirse uno, dos, tres

cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve o 10 aminoácidos. Tal CDR que tiene sustituciones aún puede ser capaz de unirse a GM-CSF como se describe en el presente documento.

Como alternativa o adicionalmente, se da a conocer que el anticuerpo monoclonal humano o el fragmento funcional del mismo puede comprender una o más secuencias de aminoácidos que llevan al menos el 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de homología con la secuencia de aminoácidos respectiva de una región VH, VL, H o L, respectivamente, como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 19-48 y 52-55. Se da a conocer además que la homología es sobre toda la secuencia de aminoácidos de VH, VL, H o L. En esta divulgación, la homología está dentro de las CDR como se describió anteriormente o la homología está dentro de las FR (o no CDR) de tal región VH, VL, H o L como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO: 19-48 y 52-55. Por consiguiente, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 o 25 aminoácidos pueden estar sustituidos en cada una de las FR. Tal variante de sustitución de FR todavía es capaz de unirse a GM-CSF como se describe en el presente documento.

El experto puede identificar fácilmente las FR (o no CDR) dentro de las SEQ ID NO: 19-48 y 52-55, ya que las SEQ ID NO: 1-18 y 56 muestran secuencias de CDR comprendidas en una o más de las secuencias VH, VL, H o L mostradas en las SEQ ID NO: 19-48 y 52-55. Concretamente, el listado de secuencias proporciona en el identificador de secuencia <223> la designación de cada una de las secuencias de aminoácidos. Designaciones idénticas indican que estas secuencias de aminoácidos "van" juntas, lo que significa que una CDR está contenida en una región VH, VL, H o L, por ejemplo, las SEQ ID NO: 16, 17, 18 son secuencias de aminoácidos de CDR que están contenidas en la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 19 (ya que todos ellos se designan "5-306").

A modo de ilustración adicional, si los aminoácidos están sustituidos en una o más o todas las CDR o FR de la cadena pesada y/o ligera, se prefiere que la secuencia "sustituida" obtenida entonces sea al menos el 70 %, más preferiblemente el 80 %, incluso más preferiblemente el 90 %, particularmente preferible el 95 %, más particularmente preferible el 98 % o el 99 % idéntica a la secuencia de CDR o FR "original". Esto significa que depende de la longitud de la CDR o FR en cuyo grado es homóloga a la secuencia "sustituida".

La homología se determina mediante programas de alineación de secuencias convencionales tales como Vector NTI (InforMaxTM, Maryland, EE.UU.) o, más preferiblemente, por el programa BLASTP, preferiblemente versión blastp 2.2.5 (16 de noviembre de 2002; véase Altschul, S. F. et al. (1997) Nucl. Acids Res. 25, 3389-3402). El porcentaje de homología se basa en la alineación de las secuencias polipeptídicas completas (matriz: BLOSUM 62; costes de hueco: 11,1; valor de corte establecido en  $10^{-3}$ ) usando una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de CDR, VH, VL, H o L como referencia en una comparación por parejas. Se calcula como el porcentaje de números de "positivos" (aminoácidos homólogos) indicado como resultado de la salida del programa BLASTP dividido entre el número total de aminoácidos seleccionados por el programa para la alineación.

Cuando se usa en el presente documento, la homología de secuencias de aminoácidos o nucleótidos puede usarse indistintamente con el término "identidad". El término "homología" usado en la presente invención significa el porcentaje de restos idénticos por parejas, después de la alineación de homología de una secuencia de aminoácidos o secuencia de nucleótidos de la presente invención con una secuencia en cuestión, con respecto al número de restos en la más larga de estas dos secuencias. Como se describió anteriormente, programas para determinar la homología (o identidad) comparan secuencias alineadas en una base de aminoácido por aminoácido, y puede establecerse en diversos niveles de rigurosidad para la comparación (por ejemplo, aminoácido idéntico, sustitución conservadora de aminoácidos, etc.). Como se usa el término en el presente documento, dos aminoácidos en cuestión se consideran como "sustituciones conservadoras" entre sí si cada uno pertenece a la misma clase química, es decir, ácido, no polar/hidrófobo, polar no cargado y básico. A modo de ejemplo no limitativo, dos aminoácidos diferentes que pertenecen a la clase de aminoácidos no polares se considerarían "sustituciones conservadoras" entre sí, incluso si estos dos aminoácidos no fueran idénticos, mientras que un aminoácido no polar, por un lado, y un aminoácido básico, por otro lado, no se considerarían "sustituciones conservadoras" entre sí. El panel 3.1 de "Molecular Biology of the Cell", 4<sup>a</sup> edición (2002), por Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts y Walter agrupa los aminoácidos en cuatro grupos principales: ácidos, no polares, polares sin carga y básicos. Tal agrupación puede usarse para los propósitos de determinar, en el contexto de la presente invención, si un aminoácido particular es o no una sustitución conservadora de otro aminoácido en cuestión. Los grupos principales mencionados anteriormente pueden subclasicarse además en, por ejemplo, aminoácidos no polares pequeños y no polares grandes, aminoácidos aromáticos grandes, etc. El término "sustitución conservadora de aminoácidos" también indica cualquier sustitución de aminoácidos para un residuo de aminoácido dado, donde el residuo sustituto es químicamente similar al residuo dado de modo que no hay disminución sustancial en la función del polipéptido (por ejemplo, unión).

El compuesto que neutraliza GM-CSF se formula normalmente como una composición farmacéutica para administración parenteral, por ejemplo intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica a un sujeto, por lo que se prefiere la administración subcutánea. La composición farmacéutica de la invención es una composición líquida, específicamente una composición acuosa.

La concentración del compuesto que neutraliza GM-CSF, que es un anticuerpo monoclonal humano como se define en el presente documento, en la composición farmacéutica líquida es de desde 50 mg/ml hasta 180 mg/ml, más preferiblemente de al menos aproximadamente 60 mg/ml en la formulación líquida que va a almacenarse,

5       congelarse/descongelarse y/o listo para usar. Pueden usarse concentraciones de aproximadamente 70 mg/ml a aproximadamente 170 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 165 mg/ml y lo más preferido de aproximadamente 80 mg/ml o aproximadamente 150 mg/ml en la presente invención. Cuando la composición está destinada a administración subcutánea, pueden usarse concentraciones más altas del compuesto que neutraliza GM-CSF.

10      Como se ha indicado anteriormente, las composiciones de la presente invención comprenden un tampón. Como se usa en el presente documento, el término "tampón" se refiere a una composición añadida que permite que una formulación líquida resista cambios en el pH. En ciertas realizaciones, el tampón añadido permite que una formulación líquida resista cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. Los ejemplos de tampones adecuados incluyen, pero no se limitan a, una histidina tamponada, sistema de acetato o citrato, en la presente invención se usa histidina.

15      El término "se une específicamente" o expresiones relacionadas tales como "unión específica", "que se une específicamente", "agente de unión específico", etc. como se usan en el presente documento, se refieren a la capacidad del compuesto neutralizante de GM-CSF y específicamente el anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo de la presente invención para discriminar entre su diana (por ejemplo, GM-CSF o el receptor de GM-CSF) y cualquier otro posible antígeno diferente de GM-CSF o el receptor GM-CSF hasta tal punto que, de una pluralidad de antígenos diferentes como posibles parejas de unión, solo se une a GM-CSF/el receptor de GM-CSF, o se une significativamente. Dentro del significado de la invención, una diana se une "significativamente" cuando, de entre una pluralidad de antígenos diferentes igualmente accesibles como posibles parejas de unión, la diana se une al menos 10 veces, preferiblemente al menos 50 veces, lo más preferiblemente al menos 100 veces o más frecuentemente (en un sentido cinético) que cualquier otro antígeno diferente de la diana. Tales mediciones cinéticas pueden realizarse, por ejemplo, usando tecnología SPR tal como un instrumento Biacore. Como se usa en el presente documento, los términos "que se une (específicamente) a" o términos relacionados tales como "que reconoce (específicamente)", "dirigido a", "que interacciona (específicamente) con" y "que reacciona (específicamente) con" significan, según esta invención, que un compuesto que neutraliza GM-CSF (por ejemplo un anticuerpo) presenta una afinidad apreciable por su diana (por ejemplo, GM-CSF o el receptor de GM-CSF) y, generalmente, no presenta reactividad significativa con proteínas o antígenos distintos de las dianas mencionadas anteriormente. "Afinidad apreciable" incluye la unión con una afinidad de aproximadamente  $10^{-6}$  M (KD) o más fuerte, tal como  $10^{-7}$  M o más fuerte. Preferiblemente, la unión se considera específica cuando la afinidad de unión es de aproximadamente  $10^{-11}$  a  $10^{-8}$  M, preferiblemente de aproximadamente  $10^{-11}$  a  $10^{-9}$  M, más preferiblemente de aproximadamente  $10^{-11}$  a  $10^{-10}$  M. Si un compuesto (por ejemplo, un anticuerpo) reacciona específicamente con o se une a una diana, puede someterse a prueba fácilmente mediante, entre otros, la comparación de la reacción de dicho compuesto con su proteína o antígeno diana con la reacción de dicho compuesto con proteínas o antígenos distintos de su diana. Preferiblemente, un compuesto según la invención no se une esencialmente o no es capaz de unirse a proteínas o antígenos distintos de GM-CSF o el receptor de GM-CSF. El término "no se une esencialmente" o "no es capaz de unirse" significa que los compuestos de la presente invención no muestran reactividad de más del 30 %, preferiblemente más del 20 %, más preferiblemente más del 10 %, de manera particularmente preferible más del 9 %, 8 %, 7 %, 6 % o 5 % con proteínas o antígenos distintos de GM-CSF o el receptor de GM-CSF.

45      Como se usa en el presente documento, "neutralización", "neutralizador", "que neutraliza" y variantes gramaticalmente relacionadas de las mismas se refieren a una atenuación parcial o completa del/de los efecto(s) biológico(s) de GM-CSF. Tal atenuación parcial o completa del/de los efecto(s) biológico(s) de GM-CSF resulta de la modificación, interrupción y/o anulación de procesos mediados por GM-CSF tales como transducción de señales, tal como se manifiesta, por ejemplo, en la señalización intracelular, proliferación celular o liberación de sustancias solubles, regulación por incremento o disminución de la activación génica intracelular, que da como resultado, por ejemplo, la expresión de receptores de superficie para ligandos distintos de GM-CSF. Como entiende un experto en la técnica, existen múltiples modos de determinar si un compuesto, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, se clasificará como neutralizador. Como ejemplo, esto puede lograrse mediante una prueba *in vitro* estándar realizada generalmente de la siguiente manera: En un primer experimento de proliferación, una línea celular, cuyo grado de proliferación se sabe que depende de la actividad de GM-CSF, se incuba con una serie de muestras con concentraciones variables de GM-CSF, después de lo cual se mide el grado de proliferación de la línea celular. A partir de esta medición, se determina la concentración de GM-CSF que permite la mitad de la proliferación máxima de las células. Luego se realiza un segundo experimento de proliferación empleando en cada una de las series de muestras el mismo número de células que se usaron en el primer experimento de proliferación, la concentración determinada anteriormente de GM-CSF y, esta vez, concentraciones variables del compuesto que se sospecha que es un neutralizador de GM-CSF. La proliferación celular se mide nuevamente para determinar la concentración del compuesto analizado que es suficiente para provocar la mitad de la inhibición del crecimiento máximo. Si el gráfico resultante de la inhibición del crecimiento frente a la concentración del compuesto analizado es de forma sigmoidal, dando como resultado una disminución de la proliferación celular con una concentración creciente del compuesto analizado, entonces se ha efectuado algún grado de inhibición del crecimiento, es decir, la actividad de GM-CSF se ha neutralizado hasta cierto punto. En tal caso, el compuesto en cuestión puede considerarse un "neutralizador" en el sentido de la presente invención. Un ejemplo de una línea celular, cuyo grado de proliferación se sabe que depende de la actividad de GM-CSF, es la línea celular TF-1, como se describe en Kitamura, T. et al. (1989). J Cell Physiol 140, 323-34.

Como entiende un experto en la técnica, el grado de proliferación celular no es el único parámetro mediante el cual puede establecerse la capacidad neutralizante de GM-CSF. Por ejemplo, la medición del nivel de moléculas de señalización (por ejemplo, citocinas), cuyo nivel de secreción depende de GM-CSF, puede usarse para identificar un supuesto neutralizador de GM-CSF/compuesto inhibidor de GM-CSF).

Otros ejemplos de líneas celulares que pueden usarse para determinar si un compuesto en cuestión, tal como un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, es un neutralizador de la actividad de GM-CSF, incluyen AML-193 (Lange, B. *et al.* (1987). Blood 70, 192-9); GF-D8 (Rambaldi, A. *et al.* (1993). Blood 81, 1376-83); GM/SO (Oez, S. *et al.* (1990). Experimental Hematology 18, 1108-11); M07E (Avanzi, G. C. *et al.* (1990). Journal of Cellular Physiology 145, 458-64); TALL-103 (Valtieri, M. *et al.* (1987). Journal of Immunology 138, 4042-50); y UT-7 (Komatsu, N. *et al.* (1991). Cancer Research 51, 341-8).

Se entiende que la neutralización de GM-CSF, en línea con la presente invención, puede efectuarse fuera de las células que llevan receptores de GM-CSF o dentro de dichas células. Por lo tanto, la neutralización de GM-CSF por un compuesto puede ser una inhibición o prevención de la unión de GM-CSF a su receptor específico o una inhibición de la señal intracelular inducida por una unión de las citocinas a sus receptores. Un compuesto que neutraliza GM-CSF, por ejemplo, puede unirse a GM-CSF directamente o al receptor de GM-CSF, interfiriendo así en ambos casos con los efectos biológicos de GM-CSF.

Como ejemplo que no se refiere a la presente invención y solo con fines ilustrativos, los inhibidores de GM-CSF pueden seleccionarse del grupo que consiste en un polipéptido, un peptidomimético, una molécula de ácido nucleico y una molécula pequeña.

El término "polipéptido", como se usa en el presente documento, describe un grupo de moléculas, que habitualmente consisten en al menos 30 aminoácidos acoplados entre sí a través de un enlace peptídico covalente. Según la divulgación que no forma parte de la invención, el grupo de polipéptidos comprende "proteínas" que consisten en un único polipéptido o más de un polipéptido. El término "polipéptido" también describe fragmentos de proteínas siempre que estos fragmentos consistan en al menos 30 aminoácidos. Se conoce bien en la técnica que los polipéptidos pueden formar multímeros tales como dímeros, trímeros y oligómeros superiores, es decir, que consisten en más de una molécula polipeptídica. Tales multímeros también se incluyen en la definición del término "polipéptido". Moléculas polipeptídicas que forman tales dímeros, trímeros, etc. pueden ser idénticas o no idénticas. Las estructuras de orden superior correspondientes de tales multímeros se denominan, por consiguiente, homo o heterodímeros, homo o heterotrimers, etc. Un ejemplo de un heteromultímero es una molécula de anticuerpo que, en su forma natural, consiste en dos cadenas polipeptídicas ligadas idénticas y dos cadenas polipeptídicas pesadas idénticas. Los términos "polipéptido" y "proteína" también se refieren a polipéptidos/proteínas modificados de manera natural o no natural en los que la modificación se efectúa, por ejemplo, mediante modificaciones posttraduccionales como glicosilación, acetilación, fosforilación, formación de puentes disulfuro y similares o mediante modificaciones químicas tales como PEGilación. Tales modificaciones se conocen bien en la técnica.

El término "ácido nucleico" o "polinucleótido" define, en el contexto de la descripción que no forma parte de la invención, macromoléculas poliméricas que consisten en múltiples unidades de repetición de ácido fosfórico, azúcar y bases de purina y pirimidina. Las realizaciones de estas moléculas incluyen ADN, ARN y PNA. El ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario, lineal o circular. Un ácido nucleico en el contexto de la presente divulgación es un aptámero. Los aptámeros de ácido nucleico son moléculas de ADN o ARN que se han seleccionado de grupos aleatorios en función de su capacidad para unirse a otras moléculas. Se han seleccionado aptámeros que se unen a ácido nucleico, proteínas, compuestos orgánicos pequeños e incluso organismos completos. Consisten habitualmente en cadenas cortas de oligonucleótidos, normalmente 50 bases o menos.

El término "molécula pequeña" define un grupo de compuestos farmacológicos orgánicos que tienen un peso molecular de menos de 1000 Dalton, preferiblemente hasta 800 Dalton, y más preferiblemente de 300 a 700 Dalton. El límite superior de peso molecular para una molécula pequeña permite la posibilidad de difundir rápidamente a través de las membranas celulares para que puedan alcanzar sitios de acción intracelulares. Las moléculas pequeñas correspondientes pueden derivarse de una biblioteca de péptidos al menos parcialmente aleatorizada. Las bibliotecas de moléculas pequeñas adecuadas según la presente divulgación que no forma parte de la invención se conocen bien en la técnica y/o pueden adquirirse de distribuidores comerciales.

El término "peptidomimético" describe una pequeña cadena similar a una proteína diseñada para imitar un péptido. Este tipo de molécula se deriva artificialmente modificando un péptido existente para alterar las propiedades de la molécula. Por ejemplo, el péptido original existente se modifica para cambiar la estabilidad o actividad biológica de la molécula. Estas modificaciones comprenden la alteración de la estructura principal y la incorporación de aminoácidos no naturales.

El término "receptor de GM-CSF" se refiere al receptor fisiológico de la superficie celular de GM-CSF, que se describe en la técnica como un heterómero de una subunidad de cadena alfa (CD116) y una subunidad beta común (beta-c).

El polipéptido neutralizante de la presente invención es un anticuerpo humano o fragmentos funcionales del mismo. En la técnica se conocen bien técnicas para la producción de anticuerpos y se describen, por ejemplo, en Harlow y Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988 y Harlow y Lane "Using Antibodies: A Laboratory Manual" Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999.

- 5 La definición del término "anticuerpo" incluye realizaciones tales como anticuerpos monoclonales, químéricos, de cadena sencilla, humanizados y humanos. Además de los anticuerpos de longitud completa, la definición también incluye derivados de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, como, entre otros, fragmentos Fab. Los fragmentos o derivados de anticuerpos comprenden además fragmentos  $F(ab')_2$ , Fv, scFv o anticuerpos de dominio único tales como anticuerpos de dominio o nanocuerpos, anticuerpos de dominio variable único o dominio variable único de inmunoglobulina que comprenden simplemente un dominio variable, que podría ser VHH, VH o VL, que se unen específicamente a un antígeno o epítopo independientemente de otras regiones o dominios V; véase, por ejemplo, Harlow y Lane (1988) y (1999), loc. cit.; Kontermann y Dübel, *Antibody Engineering*, Springer, 2<sup>a</sup> ed. 2010 Little, Recombinant Antibodies for Immunotherapy, Cambridge University Press 2009. Dicho término también incluye diacuerpos o anticuerpos de redireccionamiento de afinidad dual (*Dual-Affinity Re-targeting*, DART). Se prevén además diacuerpos de cadena sencilla (biespecíficos), diacuerpo en tandem (Tandab), "minicuerpos" exemplificados por una estructura que es como sigue: (VH-VL-CH3)<sub>2</sub>, (scFv-CH3)<sub>2</sub> o (scFv-CH3-scFv)<sub>2</sub>, "Fc DART" e "IgG DART", multicuerpos tales como triacuerpos. Los dominios variables únicos de inmunoglobulina abarcan no solo un polipéptido de dominio variable único de anticuerpo aislado, sino también polipéptidos más grandes que comprenden uno o más monómeros de una secuencia polipeptídica de dominio variable único de anticuerpo.
- 10
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65
- Además, el término "anticuerpo", como se emplea en el presente documento, también se refiere a derivados o variantes de los anticuerpos descritos en el presente documento que muestran la misma especificidad que los anticuerpos descritos. Los ejemplos de "variantes de anticuerpos" incluyen variantes humanizadas de anticuerpos no humanos, anticuerpos "madurados por afinidad" (véase, por ejemplo, Hawkins *et al.* *J. Mol. Biol.* 254, 889-896 (1992) y Lowman *et al.*, *Biochemistry* 30, 10832-10837 (1991)) y mutantes de anticuerpos con función/funciones efectora(s) alterada(s) (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense 5.648.260, Kontermann y Dübel (2010), loc. cit. y Little (2009), loc. cit.).
- El término "anticuerpo" también comprende inmunoglobulinas (Ig) de diferentes clases (es decir, IgA, IgG, IgM, IgD e IgE) y subclases (tales como IgG1, IgG2, etc.). Los derivados de anticuerpos que también entran dentro de la definición del término anticuerpo en el significado de la invención incluyen modificaciones de tales moléculas como, por ejemplo, glicosilación, acetilación, fosforilación, formación de enlaces disulfuro, farnesilación, hidroxilación, metilación o esterificación.
- Un fragmento funcional de un anticuerpo incluye el dominio de un fragmento  $F(ab')_2$ , un fragmento Fab, scFv o constructos que comprenden dominios variables de inmunoglobulina únicos o polipéptidos de anticuerpo de dominio único, por ejemplo dominios variables de cadena pesada única o dominios variables de cadena ligera única, así como otros fragmentos de anticuerpo como se describió anteriormente en el presente documento. El  $F(ab')_2$  o Fab puede modificarse por ingeniería genética para minimizar o eliminar completamente las interacciones disulfuro intermoleculares que se producen entre los dominios C<sub>H</sub>1 y C<sub>L</sub>.
- El término anticuerpo "humano" como se usa en el presente documento debe entenderse que significa que el anticuerpo o su fragmento funcional comprende una(s) secuencia(s) de aminoácidos contenida(s) en el repertorio de anticuerpos de la línea germinal humana. Para los fines de definición en el presente documento, un anticuerpo, o su fragmento, por lo tanto, puede considerarse humano si consiste en tal(es) secuencia(s) de aminoácidos de la línea germinal humana, es decir, si la(s) secuencia(s) de aminoácidos del anticuerpo en cuestión o fragmento funcional del mismo es(son) idéntica(s) a (una) secuencia(s) de aminoácidos de la línea germinal humana expresada(s). Un anticuerpo o fragmento funcional del mismo también puede considerarse como humano si consiste en una(s) secuencia(s) que se desvía(n) de su(s) secuencia(s) de línea germinal humana más cercana(s) en no más de lo que se esperaría debido a la impresión de hipermutación somática. Adicionalmente, los anticuerpos de muchos mamíferos no humanos, por ejemplo, roedores tales como ratones y ratas, comprenden secuencias de aminoácidos de CDR3 de VH que puede esperarse que existan también en el repertorio de anticuerpos humanos expresados. Cualquiera de tales secuencias de origen humano o no humano que pueda esperarse que exista en el repertorio humano expresado también se consideraría "humana" para los fines de la presente invención. El término "anticuerpo humano" incluye, por lo tanto, anticuerpos que tienen regiones variables y constantes que corresponden sustancialmente a secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana conocidas en la técnica, incluidas, por ejemplo, las descritas por Kabat *et al.* (véase Kabat *et al.* (1991) loc. cit.). Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDR, y en particular, CDR3. El anticuerpo humano puede tener al menos una, dos, tres, cuatro, cinco o más posiciones reemplazadas con un residuo de aminoácido que no está codificado por la secuencia de inmunoglobulina de la línea germinal humana.
- Los anticuerpos humanos o fragmentos funcionales de los mismos de la presente invención son monoclonales. Es particularmente difícil preparar anticuerpos humanos que sean monoclonales. A diferencia de las fusiones de células

B murinas con líneas celulares inmortalizadas, las fusiones de células B humanas con líneas celulares inmortalizadas no son viables. Por lo tanto, los anticuerpos monoclonales humanos son el resultado de superar obstáculos técnicos significativos que generalmente se reconoce que existen en el campo de la tecnología de anticuerpos. La naturaleza monoclonal de los anticuerpos los hace particularmente adecuados para su uso como agentes terapéuticos, dado que tales anticuerpos existirán como una única especie molecular homogénea que puede caracterizarse bien y prepararse y purificarse de manera reproducible. Estos factores dan como resultado productos cuyas actividades biológicas pueden predecirse con un alto nivel de precisión, muy importante si tales moléculas van a obtener la aprobación regulatoria para la administración terapéutica en seres humanos. El término "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones naturales y/o modificaciones postraduccionales (por ejemplo, isomerizaciones, amidaciones) que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos contra diferentes determinantes (epítopos), 5 cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos porque se sintetizan mediante el cultivo de hibridomas, sin contaminar por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse como que requiere la producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que van a usarse según la presente invención 10 pueden prepararse mediante el método de hibridoma descrito por primera vez por Kohler *et al.*, *Nature*, 256: 495 (1975), o puede prepararse mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos de fagos usando las técnicas descritas en Clackson *et al.*, *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991), por ejemplo. 15

20 Los anticuerpos monoclonales o fragmentos funcionales correspondientes de la invención son anticuerpos humanos o fragmentos funcionales correspondientes. Al contemplar los agentes de anticuerpos destinados a la administración terapéutica a seres humanos, es muy ventajoso que los anticuerpos sean de origen humano. Después de la administración a un paciente humano, un anticuerpo humano o fragmento funcional del mismo probablemente no provocará una fuerte respuesta inmunogénica por el sistema inmunitario del paciente, es decir, no se reconocerá como una proteína extraña que no es humana. Esto significa que no se generarán anticuerpos del huésped, es decir, paciente, contra el anticuerpo terapéutico que de otro modo bloquearían la actividad del anticuerpo terapéutico y/o acelerarían la eliminación del anticuerpo terapéutico del cuerpo del paciente, evitando así que ejerza su efecto terapéutico deseado. 25

30 El anticuerpo monoclonal humano o fragmento funcional del mismo que va a utilizarse con fines farmacéuticos puede presentar reactividad entre tanto un ser humano como al menos una especie de mono. También se prefiere la misma reactividad cruzada de especie para todos los demás compuestos neutralizantes/inhibidores distintos de anticuerpos o no derivados de anticuerpos de GM-CSF de la presente divulgación que no forman parte de la invención. 35

40 El anticuerpo puede ser un anticuerpo IgG. Un isotipo de IgG comprende no solo las regiones de anticuerpos variables de las cadenas pesadas y ligeras responsables del reconocimiento y unión a antígenos altamente discriminantes, sino también las regiones constantes de las cadenas polipeptídicas de anticuerpos pesadas y ligeras normalmente presentes en anticuerpos producidos "de manera natural" y, en algunos casos, incluso modificación en uno o más sitios con hidratos de carbono. Tal glicosilación es generalmente un sello distintivo del formato de IgG, y se ubica en las regiones constantes que comprenden la denominada región Fc de un anticuerpo completo que se sabe que provoca diversas funciones efectoras *in vivo*. Además, la región Fc media en la unión de IgG al receptor de Fc, así como facilita el direccionamiento de la IgG a ubicaciones con una mayor presencia de receptor de Fc (tejido inflamado, por ejemplo). Ventajosamente, el anticuerpo IgG es un anticuerpo IgG1 o un anticuerpo IgG4, formatos que se prefieren ya que su mecanismo de acción *in vivo* se entiende y caracteriza particularmente bien. Este es especialmente el caso de los anticuerpos IgG1. 45

50 El fragmento funcional del anticuerpo puede ser preferiblemente un scFv, un anticuerpo de dominio único, un Fv, un anticuerpo VHH, un diacuerpo, un diacuerpo en tándem, un Fab, un Fab' o un F(ab)2. Estos formatos pueden dividirse generalmente en dos subclases, concretamente aquellos que consisten en una sola cadena polipeptídica, y aquellos que comprenden al menos dos cadenas polipeptídicas. Los miembros de la primera subclase incluyen un scFv (que comprende una región VH y una región VL unidas en una sola cadena polipeptídica a través de un enlazador polipeptídico); un anticuerpo de dominio único (que comprende una región variable de anticuerpo único) tal como un anticuerpo VHH (que comprende una región VH única). Los miembros de la última subclase incluyen un Fv (que comprende una región VH y una región VL como cadenas polipeptídicas separadas que están asociadas no covalentemente entre sí); un diacuerpo (que comprende dos cadenas polipeptídicas asociadas no covalentemente, cada una de las cuales comprende dos regiones variables de anticuerpo (normalmente una VH y una VL por cadena polipeptídica), estando las dos cadenas polipeptídicas dispuestas en una conformación de cabeza a cola de modo que resulta una molécula de anticuerpo bivalente); un diacuerpo en tándem (anticuerpos Fv de cadena sencilla biespecíficos que comprenden cuatro regiones variables de inmunoglobulina unidas covalentemente (VH y VL) de dos especificidades diferentes, formando un homodímero que es dos veces más grande que el diacuerpo descrito 55 60 65

anteriormente); un Fab (que comprende como cadena polipeptídica una cadena ligera de anticuerpo completa, que comprende por sí misma una región VL y toda la región constante de cadena ligera y, como otra cadena polipeptídica, una parte de una cadena pesada de anticuerpo que comprende una región VH completa y parte de la región constante de cadena pesada, estando dichas dos cadenas polipeptídicas conectadas intermolecularmente a través de un enlace disulfuro intercatenario); un Fab' (como un Fab, anteriormente, excepto con enlaces disulfuro reducidos adicionales comprendidos en la cadena pesada del anticuerpo); y un F(ab)2 (que comprende dos moléculas Fab', estando cada molécula Fab' unida a la otra molécula Fab' respectiva a través de enlaces disulfuro intercatenarios). En general, los fragmentos de anticuerpos funcionales del tipo descrito anteriormente en el presente documento permiten una gran flexibilidad en la adaptación, por ejemplo, de las propiedades farmacocinéticas de un anticuerpo deseadas para la administración terapéutica a las exigencias particulares en cuestión. Por ejemplo, puede ser deseable reducir el tamaño del anticuerpo administrado para aumentar el grado de penetración tisular cuando se tratan tejidos que se sabe que están poco vascularizados (por ejemplo, articulaciones). En algunas circunstancias, también puede ser deseable aumentar la velocidad a la que el anticuerpo terapéutico se elimina del cuerpo, siendo dicha velocidad generalmente acelerable disminuyendo el tamaño del anticuerpo administrado. Un fragmento de anticuerpo se define como un fragmento de anticuerpo funcional en el contexto de la invención siempre que el fragmento mantenga las características de unión específicas para el epítopo/diana del anticuerpo original, es decir, siempre que se una específicamente a GM-CSF o al receptor de GM-CSF.

Dicho anticuerpo o fragmento funcional del mismo puede estar presente en formas monoespecífica monovalente; monoespecífica multivalente, en particular monoespecífica bivalente; o multivalente multiespecífica, en particular bivalente biespecífica. En general, un anticuerpo monoespecífico multivalente, en particular, monoespecífico bivalente tal como una IgG humana completa como se describió anteriormente en el presente documento, puede proporcionar la ventaja terapéutica de que la neutralización efectuada por tal anticuerpo se potencia por los efectos de avidez, es decir, unión por el mismo anticuerpo a múltiples moléculas del mismo antígeno, en este caso GM-CSF o el receptor de GM-CSF. Varias formas monovalentes monoespecíficas de fragmentos de anticuerpos se han descrito anteriormente (por ejemplo, un scFv, un Fv, un VH o un anticuerpo de dominio único). Las formas multivalentes multiespecíficas, en particular, bivalentes biespecíficas de un anticuerpo pueden incluir una IgG completa en la que un brazo de unión se une a GM-CSF/receptor de GM-CSF de primate, mientras que el otro brazo de unión de la misma se une a otro antígeno diferente de GM-CSF/receptor de GM-CSF. Un multivalente multiespecífico adicional, en particular, la forma biespecífica bivalente, puede ser ventajosamente un anticuerpo biespecífico de cadena sencilla humana, es decir, un constructo de anticuerpo humano recombinante que comprende dos entidades de scFv como se describió anteriormente, conectadas en una cadena polipeptídica contigua por un espaciador polipeptídico interpuesto corto como se conoce generalmente en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 99/54440 para un anticuerpo de cadena sencilla biespecífico anti-CD19 x anti-CD3). En este caso, una porción de scFv del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico comprendida dentro del anticuerpo de cadena sencilla biespecífico se unirá específicamente a GM-CSF/el receptor de GM-CSF como se ha expuesto anteriormente, mientras que la otra porción scFv respectiva de este anticuerpo de cadena sencilla biespecífico se unirá a otro antígeno que se determina que es beneficioso terapéuticamente.

Los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos pueden derivatizarse, por ejemplo, con un polímero orgánico, por ejemplo, con una o más moléculas de polietilenglicol ("PEG") y/o polivinilpirrolidona ("PVP"). Como se conoce en la técnica, tal derivatización puede ser ventajosa en la modulación de las propiedades farmacodinámicas de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos. Se prefieren especialmente moléculas de PEG derivatizadas como PEG-maleimida, que permiten la conjugación con el anticuerpo o fragmento funcional del mismo de una manera específica de sitio a través del grupo sulfhidrilo de un aminoácido de cisteína. De estos, se prefieren especialmente PEG-maleimida de 20 kD y/o 40 kD, en forma o bien ramificada o bien de cadena lineal. Puede ser especialmente ventajoso aumentar el peso molecular efectivo de fragmentos de anticuerpo anti-GM-CSF humano más pequeños tales como fragmentos scFv acoplando este último a una o más moléculas de PEG, especialmente PEG-maleimida.

Los anticuerpos dados a conocer en el presente documento también incluyen anticuerpos "químéricos" (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadena(s) es(son) idéntica(s) u homóloga(s) a las secuencias correspondientes en anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (patente estadounidense n.º 4.816.567; Morrison *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)). Los anticuerpos químéricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo, mono del Viejo Mundo, simio, etc.) y secuencias de regiones constantes humanas.

Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas químéricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')2 u otras subsecuencias de unión a antígeno de anticuerpos) de secuencias principalmente humanas, que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. En su mayor parte, anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región hipervariable (también CDR) del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donador) tal como ratón,

5 rata o conejo que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región marco Fv (FR) de la inmunoglobulina humana se reemplazan por los residuos no humanos correspondientes. Además, los "anticuerpos humanizados", como se usan en el presente documento, también pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en el anticuerpo donador. Estas modificaciones se realizan para refinar y optimizar adicionalmente el rendimiento del anticuerpo. El anticuerpo humanizado también comprenderá óptimamente al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para detalles adicionales, véanse Jones *et al.*, *Nature*, 321: 522-525 (1986); Reichmann *et al.*, *Nature*, 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992).

10 Como se usa en el presente documento, la numeración de los residuos de aminoácidos o posiciones de GM-CSF de ser humano y primate no humano se refiere a la de GM-CSF maduro, es decir, GM-CSF sin su secuencia señal de 17 aminoácidos (la longitud total de GM-CSF maduro en especies tanto de ser humano como de primates no humanos descritas anteriormente es de 127 aminoácidos). La secuencia de GM-CSF humano y GM-CSF de gibón es la siguiente:

15 SEQ ID NO: 49

APARSPSPST QPWEHVNAIQ **EARRLLNLSR** **DTAAEMNETV** EVISEMFDLQ  
 EPTCLQTRLE LYKQ**GLRGSL** **TKLGPLTMM** ASHYKQHCPP TPETSCATQI  
 ITFESFKENL KDFLLVIPFD CWEPVQE

20 La secuencia de GM-CSF en ciertos miembros de la familia del mono macaco tal como, por ejemplo, el mono rhesus y el mono *cynomolgus* es la siguiente:

SEQ ID NO: 50

APARSPSPGT QPWEHVNAIQ **EARRLLNLSR** **DTAAEMNKTV** EVVSEMFDLQ  
 EPSCLQTRLE LYKQ**GLQGSL** **TKLGPLTMM** ASHYKQHCPP TPETSCATQI  
 ITFQSFKENL KDFLLVIPFD CWEPVQE

25 La secuencia de GM-CSF humano también se muestra en la SEQ ID NO: 57. La de GM-CSF de gibón también se muestra en la SEQ ID NO: 58:

APARSPSPST QPWEHVNAIQ **EARRLLNLSR** **DTAAEMNETV** EVISEMFDLQ  
 EPTCLQTRLE LYKQ**GLRGSL** **TKLGPLTMM** ASHYKQHCPP TPETSCATQI  
 ITFESFKENL KDFLLVIPFD CWEPVQE

30 (SEQ ID NO: 57 y 58)

35 La secuencia de GM-CSF en ciertos miembros de la familia del mono macaco tal como, por ejemplo, el mono rhesus (SEQ ID NO: 59) y mono *cynomolgus* (SEQ ID NO: 60) también es como sigue:

APARSPSPGT QPWEHVNAIQ **EARRLLNLSR** **DTAAEMNKTV** EVVSEMFDLQ  
 EPSCLQTRLE LYKQ**GLQGSL** **TKLGPLTMM** ASHYKQHCPP TPETSCATQI  
 ITFQSFKENL KDFLLVIPFD CWEPVQE

40 (SEQ ID NO: 59 y 60)

45 El epítopo mínimo, ventajosamente un epítopo discontinuo como se describe en el presente documento, al que se une el anticuerpo, preferiblemente un anticuerpo monoclonal humano (o fragmento funcional del mismo) se indica en la(s) secuencia(s) de GM-CSF que se muestra(n) anteriormente en negrita.

45 El compuesto que neutraliza GM-CSF es un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo que se une a GM-CSF. Se une a un epítopo de GM-CSF que comprende preferiblemente los aminoácidos 23-27 (RRLLN) y/o los aminoácidos 65-77 (GLR/QGS<sub>1</sub>TKLG<sub>2</sub>P<sub>3</sub>L<sub>4</sub>T<sub>5</sub>M<sub>6</sub>M<sub>7</sub>). Estos tramos de secuencia de aminoácidos se indican en la secuencia de GM-CSF anterior en negrita. El término "epítopo" se refiere a un sitio en un antígeno o una diana (por ejemplo, GM-CSF) en el que un compuesto, tal como un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, se une

específicamente. También se entiende que dicha unión/interacción define un "reconocimiento específico". Los "epítopos" pueden estar formados tanto por aminoácidos contiguos como por aminoácidos no contiguos yuxtapuestos por el plegamiento terciario de una proteína. Un "epítopo lineal" es un epítopo donde una secuencia primaria de aminoácidos comprende el epítopo reconocido. Un epítopo lineal normalmente incluye al menos 3 o al menos 4, y más habitualmente, al menos 5 o al menos 6 o al menos 7, por ejemplo, de aproximadamente 8 a aproximadamente 10 aminoácidos o más en una secuencia única. En el contexto de la presente invención, se prefiere que el epítopo de GM-CSF sea un epítopo discontinuo. En caso de que el anticuerpo se una a ambos tramos de secuencia 23-27 y 65-77, el epítopo puede denominarse "discontinuo". En la estructura secundaria de GM-CSF humano, los aminoácidos 15-35 están situados en la hélice A mientras que los residuos correspondientes a las posiciones 65-77 son parte de una estructura de bucle ubicada entre las hélices C y D. Un modelo tridimensional de plegamiento de la molécula revela proximidad estérica cercana de estos sitios entre sí (véase también el documento WO 2006/111353). Como se usa en el presente documento, el término "epítopo discontinuo" debe entenderse como al menos dos tramos de secuencia de aminoácidos no adyacentes dentro de una cadena polipeptídica dada, en este caso GM-CSF de ser humano y primate no humano maduro, que están unidos simultáneamente y específicamente por un anticuerpo. Según esta definición, tal unión específica simultánea puede ser del polipéptido GM-CSF en forma lineal. En este caso, puede imaginarse el polipéptido de GM-CSF maduro formando un bucle extendido, en una región de la que se alinean las dos secuencias indicadas en negrita anteriormente, por ejemplo, más o menos en paralelo y en proximidad entre sí. En este estado, están unidos específica y simultáneamente por el fragmento de anticuerpo. Según esta definición, la unión específica simultánea de los dos tramos de secuencia de GM-CSF maduro indicados anteriormente también 20 puede adoptar la forma de unión de anticuerpos a un epítopo conformacional. En este caso, GM-CSF maduro ya ha formado su conformación terciaria tal como normalmente existe *in vivo*. En esta conformación terciaria, la cadena polipeptídica de GM-CSF maduro se pliega de tal manera que los dos tramos de secuencia indicados anteriormente se acercan espacialmente, por ejemplo, en la superficie externa de una región particular de GM-CSF maduro y plegado, donde luego se reconocen en virtud de su conformación tridimensional en el contexto de las secuencias polipeptídicas circundantes.

En una realización preferida adicional, el epítopo anterior o el epítopo discontinuo anterior de GM-CSF comprende además:

- 30 • los aminoácidos 28-31 (LSRD), en cursiva en las secuencias anteriores de GM-CSF humano y de primate no humano;
- 35 • los aminoácidos 32-33 (TA), subrayados en las secuencias anteriores de GM-CSF humano y de primate no humano; y/o
- los aminoácidos 21-22 (EA), subrayados en las secuencias anteriores de GM-CSF humano y de primate no humano.

40 La presente invención se refiere a un anticuerpo anti-GM-CSF o un fragmento funcional del mismo como se define en el presente documento que comprende una secuencia de CDR1 de región variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 16, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 17 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 18 y que comprende además una secuencia de CDR1 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 2. También se da a conocer en el presente documento, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo anti-GM-CSF o un fragmento funcional del mismo que comprende una secuencia de CDR1 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 1; o que comprende una secuencia de CDR1 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 3; o que comprende una secuencia de CDR1 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 4; o que comprende una secuencia de CDR1 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 5; o que comprende una secuencia de CDR1 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 6; o que comprende una secuencia de CDR1 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 7; o que comprende una secuencia de CDR1 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 8.

variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 8; o que comprende una secuencia de CDR1 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 9; o que comprende una secuencia de CDR1 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 10; o que comprende una secuencia de CDR1 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 11; o que comprende una secuencia de CDR1 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 12; o que comprende una secuencia de CDR1 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 13; o que comprende una secuencia de CDR1 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 14, una secuencia de CDR2 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 15 y una secuencia de CDR3 de región variable de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 56.

20 Además, se da a conocer, pero no forma parte de la invención, cualquiera de las 13 combinaciones anteriores de secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada existentes en un anticuerpo o fragmento funcional del mismo como se da a conocer adicionalmente con fines ilustrativos solo que comprenden adicionalmente en su región variable de cadena ligera una CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 16, una CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 17 y una CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 18.  
25

El anticuerpo anti-GM-CSF de la invención también se describe en el documento WO 2006/111353.

30 Tal anticuerpo anti-GM-CSF o fragmento funcional del mismo como se define por la invención comprende en su región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 19 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 21. También se da a conocer con fines ilustrativos solamente, pero no formando parte de la invención, un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 19 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 20; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 19 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 22; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 19 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 23; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 19 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 24; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 19 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 25; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 19 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 26; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 19 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 27; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 19 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 28; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 19 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 30; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 31; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 19 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 32; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 19 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 33; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo,

comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 19 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 52; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 19 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 53.

También se da a conocer con fines ilustrativos solamente, pero no forma parte de la invención, el anticuerpo anti-GM-CSF o fragmento funcional del mismo que comprende en su región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 55. Además, se da a conocer, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 55 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 20; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 55 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 21; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 55 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 22; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región variable de cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 55 y una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 23; o un anticuerpo o fragmento funcional del mismo, comprendiendo la región

También se da a conocer con fines ilustrativos solo un anticuerpo anti-GM-CSF o fragmento funcional del mismo que comprende en su región variable de cadena ligera una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 16, una CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 17 y una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 18 y que comprende en su región variable de cadena pesada una CDR1 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 14, una CDR2 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO. 15 y una CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos como se expone en cualquiera de las SEQ ID NO. 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 o 56.

Además, se da a conocer, pero no forma parte de la invención, un anticuerpo que comprende en su cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34 y en su cadena pesada una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 36; o en su cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34 y en su cadena pesada una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 37; o en su cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34 y en su cadena pesada una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 38; o en su cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34 y en su cadena pesada una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 39; o en su cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34 y en su cadena pesada una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 40; o en su cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34 y en su cadena pesada una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 41; o en su cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34 y en su cadena pesada una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 42; o en su cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34 y en su cadena pesada una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 43; o en su cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34 y en su cadena pesada una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 44; o en su cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34 y en su cadena pesada una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 45; o en su cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34 y en su cadena pesada una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 46; o en su cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34 y en su cadena pesada una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 47; o en su cadena ligera una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 34 y en su cadena pesada una secuencia de aminoácidos como se expone en la SEQ ID NO: 48.

65 Las moléculas de anticuerpo monoclonal humano y/o fragmentos funcionales de las mismas de la presente invención son especialmente ventajosas como neutralizadores de la actividad de GM-CSF humano. Los anticuerpos o

fragmentos funcionales de los mismos según estas realizaciones especialmente preferidas son altamente ventajosos por varias razones.

En primer lugar, reconocen GM-CSF humano con alta especificidad. Es decir, de una mezcla de GM-CSF humano con otros factores estimulantes de colonias humanos, las moléculas de unión según estas realizaciones son altamente discriminantes para GM-CSF humano, mientras que los otros factores estimulantes de colonias en el mismo medio no se reconocen. Esto significa que un anticuerpo o fragmento funcional del mismo según estas realizaciones, cuando se administra a un ser humano, se espera que se una específicamente y neutralice solo la diana deseada, mientras que otras dianas no deseadas no se unen ni se neutralizan. En última instancia, esto conduce a un alto grado de predictibilidad con respecto al modo de acción terapéutica *in vivo*.

En segundo lugar, los agentes de unión según estas realizaciones especialmente preferidas de la invención se unen a GM-CSF humano con afinidad apreciable. "Afinidad apreciable" incluye la unión con una afinidad de aproximadamente  $10^{-6}$  M (KD) o más fuerte. Preferiblemente, la unión se considera apreciable (o alta o específica) cuando la afinidad de unión es de aproximadamente  $10^{-12}$  a  $10^{-8}$  M,  $10^{-12}$  a  $10^{-9}$  M,  $10^{-12}$  a  $10^{-10}$  M,  $10^{-11}$  a  $10^{-8}$  M, preferiblemente de aproximadamente  $10^{-11}$  a  $10^{-9}$  M. Por consiguiente, un agente de unión de la invención tiene preferiblemente una  $K_D$  dentro de ese intervalo. Dado el hecho de que se han observado valores de  $K_D$  de desde aproximadamente  $4 \times 10^{-9}$  M hasta tan solo aproximadamente  $0,04 \times 10^{-9}$  M, correspondiendo este último a aproximadamente 40 pM, para las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento, se prefiere que las moléculas de anticuerpo de la invención tengan una  $K_D$  dentro de ese intervalo. Sin embargo, también se prefiere que las moléculas de anticuerpo de la invención tengan una  $K_D$  como se describió anteriormente en el presente documento. Dado que la velocidad de asociación cinética de tales moléculas en medios acuosos está controlada en gran medida por difusión y, por lo tanto, no puede mejorarse más allá de lo que permitirán las condiciones de difusión local en condiciones fisiológicas, la  $K_D$  bajo surge principalmente como resultado de la velocidad de disociación cinética,  $k_{off}$ , que para el agente de unión de anticuerpo de mayor afinidad es de aproximadamente  $10^{-5}$  s<sup>-1</sup>. Esto significa que, una vez que se forma el complejo entre un anticuerpo monoclonal humano o fragmento funcional del mismo según cualquiera de estas realizaciones, por un lado, y GM-CSF, por otro lado, no se separa fácilmente, o al menos no rápidamente. Para moléculas de unión destinadas a neutralizar la actividad biológica, estas características son muy ventajosas ya que el efecto neutralizante deseable normalmente dura solo siempre que la molécula, cuya actividad biológica va a neutralizarse (en este caso GM-CSF humano), permanezca unida por la molécula de unión neutralizante. Por lo tanto, una molécula neutralizante que permanece unida a su diana prevista durante mucho tiempo continuará neutralizándola durante un tiempo correspondientemente largo.

La alta afinidad de unión de los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos de la invención a GM-CSF humano tiene una ventaja adicional. Normalmente, los anticuerpos o fragmentos funcionales de los mismos se eliminarán del torrente sanguíneo de un paciente de una manera dependiente del tamaño, excretándose y eliminándose moléculas más pequeñas antes que las más grandes. Dado que el complejo de los dos polipéptidos (anticuerpo o fragmento de anticuerpo y GM-CSF unido) es obviamente más grande que el anticuerpo solo, el bajo  $k_{off}$  mencionado anteriormente tiene el efecto de que el neutralizador terapéutico se excreta y elimina del cuerpo del paciente más lentamente de lo que sería el caso, si no se uniera a GM-CSF. Por lo tanto, no solo aumenta la magnitud de la actividad neutralizante, sino también su duración *in vivo*.

La actividad neutralizante determinada para los agentes de unión según las realizaciones anteriores es sorprendentemente alta. Como se describirá con más detalle a continuación en el presente documento, la actividad neutralizante de GM-CSF se midió *in vitro* usando un ensayo de inhibición del crecimiento de TF-1 (Kitamura, T. et al. (1989). J. Cell Physiol. 140, 323-34). Como una indicación del potencial neutralizante, se midieron los valores de  $Cl_{50}$ , representando  $Cl_{50}$  la concentración del anticuerpo o fragmento funcional del mismo según cualquiera de estas realizaciones que se requiere para provocar la mitad de la inhibición máxima de la proliferación de células TF-1. Para los anticuerpos monoclonales humanos anti-GM-CSF o fragmentos funcionales de los mismos especificados anteriormente, se determinó un valor de  $Cl_{50}$  de aproximadamente  $3 \times 10^{-10}$  M, o aproximadamente 0,3 nM. Las moléculas de unión de la invención son, por lo tanto, neutralizadores altamente potentes de la actividad de GM-CSF humano.

Otros ejemplos de anticuerpos neutralizantes anti-GM-CSF son el anticuerpo humano E10 y el anticuerpo humano G9 descritos en Li et al., (2006) PNAS 103(10):3557-3562. E10 y G9 son anticuerpos de clase IgG. E10 tiene una afinidad de unión de 870 pM por GM-CSF y G9 tiene una afinidad de 14 pM por GM-CSF. Ambos anticuerpos son específicos para la unión a GM-CSF humano y muestran una fuerte actividad neutralizante tal como se evalúa con un ensayo de proliferación celular de TF-1. Otros ejemplos son los anticuerpos humanos anti-GM-CSF dados a conocer en el documento WO 2006/122797.

También se dan a conocer, pero no forman parte de la invención, antagonistas de GM-CSF que incluyen anticuerpos contra la cadena alfa o cadena beta del receptor de GM-CSF. Un anticuerpo anti-receptor de GM-CSF dado a conocer en el presente documento puede estar en cualquier forma de anticuerpo como se explicó anteriormente, por ejemplo, intacto, químérico, monoclonal, polyclonal, fragmento o derivado de anticuerpo, de cadena sencilla, humanizado, Humaneered, y similares. En la técnica se conocen ejemplos de anticuerpos anti-receptor de GM-CSF, por ejemplo,

anticuerpos neutralizantes de alta afinidad técnica (véanse, por ejemplo, la patente estadounidense 5.747.032 y Nicola *et al.*, Blood 82:15 1724, 1993).

5 Se proporcionan ejemplos de anticuerpos anti-GM-CSF conocidos en los documentos WO2006/122797, WO2007/049472, WO2007/092939, WO2009/134805, WO2009/064399, WO2009/038760. Se proporcionan anticuerpos contra el receptor de GM-CSF en el documento WO2007/110631.

10 En resumen, los anticuerpos anti-GM-CSF o fragmentos funcionales de los mismos presentan un alto grado de discriminación para el antígeno deseado, se unen a este antígeno de manera extremadamente fuerte y durante mucho tiempo y presentan una actividad neutralizante altamente potente durante el largo tiempo que permanecen unidos. Al mismo tiempo, la larga persistencia del complejo agente de unión-antígeno ralentiza la eliminación de este agente de unión del cuerpo, alargando así la duración del efecto terapéutico deseado *in vivo*. Las mismas características también se aplican preferiblemente para anticuerpos que reconocen el receptor de GM-CSF, como se describió anteriormente.

15 15 La composición de la presente invención es preferiblemente una composición farmacéutica. Según las presentes realizaciones, el término "composición farmacéutica" se refiere a una composición para administración a un paciente, preferiblemente un paciente humano. Las composiciones o formulaciones farmacéuticas habitualmente están en una forma tal que permite que la actividad biológica del principio activo sea eficaz y, por lo tanto, puede administrarse a un sujeto para uso terapéutico como se describe en el presente documento. Habitualmente, una composición farmacéutica comprende formulaciones adecuadas (es decir, farmacéuticamente aceptables) de portadores, estabilizadores y/o excipientes. En una realización preferida, la composición farmacéutica es una composición para administración parenteral, transdérmica, intraluminal, intraarterial, intratecal y/o intranasal o para inyección directa en el tejido. Se prevé en particular que dicha composición se administre a un paciente mediante infusión o inyección. La administración de las composiciones adecuadas puede efectuarse de diferentes maneras, por ejemplo, mediante administración intravenosa, intraperitoneal, subcutánea, intramuscular, tópica o intradérmica. La composición de la presente invención puede comprender además un portador farmacéuticamente aceptable. En la técnica se conocen bien ejemplos de portadores farmacéuticos adecuados e incluyen soluciones salinas tamponadas, agua, emulsiones, tales como emulsiones de aceite/agua, diversos tipos de agentes humectantes, disoluciones estériles, liposomas, etc. Las composiciones que comprenden tales portadores pueden formularse mediante métodos convencionales bien conocidos.

30 35 Según las presentes realizaciones, el término "cantidad eficaz" se refiere a una cantidad del compuesto que neutraliza GM-CSF que es eficaz para el tratamiento de enfermedades asociadas con GM-CSF, como trastornos inflamatorios y autoinmunitarios.

40 45 Las dosificaciones preferidas y los métodos de administración preferidos son tales que, después de la administración, el compuesto que neutraliza GM-CSF está presente en la sangre en dosificaciones eficaces. El programa de administración puede ajustarse observando las condiciones de la enfermedad y analizando los niveles séricos del compuesto que neutraliza GM-CSF en pruebas de laboratorio seguido de la prolongación del intervalo de administración, por ejemplo, de dos veces a la semana o una vez a la semana a una vez cada dos semanas, una vez cada tres semanas, una vez cada cuatro semanas, y similares, o, alternativamente, reducción del intervalo de administración correspondientemente.

50 55 Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse al sujeto a una dosis adecuada. El régimen de dosificación estará determinado por el médico tratante y por factores clínicos. Como se conocen bien en las técnicas médicas, las dosificaciones para cualquier paciente dependen de muchos factores, incluidos el tamaño del paciente, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto particular que va a administrarse, el sexo, el momento y la vía de administración, la salud general y otros fármacos que se administran simultáneamente.

60 65 Las preparaciones para administración parenteral incluyen disoluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluida solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, Ringer con lactato o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de fluidos y nutrientes, reabastecedores de electrolitos (tales como los basados en dextrosa de Ringer), y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares. Además, la composición farmacéutica según la presente invención podría comprender portadores proteínicos, como, por ejemplo, albúmina sérica o inmunoglobulina, preferiblemente de origen humano. Se prevé que la composición farmacéutica según la invención pueda comprender, además de los compuestos descritos anteriormente, agentes biológicamente activos adicionales, dependiendo del uso previsto de la composición farmacéutica. Tales agentes podrían ser fármacos que actúan sobre el sistema gastrointestinal, fármacos que actúan como citostáticos, fármacos que previenen la hiperuricemia, fármacos que inhiben inmunorreacciones (por ejemplo, corticosteroides), fármacos que modulan la respuesta inflamatoria, fármacos que actúan sobre el sistema circulatorio y/o agentes tales como citocinas conocidas en la técnica.

- Para analizar el efecto de un compuesto neutralizante de GM-CSF, por ejemplo, en artritis reumatoide (AR), pueden seleccionarse medidas de resultados, por ejemplo, de farmacocinética, inmunogenicidad y el potencial para mejorar los signos y síntomas clínicos de la AR medidos por criterios de respuesta DAS28, ACR20/50/70 y/o EULAR, obtención de imágenes por MRI para sinovitis y edema óseo, así como los resultados notificados por el paciente. La ACR es una medida que resume la mejora en el número de articulaciones sensibles e hinchadas, escala de dolor, evaluación de la mejora por parte de los pacientes y médicos y ciertos marcadores de laboratorio. ACR 20 describe el porcentaje de participantes del estudio que lograron una mejora del 20 por ciento en los signos y síntomas clínicos, por ejemplo 20 por ciento de mejora en los recuentos de articulaciones sensibles o hinchadas, así como 20 por ciento de mejora en otros tres criterios relevantes para la enfermedad.
- Otro desafío importante en el desarrollo de fármacos tales como la composición farmacéutica según la invención es la modulación predecible de las propiedades farmacocinéticas. Para este fin, se establece un perfil farmacocinético del candidato a fármaco, es decir, un perfil de los parámetros farmacocinéticos que afectan a la capacidad de un fármaco particular para tratar una afección dada. Los parámetros farmacocinéticos del fármaco que influyen en la capacidad de un fármaco para tratar una determinada entidad patológica incluyen, pero no se limitan a: semivida, volumen de distribución, metabolismo de primer paso hepático y el grado de unión al suero sanguíneo. La eficacia de un agente farmacológico dado puede verse influenciada por cada uno de los parámetros mencionados anteriormente. "Semivida" significa el tiempo en el que el 50 % de un fármaco administrado se elimina a través de procesos biológicos, por ejemplo metabolismo, excreción, etc. Por "metabolismo de primer paso hepático" se entiende la propensión de un fármaco a metabolizarse tras el primer contacto con el hígado, es decir durante su primer paso a través del hígado. "Volumen de distribución" significa el grado de retención de un fármaco en los diversos compartimentos del cuerpo, como por ejemplo espacios intracelulares y extracelulares, tejidos y órganos, etc. y la distribución del fármaco dentro de estos compartimentos. "Grado de unión al suero sanguíneo" significa la propensión de un fármaco a interactuar con y unirse a las proteínas del suero sanguíneo, tales como albúmina, lo que conduce a una reducción o pérdida de la actividad biológica del fármaco.
- Los parámetros farmacocinéticos también incluyen biodisponibilidad, tiempo de retardo (Tretardo), Tmáx., velocidades de absorción y/o Cmáx. para una cantidad dada de fármaco administrado. "Biodisponibilidad" significa la cantidad de un fármaco en el compartimento sanguíneo. "Tiempo de retardo" significa el retraso de tiempo entre la administración del fármaco y su detección y mensurabilidad en sangre o plasma. "Tmáx." es el tiempo después del cual se alcanza la concentración máxima en sangre del fármaco, la absorción se define como el movimiento de un fármaco desde el sitio de administración hacia la circulación sistémica, y "Cmáx." es la concentración en sangre obtenida al máximo con un fármaco dado. El tiempo hasta alcanzar una concentración en sangre o tejido del fármaco que se requiere para su efecto biológico está influenciado por todos los parámetros.
- El término "toxicidad", como se usa en el presente documento, se refiere a los efectos tóxicos de un fármaco manifestados en acontecimientos adversos o acontecimientos adversos graves. Estos eventos secundarios pueden referirse a una falta de tolerabilidad del fármaco en general y/o una falta de tolerancia local después de la administración. La toxicidad también podría incluir efectos teratogénicos o carcinogénicos provocados por el fármaco.
- Los términos "seguridad", "seguridad *in vivo*" o "tolerabilidad", como se usan en el presente documento, definen la administración de un fármaco sin inducir eventos adversos graves directamente después de la administración (tolerancia local) y durante un período más largo de aplicación del fármaco. La "seguridad", "seguridad *in vivo*" o "tolerabilidad" puede evaluarse, por ejemplo, a intervalos regulares durante el tratamiento y el período de seguimiento. Las mediciones incluyen evaluación clínica, por ejemplo manifestaciones en órganos, y el examen de anomalías de laboratorio. La evaluación clínica puede llevarse a cabo y desviarse de los hallazgos normales registrados/codificados según los estándares NCI-CTC y/o MedDRA. Las manifestaciones en órganos pueden incluir criterios tales como alergia/inmunología, sangre/médula ósea, arritmia cardíaca, coagulación y similares, como se establece por ejemplo en los Criterios de terminología común para eventos adversos v3.0 (CTCAE). Los parámetros de laboratorio que pueden someterse a prueba incluyen, por ejemplo, hematología, química clínica, perfil de coagulación y análisis de orina y examen de otros fluidos corporales tales como suero, plasma, líquido linfoide o cefalorraquídeo, licor y similares. Por lo tanto, puede evaluarse la seguridad, por ejemplo, mediante examen físico, técnicas de obtención de imágenes (es decir, ultrasonidos, rayos X, escáneres CT, obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI), otras medidas con dispositivos técnicos (es decir, electrocardiograma), signos vitales, midiendo parámetros de laboratorio y registrando acontecimientos adversos. El término "dosis eficaz y no tóxica", como se usa en el presente documento, se refiere a una dosis tolerable del compuesto que neutraliza GM-CSF, preferiblemente el anticuerpo como se define en el presente documento, que es lo suficientemente alta como para curar o estabilizar la enfermedad de interés sin o esencialmente sin efectos tóxicos importantes. Tales dosis eficaces y no tóxicas pueden determinarse, por ejemplo, por estudios de aumento de la dosis descritos en la técnica y deben estar por debajo de la dosis que induce eventos secundarios adversos graves (toxicidad limitante de la dosis, DLT).
- La formulación de la invención (algunas veces también denominada en el presente documento "composición de materia"; "composición", o "disolución") es una formulación líquida.
- "Formulación líquida", como se usa en el presente documento, se refiere a una composición de materia que se encuentra como un líquido, caracterizado por el movimiento libre de las moléculas constituyentes entre sí, pero sin la

tendencia a separarse a temperatura ambiente. Las formulaciones líquidas de la invención son formulaciones acuosas. Una formulación acuosa es una formulación en la que el disolvente o disolvente principal es agua, preferiblemente agua para inyección (WFI). La disolución del compuesto que neutraliza GM-CSF en la formulación puede ser homogénea o heterogénea, prefiriéndose homogénea como se describió anteriormente.

5 También se dan a conocer líquidos no acuosos que podrían emplearse siempre que proporcionen estabilidad a la formulación. El líquido no acuoso podría ser un líquido hidrófilo. Los ejemplos ilustrativos de líquidos no acuosos adecuados incluyen: glicerol; dimetilsulfóxido (DMSO); polidimetsiloxano (PMS); etilenglicoles, tales como etilenglicol, dietilenglicol, trietilenglicol, polietilenglicol ("PEG") 200, PEG 300 y PEG 400; y propilenglicoles, tales como dipropilenglicol, tripropilenglicol, polipropilenglicol ("PPG") 425 y PPG 725.

10 "Formulación líquida acuosa/no acuosa mixta" como se usa en el presente documento se refiere a una formulación líquida que contiene una mezcla de agua, preferiblemente WFI y una composición líquida adicional.

15 Cuando se usa en el presente documento, una "formulación" o "composición" es una mezcla de un compuesto que neutraliza GM-CSF (es decir, el fármaco/sustancia activo) y sustancias químicas y/o aditivos adicionales necesarios para un medicamento que está en estado líquido. Una formulación de la invención incluye una formulación farmacéutica.

20 La preparación de la formulación incluye el proceso en el que diferentes sustancias químicas, incluido el fármaco activo, se combinan para producir un medicamento final tal como una composición farmacéutica. El fármaco activo de la formulación de la invención es un compuesto que neutraliza GM-CSF, que es un anticuerpo monoclonal humano como se define en el presente documento.

25 En ciertas realizaciones, el compuesto que neutraliza GM-CSF que va a formularse es esencialmente puro y/o esencialmente homogéneo (es decir, sustancialmente libre de sustancias contaminantes, por ejemplo proteínas, etc. que pueden ser impurezas relacionadas con el producto y/o relacionadas con el proceso). El término "esencialmente puro" significa una composición que comprende al menos aproximadamente el 80 %, de manera preferible aproximadamente el 90 % en peso del compuesto, preferiblemente al menos aproximadamente el 95 % en peso del compuesto, más preferiblemente al menos aproximadamente el 97 % en peso del compuesto o lo más preferiblemente al menos aproximadamente el 98 % en peso del compuesto, preferiblemente del compuesto en un estado monomérico. El término "esencialmente homogéneo" significa una composición que comprende al menos aproximadamente el 99 % en peso del compuesto, preferiblemente del compuesto en un estado monomérico, excluyendo la masa de diversos estabilizantes y agua en disolución.

35 Cuando se usa en el presente documento, se entiende que el término "aproximadamente" significa que puede haber variación en el valor o intervalo respectivo (tal como pH, concentración, porcentaje, molaridad, número de aminoácidos, tiempo, etc.) que puede ser de hasta el 5 %, hasta el 10 %, hasta el 15 % o hasta e incluyendo el 20 % del valor dado. Por ejemplo, si una formulación comprende aproximadamente 5 mg/ml de un compuesto, se entiende que esto significa que una formulación puede tener entre 4 y 6 mg/ml, preferiblemente entre 4,25 y 5,75 mg/ml, más preferiblemente entre 4,5 y 5,5 mg/ml e incluso más preferiblemente entre 4,75 y 5,25 mg/ml, siendo lo más preferido 5 mg/ml. Como se usa en el presente documento, un intervalo que se define como "(de) X a Y" equivale a un intervalo que se define como "entre X e Y". Ambos intervalos incluyen específicamente el límite superior y también el límite inferior. Esto significa que, por ejemplo, un intervalo de "5 mg/ml a 10 mg/ml" o "entre 5 mg/ml y 10 mg/ml" incluye una concentración de 5, 6, 7, 8, 9 y 10 mg/ml, así como cualquier valor intermedio dado.

40 Una formulación "estable" es una en la que el compuesto que neutraliza GM-CSF en la misma retiene esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras el almacenamiento y/o no muestra signos sustanciales de agregación, precipitación, fragmentación, degradación y/o desnaturización en comparación con una muestra de control, preferiblemente tras el examen visual del color y/o la claridad, o tal como se mide por dispersión de luz UV o por cromatografía de exclusión por tamaño. En la técnica están disponibles diversas técnicas analíticas adicionales para medir la estabilidad de proteínas y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993), por ejemplo.

45 55 "Durante el almacenamiento", como se usa en el presente documento, significa una formulación que, una vez preparada, no se usa inmediatamente; más bien, después de su preparación, se envasa para su almacenamiento, ya sea en forma líquida, en un estado congelado o en una forma seca para su posterior reconstitución en una forma líquida u otra forma.

60 65 Se prevé que el compuesto que neutraliza GM-CSF sea preferentemente estable en la medida en que no forme sustancialmente agregados o partículas o fragmentos o productos de degradación subvisibles/visibles (por ejemplo, debido a una o más de las causas mencionadas anteriormente) durante el almacenamiento y/o durante o después de la congelación/descongelación y/o durante o después de la tensión de cizallamiento (por ejemplo, de las etapas de agitación o de filtración). Por consiguiente, se prevé preferiblemente que no más del 10 % de un compuesto neutralizante de GM-CSF, más preferiblemente no más del 8 %, incluso más preferiblemente no más del 5 %, de

- manera particularmente preferible no más del 2 % en relación con la cantidad del compuesto que neutraliza GM-CSF al comienzo del almacenamiento o antes de llevar a cabo uno o más ciclos de congelación/descongelación o antes de llevar a cabo estudios de agitación forme agregados, partículas y/o fragmentos. Esta estabilidad se aplica preferiblemente durante un intervalo de tiempo de al menos 1 mes, al menos 2 meses o al menos 3 meses; preferiblemente al menos 4 meses, al menos 5 meses o al menos 6 meses; más preferiblemente al menos 9 meses o al menos 12 meses; incluso más preferiblemente al menos 18 meses o al menos 24 meses; y lo más preferiblemente al menos 30 meses o al menos 36 meses o al menos 48 meses o al menos 54 meses o al menos 60 meses. Las condiciones de temperatura de almacenamiento preferidas son hasta temperatura ambiente (de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C), más preferiblemente 2-8 °C aproximadamente, el intervalo de tiempo más preferido es al menos 3 años o incluso al menos 4 años. En algunas realizaciones, el compuesto que neutraliza GM-CSF es estable a temperatura ambiente en un clima cálido (por ejemplo, aproximadamente 30 °C). El número de ciclos de congelación/descongelación durante los cuales el compuesto es preferiblemente estable según los parámetros anteriores es al menos un ciclo, preferiblemente al menos 2, 3 o 4 ciclos, más preferiblemente al menos 5, 6 o 7 ciclos, y lo más preferiblemente al menos 8, 9 o 10 ciclos. El número de días de agitación, por ejemplo, agitación durante el envío del compuesto que neutraliza GM-CSF, durante el cual el compuesto es preferiblemente estable según los parámetros anteriores (por ejemplo, a una temperatura de  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , véase también el ejemplo 12d) es de al menos 1 día, preferiblemente al menos 2, 3 o 4 días, más preferiblemente al menos 5, 6 o 7 días, incluso más preferiblemente al menos 8, 9, 10 u 11 días y lo más preferiblemente al menos 12, 13 o 14 días.
- Como alternativa, se prevé que un compuesto que neutraliza GM-CSF sea preferentemente estable en la medida en que no forma dímeros, oligómeros o fragmentos. Dicho de otra manera, la estabilidad de un compuesto que neutraliza GM-CSF puede determinarse según el porcentaje de proteína monomérica en la disolución, con un bajo porcentaje de proteína degradada (por ejemplo, fragmentada), particulada (por ejemplo, con partículas visibles y/o subvisibles) y/o agregada. Por ejemplo, una formulación de la invención que comprende un compuesto neutralizante de GM-CSF, específicamente un anticuerpo monoclonal humano como se define en el presente documento puede incluir al menos el 90 %, más preferiblemente al menos el 92 %, incluso más preferiblemente al menos el 95 %, de manera particularmente preferible al menos el 98 % y lo más preferiblemente al menos el 99 % de monómero del compuesto que neutraliza GM-CSF.
- Por "agregado" se entiende una interacción física entre moléculas de proteína que da como resultado la formación de dímeros u oligómeros covalentes o no covalentes (es decir, entidades de alto peso molecular tales como trímeros o multímeros) que pueden permanecer solubles. Un "agregado" también incluye proteína degradada y/o fragmentada. El tamaño de un agregado, por ejemplo, un agregado soluble, es generalmente inferior a 1  $\mu\text{m}$ .
- Por "partícula subvisible" se entiende una interacción física de moléculas de proteína (incluida proteína degradada o fragmentada) que da como resultado la formación de partículas de proteína reversibles o irreversibles de más de 1  $\mu\text{m}$  de tamaño y hasta aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  de tamaño. Los agregados solubles y/o las moléculas de proteína (incluida proteína degradada o fragmentada) pueden unirse para formar partículas subvisibles.
- Una "partícula visible" es normalmente mayor de 100  $\mu\text{m}$  de tamaño y puede ser una partícula intrínseca visible de proteína, por ejemplo, formadas a partir de partículas subvisibles, agregados o moléculas de proteínas más pequeñas (incluida proteína degradada o fragmentada) o una partícula visible extrínseca, por ejemplo, que comprende materia extraña, tal como a partir de un contenedor de almacenamiento o dispositivo de suministro. Algunas partículas extrínsecas o intrínsecas derivadas de un producto de combinación, tales como gotitas de silicona, son líquidas, no partículas, pero puede detectarse como partículas en algunos ensayos.
- Tal como se mencionó anteriormente en el presente documento, pueden usarse varios métodos analíticos diferentes para detectar la presencia y los niveles de agregados en una formulación que comprende un compuesto que neutraliza GM-CSF. Estos incluyen, pero no se limitan a, por ejemplo, electroforesis en gel de poliacrilamida nativa (PAGE), electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE), espectrometría de masas de tiempo de vuelo de desorción-ionización láser asistida por matriz (MALDI-TOF MS), electroforesis en gel capilar (CGE), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), ultracentrifugación analítica (AUC), fraccionamiento de flujo de campo (FFF), velocidad de sedimentación, espectroscopía UV, calorimetría diferencial de barrido, turbidimetría, nefelometría, cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-HPLC), cromatografía de líquidos de alto rendimiento de fase inversa (RP-HPLC), espectroscopía de masas en tandem de ionización por electropulverización (ESI-MS) y RP-HPLC/ESI-MS en tandem, técnica de fraccionamiento de flujo-campo de flujo y dispersión de luz estática y/o dinámica. Estos métodos pueden usarse solos, o en combinación. Preferiblemente, los métodos analíticos para detectar la presencia y los niveles de agregados y/o fragmentos en una formulación que comprende un compuesto que neutraliza GM-CSF son cromatografías de exclusión por tamaño tales como SE-HPLC, ultracentrifugación analítica y fraccionamiento de flujo de campo asimétrico. Un método para determinar la actividad biológica de un compuesto que neutraliza GM-CSF es, por ejemplo, la medición de su grado de unión a GM-CSF (o receptor de GM-CSF) (inmovilizado) es la denominada resonancia de plasmón superficial (SPR).
- Un desafío común con una formulación que comprende una proteína es la acumulación irreversible de agregados con el tiempo, la tensión térmica o tensión de cizallamiento. Normalmente, cuando los agregados precipitan, forman partículas grandes que son fáciles de detectar. Sin embargo, agregados más pequeños, solubles no covalentes que a

menudo son precursores de precipitación en partículas grandes, son más difíciles de detectar y cuantificar. Por lo tanto, los métodos para detectar y cuantificar la agregación de proteínas en una formulación de proteína deben basarse en el tipo de agregado que se evalúa.

- 5 Entre los métodos anteriores, los métodos sugeridos para determinar la presencia y/o cantidades de agregados solubles y covalentes en una formulación de proteína son: SEC/dispersión de luz, SDS-PAGE, CGE, RP-HPLC/ESI-MS, FFF y AUC. Los métodos sugeridos para determinar la presencia y/o cantidades de agregados solubles y no covalentes en una formulación de proteína son: SEC, PAGE, SDS-PAGE, CGE, FFF, AUC y dispersión dinámica de la luz. Los métodos sugeridos para determinar la presencia y/o cantidades de agregados insolubles y no covalentes en una formulación de proteína son: espectroscopía UV, turbidimetría, nefelometría, microscopía, AUC, fraccionamiento de flujo de campo asimétrico y dispersión dinámica de la luz.

10 También pueden formarse partículas subvisibles a partir de proteína degradada, agregados o partículas subvisibles más pequeñas. Los métodos sugeridos para determinar la presencia y/o las cantidades de partículas subvisibles son: dispersión de luz, por ejemplo, estática (por ejemplo, por dispersión de luz láser multiángulo) o dinámica (por ejemplo, mediante espectroscopía de correlación de fotones), análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA, por ejemplo de Malvern Instruments, Malvern, Reino Unido), oscurecimiento de la luz, u otro sistema de recuento de partículas líquidas, tal como microscopía, obtención de imágenes dinámicas (obtención de imágenes de microflujo, por ejemplo, Brightwell (Cell Biosciences, Ottawa, CA) o analizador de partículas de imagen FLOWCAM® por Fluid Imaging Technologies (Yarmouth, ME), etc.), citometría de flujo y recuento de impedancia electrónica (Coulter).

15 Además, la formulación de la invención proporciona preferiblemente un almacenamiento mejorado a largo plazo de modo que el compuesto que neutraliza GM-CSF sea estable durante el transcurso del almacenamiento, ya sea en forma líquida o congelada, preferiblemente líquida. Como se usa en el presente documento, se entiende que la frase almacenamiento "a largo plazo" significa que la formulación puede almacenarse durante al menos un mes, dos o tres meses o más, durante seis meses o más, y preferiblemente durante un año y más o incluso 2 años, 3 años o 4 años o 5 años y más. También se entiende que el almacenamiento a largo plazo significa que la composición farmacéutica se almacena a 2-8 °C o a temperatura ambiente, preferiblemente a 2-8 °C, por lo tanto, la formulación preferiblemente no pierde su actividad biológica en la medida como se describe en el presente documento y/o no forma agregados en la medida como se describe en el presente documento y/o comprende monómeros en la medida como se describe en el presente documento. Se describen pruebas para estas propiedades en otra parte en el presente documento.

20 En un aspecto de la invención, el compuesto que neutraliza GM-CSF en las formulaciones es estable en forma líquida durante al menos 1 mes, 2 meses, 3 meses; al menos 4 meses, al menos 5 meses; al menos 6 meses; al menos 12 meses; al menos 24 meses; al menos 36 meses; al menos 48 meses, al menos 60 meses. También se pretende que los intervalos intermedios a los períodos de tiempo mencionados anteriormente sean parte de esta invención, por ejemplo, 9 meses, y así sucesivamente. Además, se pretende incluir intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente como límites superior y/o inferior. Preferiblemente, la formulación es estable a temperatura ambiente (de aproximadamente 20 °C a 25 °C) durante al menos 1 mes y/o estable a aproximadamente 2-8 °C durante al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12 meses, o más preferiblemente estable a aproximadamente 2-8 °C durante al menos 2 años, al menos 3 años, al menos 4 años o incluso al menos 5 años.

25 Otro aspecto importante de la estabilidad es que el compuesto que neutraliza GM-CSF dentro de la composición según la invención mantiene su actividad biológica o potencia durante el tiempo de almacenamiento y dentro de las condiciones de almacenamiento, especialmente la temperatura y posibles cambios de temperatura. La actividad o potencia se refleja, por ejemplo, por la capacidad neutralizante del propio compuesto (que puede medirse en ensayos basados en células, como se describió anteriormente en el presente documento) o por la capacidad del compuesto neutralizante de GM-CSF para unirse a GM-CSF o al receptor de GM-CSF. La afinidad de unión puede evaluarse mediante SPR u otros métodos bien conocidos en la técnica, por ejemplo un ensayo Biacore o Scatchard.

30 La formulación de la invención se prepara añadiendo a un compuesto que neutraliza GM-CSF como se describe en el presente documento, que es un anticuerpo monoclonal humano que se une a GM-CSF, en una disolución acuosa, un tampón histidina, un modificador de la tonicidad, que es sorbitol y un tensioactivo, que es polisorbato 80, aminoácidos, antioxidantes y/o quelantes. Los expertos habituales en la técnica entenderán que la combinación de los diversos componentes que van a incluirse en la formulación puede hacerse en cualquier orden apropiado. Por ejemplo, el tampón puede añadir en primer lugar, entre o en último lugar, el modificador de la tonicidad puede añadirse en primer lugar, entre o en último lugar y el uno o más de los tensioactivos, aminoácidos, antioxidantes y/o quelantes también pueden añadirse en primer lugar, entre o en último lugar. Un experto en la técnica también debe entender que algunos de estos productos químicos pueden ser incompatibles en ciertas combinaciones y, por consiguiente, se sustituyen fácilmente con diferentes productos químicos que tienen propiedades similares pero son compatibles en la mezcla relevante.

35 La formulación de la invención comprende un tampón. El término "tampón" o "agente tamponante", como se usa en el presente documento, incluye aquellos agentes que mantienen el pH en un intervalo deseado. Un tampón es una disolución acuosa que consiste en una mezcla de un ácido débil y su base conjugada o una base débil y su ácido

conjugado. Tiene la propiedad de que el pH de la disolución cambia muy poco cuando se añade una pequeña cantidad de un ácido o base fuerte. Las disoluciones tampón se usan como medio para mantener el pH a un valor casi constante en una amplia variedad de aplicaciones químicas. En general, un tampón, cuando se aplica en la formulación de la invención, estabiliza preferiblemente el compuesto que neutraliza GM-CSF.

- 5 Los "tampones de aminoácidos", cuando se usan en el presente documento, incluyen, por ejemplo, la base de aminoácidos, por ejemplo, histidina y su sal conjugada. Un ejemplo de un tampón de aminoácidos es histidina/cloruro de histidina. Este ejemplo se aplica preferiblemente en la invención.
- 10 El pH de la formulación, como se describe en el presente documento, es 5,8. El término "aproximadamente", cuando se usa en el contexto del valor/intervalo de pH, significa preferiblemente un valor numérico que tiene un intervalo de +/- 20 % alrededor del valor citado. Cuando el pH de la composición farmacéutica se establece en o cerca de niveles fisiológicos, se maximiza la comodidad del paciente tras la administración. Debe entenderse que el pH puede ajustarse según sea necesario para maximizar la estabilidad y la solubilidad del compuesto que neutraliza GM-CSF en una formulación particular y, como tal, un pH fuera de los intervalos fisiológicos, aunque preferiblemente tolerable para el paciente, está dentro del alcance de la invención.

15 En la presente invención, el tampón es un tampón histidina. Los ejemplos no limitativos de otros tampones que pueden usarse en una formulación descrita en el presente documento incluyen succinato, gluconato, citrato, arginina, lisina, ácido aspártico, ácido glutámico, tris (trometamol), Bis-Tris, MOPS, ACES, TES, HEPES, EPPS, etilendiamina, ácido fosfórico, ácido maleico/fosfato, ácido 2-morfolinoetanosulfónico (MES), fosfato, acetato y dietanolamina.

20 En la formulación de la invención se aplica un tampón histidina que tiene un pH de 5,8. Los tampones aplicados en la invención se conocen bien en la técnica y se fabrican por métodos conocidos y están disponibles de proveedores comerciales. En algunas realizaciones, el pH del tampón se prepara sin hidróxido de sodio (NaOH 0 mM). En una realización, un tampón es una mezcla de un aminoácido y una sal del mismo, por ejemplo, una mezcla de histidina y una sal de histidina, que puede medirse previamente en una proporción de modo que no se requiera ningún ajuste de pH con un ácido o base separado durante la preparación del tampón.

25 30 La formulación puede comprender además hidróxido de sodio (NaOH). En realizaciones particulares, la formulación comprende 1-200 mM, o menos de 50 mM, menos de 40 mM, menos de 35 mM, menos de 30 mM, menos de 25 mM, menos de 20 mM o menos de 15 mM, por ejemplo NaOH 10 mM o menos, tal como hidróxido de sodio 5 mM o 1 mM.

35 Además del compuesto que neutraliza GM-CSF y el tampón, una formulación según la invención también puede contener otras sustancias que incluyen, pero no se limitan a, agentes estabilizantes (estabilizadores).

40 Además, la formulación de la presente invención comprende un estabilizador que también puede actuar como modificador de la tonicidad. El término "agente estabilizante" se refiere a un agente que mejora o de otro modo potencia la estabilidad de la formulación, en particular de los compuestos que neutralizan GM-CSF. Un agente estabilizante que es un modificador de la tonicidad se define como un azúcar no reductor, un alcohol de azúcar o una combinación de los mismos. Los modificadores de la tonicidad en las composiciones líquidas garantizan que la tonicidad, es decir, osmolaridad, de la disolución sea esencialmente la misma que los fluidos fisiológicos normales y, por lo tanto, evita el hinchamiento posterior a la administración o la absorción rápida de la composición debido a las concentraciones de iones diferenciales entre la composición y los fluidos fisiológicos. Generalmente, la naturaleza de una formulación 45 como se describe en el presente documento es tal que la osmolalidad de la formulación está entre aproximadamente 240 y aproximadamente 500 mOsmol/kg, más preferiblemente entre aproximadamente 300 y aproximadamente 450 mOsmol/kg, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 350 y aproximadamente 450 mOsmol/kg, lo más preferiblemente 400 mOsmol/kg aproximadamente.

50 55 Se da a conocer un agente estabilizante/modificador de tonicidad que puede ser uno o más de azúcares no reductores, tales como sacarosa o trehalosa o uno o más de alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol, también se prefieren combinaciones de azúcares no reductores y alcoholes de azúcar. En la presente invención, la concentración del agente estabilizante/modificador de la tonicidad en la composición es del 5 % (p/v).

60 65 Además, una formulación descrita en el presente documento comprende uno o más excipientes adicionales. El excipiente como se da a conocer en el presente documento puede seleccionarse del grupo que consiste en tensioactivos, aminoácidos, antioxidantes, quelantes y combinaciones de los mismos.

Pueden añadirse excipientes, también denominados aditivos químicos, cosolutos o codisolventes, que preferiblemente estabilizan los compuestos que neutralizan GM-CSF mientras están en disolución (también en formas secas o congeladas) a una formulación de la invención. Preferiblemente, los excipientes contribuyen a la estabilidad de los compuestos que neutralizan GM-CSF, pero debe entenderse que los excipientes pueden contribuir de otro modo a las propiedades físicas, químicas y biológicas de la formulación. Los excipientes se conocen bien en la técnica y se fabrican por métodos conocidos y están disponibles de proveedores comerciales.

La formulación de la presente invención comprende como excipiente un tensioactivo. El término "tensioactivo" generalmente incluye aquellos agentes que protegen los compuestos que neutralizan GM-CSF de tensiones inducidas por la interfaz aire/disolución y tensiones inducidas por la disolución/superficie. Estas tensiones interfaciales pueden inducir la agregación de proteínas y la formación de partículas que conducen a una calidad de producto inaceptable.

5 Los ejemplos de estrés interfacial podrían ser el contacto de la proteína con i) aire ii) material de cierre del recipiente, tal como émbolo de caucho, pistón, vidrio, jeringas precargadas iii) materiales relacionados con la producción, tales como tanques de acero, tubos y bombas iv) hielo, durante la congelación/descongelación, etc. La adición de tensioactivos a las formulaciones reduciría la interacción de la proteína con las interfaces hidrófobas, incluidas interfaces líquido/aire, interfaces hielo/líquido e interacciones proteína-proteína. Los tensioactivos reducirían la 10 cantidad de partículas subvisibles y visibles creadas durante operaciones tales como congelación, mezclado, filtración y bombeo.

15 Los ejemplos de tensioactivos que se dan a conocer en el presente documento incluyen, sin limitación, tensioactivos no iónicos, tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbato 80 (PS80) o polisorbato 20 (PS20) (el polisorbato generalmente también se conoce por el nombre comercial TWEEN®, ICI Americas); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Triton, dodecilsulfato de sodio (SDS); laurilsulfato de sodio; octilglicósido de sodio; lauril-sulfobetaína, miristil-sulfobetaína, linoleil-sulfobetaína, estearil-sulfobetaína, lauril-sarcosina, miristil-sarcosina, linoleil-sarcosina, estearil-sarcosina, linoleil-betaína, miristil-betaína, cetil-betaína, lauroamidopropil-betaína, cocamidopropil-betaína, linoleamidopropil-betaína, miristamidopropil-betaína, palmidopropil-betaína, isoestearamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropilo), miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-dimetilamina; metilcocoil-taurato de sodio o metilofecil-taurato de disodio; y la serie Monaquat (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polieliglícico, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, pluronic, PF68). El tensioactivo usado en una formulación de la invención es polisorbato 80.

20 25 La cantidad de tensioactivo añadido es tal que mantiene la agregación de la proteína a un nivel aceptable como se somete a ensayo usando, por ejemplo, SEC-HPLC, y para reducir también la cantidad de partículas subvisibles o visibles formadas durante el almacenamiento, fabricación, congelación/descongelación, transporte, etc. medido por oscurecimiento de la luz, microscopía y sistemas de recuento de partículas basados en obtención de imágenes dinámicas tales como obtención de imágenes de microflujo o FlowCAM.

30 35 En algunas realizaciones, la cantidad de tensioactivo en una formulación se determina basándose en la concentración de agregación crítica (CAC). La CAC es la concentración a la que el tensioactivo comienza a interactuar con la proteína. Pueden representarse gráficamente mediciones de tensión superficial, por ejemplo, de un tensímetro, para obtener curvas similares a la figura 7. La concentración de tensioactivo en el primer punto de discontinuidad es la CAC. En algunas realizaciones, la cantidad de tensioactivo en una formulación es una cantidad mayor que la CAC. En algunas realizaciones, la cantidad de tensioactivo es mayor que la CAC pero menor que la concentración micelar crítica (CMC).

40 La formulación de la invención comprende como tensioactivo polisorbato 80 en una concentración desde el 0,01 % (p/v) hasta el 0,08 % (p/v) para concentraciones de proteína de hasta 200 mg/ml.

45 En una realización que no se refiere a la presente invención y se presenta solo con fines ilustrativos, la razón de polisorbato 20 con respecto a proteína está entre aproximadamente 0,01:1 y aproximadamente 3:1, preferiblemente entre aproximadamente 0,05:1 y aproximadamente 2:1, más preferiblemente entre aproximadamente 0,1:1 y aproximadamente 1,5:1, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 0,1:1 y aproximadamente 0,8:1, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 0,1:1 y aproximadamente 0,2:1. Para una concentración de proteína de 80 mg/ml, la concentración de polisorbato 20 está entre aproximadamente el 0,001 % (p/v) y aproximadamente el 0,2 % (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,005 % (p/v) y aproximadamente el 0,15 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,007 % (p/v) y aproximadamente el 0,1 % (p/v), incluso más preferiblemente entre aproximadamente el 0,007 % (p/v) y aproximadamente el 0,06 % (p/v) y lo más preferiblemente el 0,01 % (p/v) aproximadamente. Para una concentración de proteína de 150 mg/ml, la concentración de polisorbato 20 está entre aproximadamente el 0,001 % (p/v) y aproximadamente el 0,4 % (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,006 % (p/v) y aproximadamente el 0,25 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,01 % (p/v) y aproximadamente el 0,18 % (p/v), incluso más preferiblemente entre aproximadamente el 0,01 % (p/v) y aproximadamente el 0,1 % (p/v) y lo más preferiblemente el 0,02 % (p/v) aproximadamente.

50 55 60 65 En otra realización de dicha divulgación que no se refiere a la presente invención, la razón de polisorbato 20 con respecto a proteína está entre aproximadamente 0,3:1 y aproximadamente 3:1, preferiblemente entre aproximadamente 0,5:1 y aproximadamente 2,0:1, más preferiblemente entre aproximadamente 0,5:1 y aproximadamente 1,5:1, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 0,8:1 y aproximadamente 1,2:1, y lo más preferiblemente 1:1 aproximadamente. Para una concentración de proteína de 80 mg/ml, la concentración de polisorbato 20 está entre aproximadamente el 0,02 % (p/v) y aproximadamente el 0,2 % (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,03 % (p/v) y aproximadamente el 0,13 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) y aproximadamente el 0,08 % (p/v) y lo más preferiblemente el 0,07 % (p/v) aproximadamente. Para una concentración de proteína de 150 mg/ml, la concentración de polisorbato 20 está entre aproximadamente el 0,04 % (p/v) y aproximadamente el 0,4 % (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,06 % (p/v) y aproximadamente

el 0,25 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,1 % (p/v) y aproximadamente el 0,15 % (p/v) y lo más preferiblemente el 0,13 % (p/v) aproximadamente.

La razón de polisorbato 80 con respecto a proteína puede estar entre aproximadamente 0,01:1 y aproximadamente 3:1, preferiblemente entre aproximadamente 0,05:1 y aproximadamente 2:1, más preferiblemente entre aproximadamente 0,1:1 y aproximadamente 1,5:1, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 0,1:1 y aproximadamente 0,6:1, y lo más preferiblemente de desde aproximadamente 0,3:1 hasta aproximadamente 0,6:1. Para una concentración de proteína de 80 mg/ml, la concentración de polisorbato 80 está entre aproximadamente el 0,001 % (p/v) y aproximadamente el 0,2 % (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,004 % (p/v) y aproximadamente el 0,14 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,007 % (p/v) y aproximadamente el 0,1 % (p/v), incluso más preferiblemente entre aproximadamente el 0,007 % (p/v) y aproximadamente el 0,05 % (p/v), y lo más preferiblemente el 0,04 % (p/v) aproximadamente. Para una concentración de proteína de 150 mg/ml, la concentración de polisorbato 80 está entre aproximadamente el 0,001 % (p/v) y aproximadamente el 0,4 % (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,007 % (p/v) y aproximadamente el 0,26 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,01 % (p/v) y aproximadamente el 0,2 % (p/v), incluso más preferiblemente entre aproximadamente el 0,01 % (p/v) y aproximadamente el 0,08 % (p/v), lo más preferiblemente el 0,04 % (p/v) aproximadamente.

La razón de polisorbato 80 con respecto a proteína puede estar entre aproximadamente 0,3:1 y aproximadamente 3:1, preferiblemente entre aproximadamente 0,5:1 y aproximadamente 2,0:1, más preferiblemente entre aproximadamente 0,5:1 y aproximadamente 1,5:1, incluso más preferiblemente entre aproximadamente 0,8:1 y aproximadamente 1,2:1, y lo más preferiblemente 1:1 aproximadamente. Para una concentración de proteína de 80 mg/ml, la concentración de polisorbato 80 está entre aproximadamente el 0,02 % (p/v) y aproximadamente el 0,2 % (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,04 % (p/v) y aproximadamente el 0,14 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,06 % (p/v) y aproximadamente el 0,09 % (p/v), lo más preferiblemente el 0,07 % (p/v) aproximadamente. Para una concentración de proteína de 150 mg/ml, la concentración de polisorbato 80 está entre aproximadamente el 0,04 % (p/v) y aproximadamente el 0,4 % (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,06 % (p/v) y aproximadamente el 0,27 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,1 % (p/v) y aproximadamente el 0,16 % (p/v), lo más preferiblemente el 0,13 % (p/v) aproximadamente. La concentración del polisorbato 80 usado como tensioactivo en la formulación de la presente invención es desde el 0,01 % hasta el 0,08 % (p/v).

Otros excipientes preferidos pueden ser antioxidantes o quelantes. Como se usa en el presente documento, un "antioxidante" es una molécula capaz de ralentizar o prevenir la oxidación de otras moléculas. La oxidación es una reacción química que transfiere electrones de una sustancia a un agente oxidante. Los antioxidantes o quelantes pueden usarse para reducir los efectos de oxidación introducidos por la adición de tensioactivos tales como polisorbato 80 o polisorbato 20, que puede formar peróxidos en disolución. También pueden añadirse antioxidantes y/o quelantes tales como ácido ascórbico (vitamina C), ácido lipoico, melatonina, ácido úrico, carotenos, retinoles, tocoferoles y tocotrienoles, por ejemplo  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ubiquinona (coenzima Q) metionina, cisteína, ácido cítrico, EDTA o DTPA a la formulación. Más preferiblemente, se añaden metionina, cisteína o ácido cítrico en razones molares de antioxidante:tensioactivo de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 156:1 o razones molares de aproximadamente 1:1 a aproximadamente 150:1 de antioxidante:proteína. Más preferiblemente para antioxidante:proteína, la razón es de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 100:1, incluso más preferiblemente de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 20:1, lo más preferiblemente de aproximadamente 3:1 a aproximadamente 8:1.

Otro excipiente que puede añadirse para estabilizar las proteínas en la formulación es un aminoácido. Por ejemplo, un aminoácido que puede usarse en la composición de la presente invención se selecciona del grupo que consiste en treonina, serina, prolina, alanina, valina, glutamina, metionina, cisteína, isoleucina, ácido aspártico, ácido glutámico, arginina, glicina, histidina, lisina, fenilalanina, leucina, asparagina, triptófano, tirosina y combinaciones de los mismos. Más preferido, el aminoácido se selecciona del grupo que consiste en arginina, treonina, serina, alanina, glutamina, metionina, glicina y combinaciones de las mismas.

Las concentraciones de aminoácidos que pueden usarse en las composiciones de la presente invención oscilan preferiblemente desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 100 mM, más preferiblemente desde aproximadamente 50 mM hasta aproximadamente 100 mM.

Los ejemplos de excipientes adicionales incluyen, pero no se limitan a, azúcares/polioles tales como: sacarosa, lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa; polímeros tales como: albúmina sérica (albúmina sérica bovina (BSA), SA humana o HA recombinante), dextrano, PVA, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polietilenimina, gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC), hidroxietilalmidón (HES); disolventes no acuosos tales como: alcoholes polihidroxilados (por ejemplo, PEG, etilenglicol y glicerol) dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF); y excipientes diversos tales como: fosfato de potasio, acetato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de sodio, N-óxido de trimetilamina, betaina, iones metálicos (por ejemplo, zinc, cobre, calcio, manganeso y magnesio), CHAPS, monolaurato, 2-O-beta-manoglicerato o cualquier combinación de los anteriores.

Los "crioprotectores" incluyen sustancias que proporcionan estabilidad a la proteína congelada durante la producción, congelación, almacenamiento, manipulación, distribución, reconstitución o uso. En un aspecto particular, los "crioprotectores" incluyen sustancias que protegen la proteína del estrés inducido por el proceso de congelación. Los crioprotectores pueden tener efectos lioprotectores. Los ejemplos no limitativos de crioprotectores incluyen azúcares, tales como sacarosa, glucosa, trehalosa, manitol, sorbitol, manosa y lactosa; polímeros, tales como dextrano, hidroxietilalmidón, polivinilpirrolidona (PVP) y polietilenglicol; tensioactivos, tales como polisorbatos (por ejemplo, PS-20 o PS-80); y aminoácidos, tales como glicina, arginina, leucina y serina. Generalmente se usa un crioprotector que presenta baja toxicidad en sistemas biológicos.

5 Un disacárido como se describe en el presente documento puede actuar como lioprotector o crioprotector. Los "lioprotectores" incluyen sustancias que previenen o reducen la inestabilidad química o física de una proteína tras la liofilización y el almacenamiento posterior. En un aspecto, el lioprotector previene o reduce las inestabilidades químicas o físicas en la proteína a medida que el agua se elimina de la composición durante el proceso de secado. En un aspecto adicional, el lioprotector estabiliza la proteína ayudando a mantener la conformación apropiada de la proteína a través de enlaces de hidrógeno.

10 Por consiguiente, en un aspecto, un disacárido como se describe en el presente documento puede servir para estabilizar los compuestos que neutralizan GM-CSF durante la congelación. Como la protección durante la congelación puede depender de la concentración absoluta del disacárido (Carpenter *et al.*, Pharm. Res. (1997), 14:969-975), 15 pueden ser necesarias concentraciones superiores al 5 % para maximizar la estabilidad.

20 En una realización, puede añadirse un lioprotector a una formulación descrita en el presente documento. El término "lioprotector", como se usa en el presente documento, incluye agentes que proporcionan estabilidad a la proteína durante el proceso de secado por congelación o deshidratación (ciclos de secado por congelación primario y 25 secundario), proporcionando una matriz vítreo amorfía y uniéndose con la proteína a través de enlaces de hidrógeno, reemplazando las moléculas de agua que se eliminan durante el proceso de secado. Esto ayuda a mantener la conformación de la proteína, minimizar la degradación de proteínas durante el ciclo de liofilización y mejorar la estabilidad del producto a largo plazo. El lioprotector se añade a la formulación preliofilizada en una "cantidad de 30 lioprotección", lo que significa que, después de la liofilización de los compuestos que neutralizan GM-CSF en presencia de la cantidad de lioprotección del lioprotector, los compuestos conservan esencialmente su estabilidad física y química e integridad tras la liofilización y el almacenamiento.

35 Los ejemplos no limitativos de lioprotectores incluyen azúcares, tales como sacarosa o trehalosa; un aminoácido, tal como glutamato monosódico, glicina o histidina; una metilamina, tal como betaina; una sal liotrópica, tal como sulfato de magnesio; un poliol, tal como alcoholes de azúcar trihidroxilados o superiores, por ejemplo, arabinol, xilitol, sorbitol y manitol; polietilenglicol; pluronics; y combinaciones de los mismos. Preferiblemente, los lioprotectores son como se describieron anteriormente para agentes estabilizantes. La cantidad de lioprotector añadido a una formulación es generalmente una cantidad que no conduce a un grado inaceptable de degradación/agregación de la proteína cuando 40 la formulación de proteína se liofiliza.

45 Un excipiente preferido adicional puede ser un agente de relleno. El término "agente de relleno", como se usa en el presente documento, incluye agentes que proporcionan la estructura de un producto secado por congelación sin interactuar directamente con el producto farmacéutico. Además de proporcionar una torta farmacéuticamente elegante, los agentes de relleno también pueden conferir cualidades útiles con respecto a la modificación de la temperatura de colapso, proporcionar protección contra la congelación-descongelación y potenciar la estabilidad de la proteína durante el almacenamiento a largo plazo. Los ejemplos no limitativos de agentes de relleno incluyen manitol, glicina, lactosa y sacarosa. Los agentes de relleno pueden ser cristalinos (tales como glicina, manitol o cloruro de sodio) o amorfos (tales como dextrano, hidroxietilalmidón) y se usan generalmente en formulaciones de proteínas en una cantidad desde el 0,5 % hasta el 10 %.

50 Preferiblemente, el agente de relleno aplicado en la formulación puede promover la formación de una torta que sea estéticamente aceptable, uniforme o mecánicamente fuerte. Los agentes de relleno también promueven preferiblemente la formación de una estructura de poro abierto y la facilidad y velocidad de reconstitución. Los agentes de relleno también reducen o evitan preferiblemente el colapso de la torta, la fusión eutéctica o la retención de 55 humedad residual. En otro aspecto, los agentes de relleno ayudan preferiblemente a proteger los compuestos que neutralizan GM-CSF contra tensiones (por ejemplo, tensiones físicas y químicas) y ayudan a mantener la actividad de las proteínas.

60 En algunas realizaciones, la formulación puede contener opcionalmente un conservante. Un "conservante" es un compuesto que puede añadirse a las formulaciones en el presente documento para reducir la actividad bacteriana. La adición de un conservante puede, por ejemplo, facilitar la producción de una formulación de múltiples usos (múltiples dosis). Los ejemplos de posibles conservantes incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en la que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, 65 ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol. El conservante más preferido en el presente documento es alcohol bencílico.

Por consiguiente, la formulación de la invención es una formulación líquida, específicamente una disolución acuosa, para almacenamiento a largo plazo que comprende de desde 50 mg/ml hasta 180 mg/ml de un compuesto que neutraliza GM-CSF, que es un anticuerpo monoclonal humano como se define en el presente documento y un tampón histidina a un pH de 5,8, y la formulación comprende adicionalmente sorbitol como estabilizador/modificador de tonicidad y como tensioactivo polisorbato 80.

Especificamente, una formulación de la invención es una formulación líquida, específicamente una disolución acuosa, para almacenamiento a largo plazo que comprende de desde 50 mg/ml hasta 180 mg/ml de un compuesto que neutraliza GM-CSF, que es un anticuerpo monoclonal humano como se define en el presente documento, y un tampón de histidina a una concentración de 30 mM, a un pH de 5,8, y la formulación comprende adicionalmente sorbitol al 5 % (p/v), así como polisorbato 80, en una concentración desde el 0,01 % (p/v) hasta el 0,08 % (p/v), preferiblemente polisorbato 80 en una concentración de aproximadamente el 0,01 % (p/v) a aproximadamente el 0,04 % (p/v).

Si se usa polisorbato 20 y una concentración de proteína de aproximadamente 80 mg/ml en la realización que no se refiere a la presente invención, la concentración de polisorbato 20 está entre aproximadamente el 0,001 % (p/v) y aproximadamente el 0,2% (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,007% (p/v) y aproximadamente el 0,11 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,007% (p/v) y aproximadamente el 0,06% (p/v) y lo más preferiblemente el 0,01 % (p/v) aproximadamente. Si la concentración de proteína usada es de aproximadamente 150 mg/ml, las concentraciones de polisorbato 20 están entre aproximadamente el 0,001 % (p/v) y aproximadamente el 0,4 % (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,006 % (p/v) y aproximadamente el 0,25 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,01 % (p/v) y aproximadamente el 0,18 % (p/v), incluso más preferiblemente entre aproximadamente el 0,01 % (p/v) y aproximadamente el 0,1 % (p/v) y lo más preferiblemente el 0,02 % (p/v) aproximadamente.

En otra realización que no se refiere a la presente invención y está presente solo con fines ilustrativos, si se usa polisorbato 20 y una concentración de proteína de aproximadamente 80 mg/ml en la formulación preferida anterior, la concentración de polisorbato 20 está entre aproximadamente el 0,02 % (p/v) y aproximadamente el 0,2% (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,03 % (p/v) y aproximadamente el 0,13 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,05 % (p/v) y aproximadamente el 0,08 % (p/v) y lo más preferiblemente el 0,07 % (p/v) aproximadamente. Si la concentración de proteína usada es de aproximadamente 150 mg/ml, las concentraciones de polisorbato 20 están entre aproximadamente el 0,04 % (p/v) y aproximadamente el 0,4 % (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,06 % (p/v) y aproximadamente el 0,25 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,1 % (p/v) y aproximadamente el 0,15 % (p/v) y lo más preferiblemente el 0,13 % (p/v) aproximadamente.

Si se usa polisorbato 80 como tensioactivo de la formulación de la presente invención y una concentración de proteína de aproximadamente 80 mg/ml en la formulación preferida anterior, la concentración de polisorbato 80 está entre aproximadamente el 0,001 % (p/v) y aproximadamente el 0,2 % (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,004 % (p/v) y aproximadamente el 0,14 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,007 % (p/v) y aproximadamente el 0,1 % (p/v), incluso más preferiblemente entre aproximadamente el 0,007 % (p/v) y aproximadamente el 0,05% (p/v), y lo más preferiblemente el 0,04 % (p/v) aproximadamente. Si la concentración de proteína usada es de aproximadamente 150 mg/ml, la concentración de polisorbato 80 está entre aproximadamente el 0,001 % (p/v) y aproximadamente el 0,4 % (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,007 % (p/v) y aproximadamente el 0,26 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,01 % (p/v) y aproximadamente el 0,2 % (p/v), incluso más preferiblemente entre aproximadamente el 0,01 % (p/v) y aproximadamente el 0,08 % (p/v), y lo más preferiblemente el 0,04 % (p/v) aproximadamente.

Si se usa polisorbato 80 como tensioactivo de la formulación de la presente invención y una concentración de proteína de aproximadamente 80 mg/ml en la formulación preferida anterior, la concentración de polisorbato 80 está entre aproximadamente el 0,02 % (p/v) y aproximadamente el 0,2 % (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,04 % (p/v) y aproximadamente el 0,14 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,06 % (p/v) y aproximadamente el 0,09 % (p/v), lo más preferiblemente el 0,07 % (p/v) aproximadamente. Si la concentración de proteína usada es de aproximadamente 150 mg/ml, la concentración de polisorbato 80 está entre aproximadamente el 0,04 % (p/v) y aproximadamente el 0,4 % (p/v), preferiblemente entre aproximadamente el 0,06 % (p/v) y aproximadamente el 0,27 % (p/v), más preferiblemente entre aproximadamente el 0,1 % (p/v) y aproximadamente el 0,16 % (p/v), lo más preferiblemente el 0,13 % (p/v) aproximadamente.

Además, en una realización, la presente formulación del anticuerpo neutralizante anti-GM-CSF o fragmentos funcionales del mismo comprende de desde aproximadamente 80 mg/ml hasta aproximadamente 150 mg/ml del anticuerpo neutralizante, sorbitol aproximadamente al 5 % (p/v), L-histidina aproximadamente 30 mM, polisorbato 80 a aproximadamente el 0,02 % a aproximadamente el 0,04 % (p/v) y tiene un pH de aproximadamente 5,8.

Además, en una realización, la presente formulación del anticuerpo neutralizante anti-GM-CSF o fragmentos funcionales del mismo comprende aproximadamente 80 mg/ml del anticuerpo neutralizante, sorbitol aproximadamente al 5 % (p/v), L-histidina aproximadamente 30 mM, polisorbato 80 a aproximadamente el 0,04 % (p/v) y tiene un pH de aproximadamente 5,8.

Además, en una realización, la presente formulación del anticuerpo neutralizante anti-GM-CSF o fragmentos funcionales del mismo comprende aproximadamente 150 mg/ml del anticuerpo neutralizante, sorbitol aproximadamente al 5 % (p/v), L-histidina aproximadamente 30 mM, polisorbato 80 a aproximadamente el 0,04 % (p/v) y tiene un pH de aproximadamente 5,8.

5 Debe entenderse que ciertos componentes de la composición pueden intercambiarse con alternativas conocidas en la técnica. Sin embargo, un experto en la técnica también entenderá que la inclusión de ciertos componentes impedirá el uso de otros componentes, concentraciones o métodos para preparar la formulación, por razones que incluyen, pero 10 no se limitan a, compatibilidad química, pH, tonicidad y estabilidad.

15 Es beneficioso que la formulación líquida de la invención tenga una viscosidad baja y factible que sea adecuada para la administración subcutánea, tal como en un dispositivo listo para usar. La viscosidad de la formulación según la invención es, por lo tanto, preferiblemente inferior a 20 mPa\*s a una velocidad de cizallamiento de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1000 [1/s] y a una temperatura de aproximadamente 20 °C. Más preferiblemente, la viscosidad es inferior a 15 mPa\*s en las condiciones anteriores.

20 En algunas realizaciones, la viscosidad y/o la estabilidad de la formulación líquida de la invención mantiene con el tiempo una baja fuerza de inyección. Se realizan mediciones de fuerza, por ejemplo, de formulaciones en jeringas precargadas, en una máquina, tal como el sistema universal de pruebas de compresión INSTRON® (Norwood, MA) con un accesorio que adapta el mecanismo de pruebas para contener jeringas. Las formulaciones descritas en el presente documento proporcionan la posibilidad de administración subcutánea tanto por dispositivos manuales como automáticos (por ejemplo, asistidos mecánicamente). En una realización, la fuerza de inyección es la fuerza de deslizamiento. En algunas realizaciones, la fuerza de deslizamiento es inferior a 25 N. En otras realizaciones, la fuerza 25 de deslizamiento es de 0-20 N, 2-15 N o 4-11 N. El tiempo que la formulación puede mantener la baja fuerza de inyección es de al menos 3 meses, al menos 6 meses, al menos 12 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses, 12 meses, 15 meses, 18 meses, 24 meses, 3-6 meses, 3-9 meses, 6-9 meses, 6-12 meses, 9-15 meses, 12-18 meses, 18-30 meses o 24-36 meses después de cargarse en la jeringa. La formulación puede almacenarse en el refrigerador, por ejemplo, 2-8 °C o 5 °C, o a temperatura ambiente, por ejemplo, 18-25 °C o 25 °C.

30 Como se menciona en el presente documento, esta solicitud se refiere en general al descubrimiento de que la adición de varias sustancias a una formulación que comprende compuestos que neutralizan GM-CSF puede reducir la agregación y/o degradación/fragmentación de estos compuestos en una formulación. Independientemente de lo que provoque que un compuesto que neutraliza GM-CSF en una formulación se agregue o se degrada, la adición de las 35 sustancias como se describe en el presente documento reduce la agregación/fragmentación de los compuestos que neutralizan GM-CSF en la formulación. En ciertas realizaciones, la adición de las sustancias descritas reduce la agregación/degradación en una formulación provocada, por ejemplo, por almacenamiento, exposición a temperaturas elevadas, exposición a la luz, exposición a tensión de cizallamiento, pH y condiciones iónicas, y cualquier combinación de los mismos.

40 45 50 Las medidas encontradas por los presentes inventores pueden usarse para disminuir la agregación y/o degradación/fragmentación de compuestos que neutralizan GM-CSF formulados, en particular, en forma líquida y congelada. Por lo tanto, la agregación/fragmentación reducida se observa preferiblemente en una formulación líquida. Se supone que también puede observarse una agregación/degradación reducida cuando se almacena directamente en forma líquida para su uso posterior, se almacena en un estado congelado y descongelado antes de su uso o se prepara en forma seca, tal como una forma liofilizada, secada al aire o secada por pulverización, para su reconstitución posterior en una forma líquida u otra forma antes de su uso.

55 Por lo tanto, se prevé que una formulación descrita en el presente documento pueda almacenarse mediante cualquier método conocido por un experto en la técnica. Los ejemplos no limitativos incluyen enfriamiento, congelación, liofilización y secado por pulverización de la formulación, en los que se prefiere el almacenamiento por enfriamiento.

60 65 En algunos casos, las formulaciones de proteína se congelan para su almacenamiento. Por consiguiente, es deseable que la formulación sea relativamente estable en tales condiciones, incluido bajo ciclos de congelación-descongelación. Un método para determinar esta idoneidad de una formulación es someter una muestra de la formulación a al menos uno, por ejemplo, uno, tres, cinco, siete y hasta diez ciclos de congelación y descongelación (por ejemplo, mediante congelación a aproximadamente -80 °C ± 10 °C durante la noche y descongelación rápida a temperatura ambiente o descongelación lenta en hielo, por ejemplo durante 6 horas), determinar la cantidad de especies de bajo peso molecular/cortadas (LMW) y/o especies de alto peso molecular/agregadas (HMW) que se acumulan después de los ciclos de congelación-descongelación y compararla con la cantidad de especies de LMW o especies de HMW presentes en la muestra antes del procedimiento de congelación-descongelación. Un aumento en las especies de LMW o HMW indica una disminución de la estabilidad de una proteína almacenada como parte de la formulación. Puede usarse cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-HPLC) para determinar la presencia de especies de LMW y HMW.

- Preferiblemente, las formulaciones de proteína pueden almacenarse como un líquido. Por consiguiente, como se describe en el presente documento, es deseable que la formulación líquida sea estable en tales condiciones, incluido a varias temperaturas. Por ejemplo, un método para determinar la idoneidad de una formulación es almacenar la formulación de muestra a varias temperaturas (tal como 2-8 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C y 50 °C) y monitorizar la cantidad de especies de HMW y/o LMW que se acumulan con el tiempo. Cuanto más pequeñas son las cantidades de especies de HMW y/o LMW que se acumulan con el tiempo, mejor es la condición de almacenamiento para la formulación. Adicionalmente, el perfil de carga de la proteína puede monitorizarse mediante cromatografía de líquidos de alto rendimiento de intercambio catiónico (CEX-HPLC). Alternativamente, las formulaciones pueden almacenarse después de la liofilización. Además, es deseable que la formulación sea estable en condiciones de tensión de cizallamiento. Un método para determinar la idoneidad de una formulación es sacudir la formulación en un recipiente en un agitador, por ejemplo un agitador vertical, a una temperatura deseada (tal como 2-8 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 35 °C, 40 °C y 50 °C, preferiblemente +5 °C ± 3 °C). El recipiente (por ejemplo, un vial) puede almacenarse en un agitador durante un período de tiempo deseado, por ejemplo, hasta 14 días o más, frente a un control que se almacena sin agitar a la misma temperatura. La recogida de puntos de datos puede llevarse a cabo, por ejemplo, después de 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 14 días. La cantidad de especies de bajo peso molecular (LMW) y/o especies de alto peso molecular (HMW) que se acumulan después del almacenamiento con agitación puede determinarse y compararse con la cantidad de especies de LMW o especies de HMW presentes en la muestra sin agitar. Un aumento en las especies de LMW o HMW indica una disminución de la estabilidad de una proteína almacenada como parte de la formulación. Puede usarse cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-HPLC) para determinar la presencia de especies de LMW y HMW.
- En algunos casos, una formulación se seca por pulverización y luego se almacena. Para el secado por pulverización, una formulación líquida se aerosoliza en presencia de una corriente de gas seco. El agua se elimina de las gotitas de formulación en la corriente de gas, dando como resultado partículas secas de la formulación de fármaco. Pueden incluirse excipientes en la formulación para (i) proteger la proteína durante la deshidratación por secado por pulverización, (ii) proteger la proteína durante el almacenamiento después del secado por pulverización, y/o (iii) proporcionar las propiedades de la solución adecuadas para la aerosolización. El método es similar al descrito anteriormente para la congelación, excepto que la formulación de muestra se seca por pulverización en lugar de congelarse, se reconstituye en un diluyente, y la formulación reconstituida se somete a prueba para detectar la presencia de especies de LMW y/o especies de HMW. Un aumento en las especies de LMW o HMW en la muestra secada por pulverización en comparación con una formulación de muestra correspondiente que no se liofilizó indica una disminución de la estabilidad en la muestra secada por pulverización.
- El término "liofilizado" o "secado por congelación" incluye un estado de una sustancia que se ha sometido a un procedimiento de secado tal como liofilización, donde al menos el 90 %, preferiblemente el 95 %, lo más preferiblemente el 98 % de la humedad se ha eliminado. Por consiguiente, el término "liofilización", como se usa en el presente documento, se refiere a un proceso mediante el cual el material que va a secarse se congela en primer lugar seguido de la eliminación del hielo o disolvente congelado por sublimación en un entorno de vacío. Un excipiente (por ejemplo, lioprotector) puede incluirse en formulaciones que van a liofilizarse para mejorar la estabilidad del producto liofilizado tras el almacenamiento. El término "formulación reconstituida", como se usa en el presente documento, se refiere a una formulación que se ha preparado disolviendo una formulación de proteína liofilizada en un diluyente de modo que el compuesto que neutraliza GM-CSF se disperse en el diluyente.
- El término "diluyente", como se usa en el presente documento, es una sustancia que es farmacéuticamente aceptable (segura y no tóxica para la administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación líquida, tal como una formulación reconstituida después de la liofilización. Los ejemplos no limitativos de diluyentes incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una disolución de pH tamponado (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, disolución de Ringer, disolución de dextrosa o disoluciones acuosas de sales y/o tampones.
- En otro aspecto de la invención, la formulación se prevé para su uso en terapia. Por consiguiente, la invención prevé una composición farmacéutica (o medicamento) que comprende la formulación descrita en el presente documento.
- También se da a conocer en el presente documento, pero no forma parte de la invención, un método para tratar a un sujeto que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación descrita en el presente documento, en el que el sujeto tiene una enfermedad o trastorno que puede tratarse beneficiosamente con un compuesto que neutraliza GM-CSF.
- Preferiblemente, la formulación descrita en el presente documento se aplica en la profilaxis y/o el tratamiento de una enfermedad que puede prevenirse y/o tratarse y/o mejorarse con compuestos que neutralizan GM-CSF.
- El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos. Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, por ejemplo, seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales no humanos transgénicos. En realizaciones preferidas de la invención, el sujeto es un ser humano.

El término "dosis eficaz" o "dosificación eficaz" se define como una cantidad suficiente para lograr o al menos lograr parcialmente el efecto deseado. El término "dosis terapéuticamente eficaz" se define como una cantidad suficiente para curar o al menos detener parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad de la afección médica y el estado general del propio sistema inmunitario del sujeto. El término "paciente" incluye sujetos humanos y otros mamíferos que reciben tratamiento profiláctico o terapéutico.

La dosificación apropiada, o cantidad terapéuticamente eficaz, de la formulación dependerá de la afección que va a tratarse, la gravedad de la afección antes de la terapia, y el historial clínico del paciente y la respuesta al agente terapéutico. La dosis apropiada puede ajustarse según el criterio del médico encargado de modo que pueda administrarse al paciente una vez o durante una serie de administraciones. La composición farmacéutica puede administrarse como un único agente terapéutico o en combinación con terapias adicionales según sea necesario.

Las composiciones farmacéuticas de esta invención son particularmente útiles para la administración parenteral, es decir, por vía subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular y/o intrasinovial, en donde se prefiere la administración subcutánea. La administración parenteral puede llevarse a cabo mediante inyección en bolo o infusión continua.

Las composiciones farmacéuticas para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multidosis, con un conservante añadido. Además, se han desarrollado varios enfoques de administración de fármacos recientes y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son adecuadas para la administración usando estos nuevos métodos, por ejemplo, Inject-ease, Genject, plumas inyectoras tales como Genen, y dispositivos sin aguja tales como MediJector y BioJector. La presente composición farmacéutica también puede adaptarse para métodos de administración aún por descubrir. Véase también Langer, 1990, Science, 249: 1527-1533.

Las composiciones farmacéuticas liofilizadas pueden presentarse preferiblemente en un vial que contiene el principio activo. En una realización, las composiciones farmacéuticas comprenden adicionalmente una disolución para la reconstrucción.

La composición farmacéutica puede comprender además componentes farmacéuticamente aceptables adicionales. Otros portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16<sup>a</sup> edición, Osol, A. Ed. (1980) también pueden incluirse en una formulación de proteína descrita en el presente documento, siempre que no afecten negativamente a las características deseadas de la formulación. Como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" significa todos y cada uno de los disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, compatibles con la administración farmacéutica. El uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas se conoce bien en la técnica. Portadores, excipientes o estabilizadores aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen: modificadores de la tonicidad; agentes tamponantes adicionales; conservantes; codisolventes; antioxidantes, incluidos ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables, tales como poliésteres; contraíones formadores de sales, tales como sodio, alcoholes de azúcar polihidroxilados; aminoácidos, tales como alanina, glicina, asparagina, 2-fenilalanina y treonina; azúcares o alcoholes de azúcar, tales como lactitol, estaquiosa, manosa, sorbosa, xilosa, ribosa, ribitol, mioinositosa, mioinisolit, galactitol, glicerol, ciclitolos (por ejemplo, inositol), polietilenglicol; agentes reductores que contienen azufre, tales como glutatión, ácido tióctico, tioglicolato de sodio, tioglicerol, [alfa]-monotioglicerol y tiosulfato de sodio; proteínas de bajo peso molecular, tal como albúmina sérica humana, seroalbúmina bovina, gelatina u otras inmunoglobulinas; y polímeros hidrofílicos, tales como polivinilpirrolidona.

Las formulaciones descritas en el presente documento son útiles como composiciones farmacéuticas en el tratamiento y/o la prevención y/o la mejora de una enfermedad o trastorno en un paciente que lo necesita. El término "tratamiento" se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. El tratamiento incluye la aplicación o administración de la formulación al cuerpo, un tejido aislado o una célula de un paciente que tiene una enfermedad/trastorno, un síntoma de una enfermedad/trastorno, o una predisposición hacia una enfermedad/trastorno, con el propósito de curar, sanar, aliviar, mitigar, alterar, remediar, paliar, mejorar o afectar a la enfermedad, el síntoma de la enfermedad o la predisposición hacia la enfermedad.

Aquellos "que necesitan tratamiento" incluyen aquellos que ya tienen el trastorno, así como aquellos en los que debe prevenirse el trastorno. El término "trastorno" es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con la formulación de proteína descrita en el presente documento. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluidas aquellas afecciones patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitativos de trastornos que van a tratarse en el presente documento incluyen trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, incluidos preferiblemente trastornos alérgicos y psoriásicos, así como trastornos artríticos y asmáticos, por ejemplo, artritis, artritis reumatoide (AR), encefalitis autoinmunitaria, psoriasis, esclerosis múltiple, enfermedad pulmonar tal como asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA); enfermedad de Crohn, fibrosis pulmonar idiopática (FPI), enfermedad inflamatoria del

intestino (EI), uveítis, degeneración macular, colitis, degeneración Walleriana, síndrome antifosfolipídico (APS), síndrome coronario agudo, restinosis, aterosclerosis, policondritis recurrente (RP), hepatitis aguda o crónica, implantes ortopédicos fallidos, glomerulonefritis, lupus, dermatitis atópica y dolor inflamatorio, artrítico y osteoartrítico.

- 5 Un trastorno alérgico es cualquier trastorno provocado por una alergia o una reacción alérgica. Una alergia es un trastorno de hipersensibilidad del sistema inmunitario. Se produce cuando el sistema inmunitario de una persona reacciona o reacciona en exceso a sustancias extrañas normalmente inofensivas (alérgenos), tales como alimentos, polen, mohos, polvo doméstico, caspa animal, ácaros del polvo.
- 10 La psoriasis es una enfermedad autoinmunitaria que afecta principalmente a la piel. El ciclo de crecimiento de las células de la piel se acelera debido a las señales erróneas enviadas por el sistema inmunitario. Hay cinco tipos de psoriasis: en placas, en gotas, inversa, pustulosa y eritrodémica. La forma más común, psoriasis en placas, comúnmente se observa como tonalidades rojas y blancas de parches escamosos que aparecen en la primera capa superior de la epidermis (piel). Algunos pacientes, sin embargo, no tienen signos o síntomas dermatológicos. El trastorno es una afección recurrente crónica cuya gravedad varía desde parches localizados menores hasta una cobertura corporal completa. Las uñas de los dedos de las manos y de los pies se ven afectadas con frecuencia (distrofia psoriásica de las uñas) y pueden verse como un signo aislado. La psoriasis también puede provocar inflamación de las articulaciones, que se conoce como artritis psoriásica.
- 15
- 20 La artritis es una forma de trastorno articular que implica inflamación de una o más articulaciones. Hay más de 100 formas diferentes de artritis. La forma más común, osteoartritis (enfermedad articular degenerativa), es el resultado de traumatismo en la articulación, infección de la articulación o la edad. Otras formas de artritis son artritis reumatoide, artritis psoriásica y otras enfermedades autoinmunitarias relacionadas. La artritis séptica está provocada por una infección articular.
- 25
- 30 El asma es un trastorno inflamatorio crónico común de las vías respiratorias en el que muchas células y elementos celulares desempeñan un papel. El asma está asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias que conduce a episodios recurrentes de sibilancias, tos, opresión torácica y dificultad para respirar. Estos episodios habitualmente se asocian con una obstrucción generalizada pero variable del flujo de aire dentro del pulmón que a menudo es reversible, ya sea espontáneamente o con tratamiento. El asma puede clasificarse según la frecuencia de los síntomas, el volumen espiratorio forzado en un segundo y velocidad máxima de flujo espiratorio. El asma también puede clasificarse como atópica (extrínseca) o no atópica (intrínseca).
- 35
- 40 Además de los compuestos que neutralizan GM-CSF, la composición farmacéutica de la invención puede comprender agentes terapéuticos o biológicamente activos adicionales. Por ejemplo, factores terapéuticos útiles en el tratamiento de una indicación particular tal como osteoartritis (por ejemplo, uno o más inhibidores que están implicados en la destrucción del cartílago articular o componentes sinoviales seleccionados de, pero sin limitarse a, anti-metaloproteínasas, compuestos de ciclina, antagonistas de citocinas, corticosteroides, inhibidores de TNF, inhibidores de IL, sustancias antiangiogénicas, inhibidores de aggrecanasa, inhibidores de p38 cinasa, inhibidores de la apoptosis, inhibidores de hialuronidasa e inhibidores de enzimas proteolíticas). Factores que controlan la inflamación, incluidos infliximab, etanercept, adalimumab, nerelimonmab, lenercept y similares, o combinaciones de los mismos, también pueden ser parte de la composición. También se prevé que la composición farmacéutica pueda incluir componentes de la matriz extracelular tales como ácido hialurónico o un derivado del mismo incluidos sales, éster, éster interno y derivados sulfatados, preferiblemente éster parcial de ácido hialurónico.
- 45
- 50 En otra realización, la presente invención se refiere a un kit (o artículo de fabricación) o recipiente, que contiene una formulación de la invención. La formulación puede estar preferiblemente ya en un estado líquido. Sin embargo, alternativamente, puede estar preferiblemente en un estado liofilizado. También puede estar en un estado congelado, liofilizado, secado por congelación o secado por pulverización. Por consiguiente, si la formulación está en un estado distinto del líquido, el profesional puede prepararla como una composición farmacéutica acuosa (líquida). Por ejemplo, la formulación puede liofilizarse y luego tendría que reconstituirse. Por consiguiente, el kit puede comprender además medios para la reconstitución de una formulación congelada, liofilizada, secada por congelación o secada por pulverización y/o medios para diluir la formulación y/o medios para administrar la formulación o composición farmacéutica, respectivamente, tales como una jeringa, bomba, infusor, aguja o similar. El kit puede comprender uno o más viales que contienen la formulación de la invención. El kit también puede ir acompañado de instrucciones de uso.
- 55
- 60 Por lo tanto, se proporciona un artículo de fabricación que contiene una formulación descrita en el presente documento y preferiblemente proporciona instrucciones para su uso. El artículo de fabricación comprende un recipiente adecuado para contener la formulación. Los recipientes adecuados incluyen, sin limitación, botellas, viales (por ejemplo, viales de doble cámara), jeringas (por ejemplo, jeringas de cámara simple o doble), tubos de ensayo, nebulizadores, inhaladores (por ejemplo, inhaladores de dosis medida o inhaladores de polvo seco) o depósitos. El recipiente puede formarse a partir de una variedad de materiales, tales como vidrio, metal o plástico (por ejemplo, policarbonato, poliestireno, polipropileno, polioleína). El recipiente contiene la formulación, y la etiqueta en, o asociada con, el recipiente puede indicar instrucciones para reconstitución y/o uso. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o está destinada a la administración subcutánea. El recipiente que contiene la formulación puede

- ser un vial de múltiples usos, lo que permite administraciones repetidas (por ejemplo, de 2-6 administraciones) de la formulación. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuado (por ejemplo, WFI, NaCl al 0,9 %, BWFI, solución salina tamponada con fosfato). Cuando el artículo de fabricación comprende una versión liofilizada de un compuesto que neutraliza la formulación de GM-CSF, el mezclado de un diluyente con la formulación liofilizada proporcionará una concentración de proteína final deseada en la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde el punto de vista comercial y del usuario, incluidos otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas y prospectos con instrucciones de uso.
- 5
- 10 También se incluyen en la invención dispositivos que pueden usarse para administrar la formulación de la invención. Los ejemplos de tales dispositivos incluyen, pero no se limitan a, una jeringa, por ejemplo, una jeringa precargada, una pluma, un implante, un dispositivo de inyección sin aguja, un dispositivo de inhalación y un parche.
- 15 Las composiciones de la invención son estables frente a múltiples aspectos incluidos el estrés interfacial resultante de su uso en, por ejemplo, una jeringa precargada de vidrio y un cartucho. Se ha determinado que formulaciones de caucho, silicona, tungsteno y agentes de curado interactúan negativamente con las disoluciones de proteínas formando agregados, partículas subvisibles y visibles. Las formulaciones de proteína de la presente invención son compatibles con los componentes en el sistema de jeringa precargada/cartucho, incluido su sistema de cierre.
- 20
- 20 La invención se ilustra adicionalmente mediante las figuras y los ejemplos que son meramente ilustrativos y no deben interpretarse como una limitación del alcance de la presente invención.

#### Breve descripción de los dibujos

- 25 Figura 1: Efecto del tiempo de almacenamiento, temperatura de almacenamiento y concentración de proteína sobre el nivel de monómero del anticuerpo anti-GM-CSF.
- Figura 2: Diagrama de Pareto del efecto estandarizado con la osmolalidad [mOsmol/kg] como variable.
- 30 Figura 3: Formación de partículas de 2-10  $\mu\text{m}$  en formulaciones de anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml, sorbitol al 5 %, histidina 30 mM y cantidades variables de Tween 20.
- Figura 4: Formación de partículas de 2-10  $\mu\text{m}$  en formulaciones de anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml, sorbitol al 5 %, histidina 30 mM y cantidades variables de Tween 80.
- 35 Figura 5: Formación de partículas de 2-10  $\mu\text{m}$  en formulaciones de anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml, sorbitol al 5 %, histidina 30 mM y cantidades variables de Tween 20.
- Figura 6: Figura 1. Formación de partículas de 2-10  $\mu\text{m}$  en formulaciones de anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml, sorbitol al 5 %, histidina 30 mM y cantidades variables de Tween 80.
- 40 Figura 7: Curva de tensión superficial representativa del anticuerpo anti-GM-CSF y el tensioactivo.
- Figura 8: Crecimiento de la concentración de partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$  en función del número de ciclos de congelación/descongelación a anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml en histidina 30 mM, sorbitol al 5 % con concentraciones variables de Tween 20 o Tween 80.
- 45 Figura 9: Crecimiento de la concentración de partículas de  $\geq 10 \mu\text{m}$  en función del número de ciclos de congelación/descongelación a anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml en histidina 30 mM, sorbitol al 5 % con concentraciones variables de Tween 20 o Tween 80.
- 50

Los siguientes ejemplos ilustrarán la presente invención.

#### Ejemplo 1: Material

- 55 Los siguientes ejemplos se llevaron a cabo con un anticuerpo IgG1 monoclonal humano (en lo sucesivo denominado "el anticuerpo") que se une a y neutraliza con alta afinidad y especificidad GM-CSF humano y que se describe en el documento WO 2006/111353. Su generación se describe en el ejemplo 2 del documento WO 2006/111353. Más específicamente, el anticuerpo comprende las secuencias de CDR de cadena ligera y cadena pesada como se representan en las SEQ ID NO: 16, 17, 18, 14, 15 y 2. Estas secuencias de CDR están comprendidas en el dominio variable de cadena pesada y ligera, respectivamente, que se muestran en la SEQ ID NO: 34 y 35, respectivamente. GM-CSF se sobreproduce de manera aberrante en una multitud de enfermedades humanas proinflamatorias y autoinmunitarias, y se encontró que la adición de GM-CSF recombinante agravaba tales enfermedades. Las posibles indicaciones de enfermedad para el tratamiento con un anticuerpo neutralizante de GM-CSF incluyen artritis reumatoide (AR), asma y otras formas de inflamación pulmonar, esclerosis múltiple (EM) y psoriasis.

El anticuerpo se produjo en un biorreactor usando medio libre de suero y proteína. El inóculo para el fermentador de producción se preparó a partir de un único vial del clon productor de anticuerpos. Tras la finalización del proceso de fermentación, se procesa la cosecha que contiene el anticuerpo secretado por filtración para separar las células y los residuos del sobrenadante. La purificación de la cosecha se basa en enfoques cromatográficos comunes para reducir las HCP, ADN y posibles virus. Una etapa integral de inactivación del virus fue una parte adicional del proceso posterior. Para la formulación, se realizó una etapa de concentración e intercambio de tampón.

**Ejemplo 2: Métodos de ensayo**

Se estableció cromatografía de líquidos de alto rendimiento de exclusión por tamaño (SE-HPLC) para determinar el grado de agregación del anticuerpo (HPLC: Agilent 1100 Chemstation; columna: Tosoh Biosep TSKgel G4000SWXL). El método de SE-HPLC se cualificó realizando una prueba de intervalo de nueve puntos, a partir de los cuales se determinaron y se sometieron a prueba la precisión (seis inyecciones replicadas) y la linealidad (curvas patrón por triplicado). Todos los ensayos se realizaron usando  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  100 mM,  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  200 mM, pH 6,6 como tampón de migración.

Se estableció el método de resonancia de plasmón superficial (SPR) para determinar el grado de actividad de unión del anticuerpo a GM-CSF inmovilizado (Biacore 3000 / chip sensor CM5 / tampón de migración HBS-EP). El método de SPR se cualificó realizando una prueba de intervalo de nueve puntos, a partir de los cuales se determinaron y se sometieron a prueba la precisión (seis inyecciones replicadas) y la linealidad (curvas patrón por triplicado).

Se realizó SDS-PAGE reductora y no reductora para la detección de productos de degradación (fragmentos) y agregados del anticuerpo.

Se realizó obtención de imágenes de microflujo (MFI, Brightwell, Ottawa, CA) para cuantificar la cantidad de partículas subvisibles intrínsecas y extrínsecas en disolución para partículas de aproximadamente 2 a 100  $\mu\text{m}$  de tamaño.

Se realizó cromatografía de intercambio catiónico (CEX) para evaluar las isoformas cargadas usando una columna WCX-10 y un gradiente de pH en tampón de migración de TRIS/imidazol/piperazina. Las isoformas ácidas eluyen antes de la isoforma principal y las isoformas básicas eluyen después de la isoforma principal.

Se sometió a prueba la fuerza de deslizamiento de la jeringa usando un sistema de prueba de compresión universal Instron® equipado con adaptadores para sostener jeringas.

**Ejemplo 3: Efecto de pH y estrés por temperatura**

Se realizó un estudio para evaluar la estabilidad del anticuerpo en tampón de cribado de baja fuerza iónica (LISSB: glicina 2 mM, ácido cítrico 2 mM, HEPES 2 mM, MES 2 mM y Tris 2 mM) a valores de pH que varían desde 3 hasta 10. Las muestras de anticuerpos se almacenaron en las disoluciones respectivas a 55 °C durante un período de 14 días. En T0, T7 y T14 (días), se analizaron las muestras. El análisis de SPR indica que el anticuerpo es más estable a pH 4-7. Cuando se analizó por SE-HPLC, se encontró que el monómero de anticuerpo era más estable a pH 4-6 (T14). Tanto la SDS-PAGE no reductora como la reductora de las muestras de T14 muestran solo una formación mínima de productos de degradación y agregados a pH 4-6.

**Ejemplo 4: Efecto de fuerza iónica y estrés por temperatura**

Se realizó un estudio para evaluar la estabilidad del anticuerpo en tampón de cribado de baja fuerza iónica (LISSB) en presencia de NaCl 0, 10, 100 y 500 mM. Las muestras de anticuerpos se dializaron en disoluciones de LISSB (pH 4,5 y pH 7,5) con NaCl adicional a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml y se almacenaron a 55 °C durante un período de 14 días. En T0, T7 y T14 (días), se analizaron por las muestras por SE-HPLC y SPR.

Los estudios de HPLC y SPR indican que la adición de sal deteriora la estabilidad del anticuerpo y que el efecto es más pronunciado a pH 4,5 que a pH 7,5. Además, los datos de SE-HPLC muestran que la desestabilización del anticuerpo con concentraciones elevadas de sal ( $\geq 100$  mM) a pH 4,5 da como resultado principalmente la acumulación de agregados del anticuerpo. A pH 7,5, la desestabilización del anticuerpo con concentraciones elevadas de sal (500 mM) da como resultado principalmente la acumulación de productos de degradación del anticuerpo. En LISSB pH 4,5; NaCl 500 mM, el nivel de precipitación (T7 y T14) del anticuerpo fue muy alto.

**Ejemplo 5: Efecto de tampones**

Se realizó un estudio para evaluar la estabilidad del anticuerpo en diversos tampones pH 5-7. Las muestras de anticuerpos se dializaron en disoluciones de tampón citrato 20 mM pH 5, 6 y 7; tampón fosfato 20 mM pH 6 y pH 7; tampón succinato 20 mM pH 6 y pH 7, tampón histidina 20 mM pH 6 y pH 7; y tampón acetato 20 mM pH 5 y pH 6 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml y se almacenaron a 55 °C durante un período de 14 días. En T0, T7 y T14 (días), se analizaron las muestras por SE-HPLC, SPR y SDS-PAGE reductora y no reductora.

El estudio de SPR, los datos de monómeros y agregados de HPLC y la SDS-PAGE reductora y no reductora indican que el anticuerpo es más estable en tampón acetato pH 5, tampón histidina pH 6 y tampón citrato pH 5, 6 y 7 (datos de T14).

5

**Ejemplo 6: Efecto de aminoácidos**

Se realizó un estudio para evaluar la estabilidad del anticuerpo en tampón de cribado de baja fuerza iónica (LISSB) con la adición de diferentes aminoácidos. Las muestras de anticuerpos se almacenaron en la disolución a pH 6 con 250 mM del aminoácido respectivo a 55 °C durante un período de 14 días. En T0, T7 y T14 (días), se analizaron las muestras. El estudio de SPR indica un ligero efecto estabilizante especialmente de ácido glutámico, treonina, lisina y valina (T14). Los datos de HPLC indican un efecto estabilizante y significativo de ácido glutámico, treonina y alanina dando como resultado aproximadamente un 2-3 % más de monómero intacto y aproximadamente un 30 %, 31 % y 20 % menos de agregados, respectivamente, en comparación con la referencia sin ningún aminoácido añadido.

15

**Ejemplo 7: Efecto de azúcares y tensioactivos**

Se realizó un estudio para evaluar la estabilidad del anticuerpo en tampón de cribado de baja fuerza iónica (LISSB) con la adición de diversos azúcares o tensioactivos. Las muestras de anticuerpos se dializaron en disoluciones de LISSB pH 6,0 hasta una concentración de aproximadamente 1 mg/ml con un 6 % (p/v) adicional de azúcares (D-manitol, D-sorbitol, sacarosa, D-manosa, D-maltosa, D-trehalosa, D-glucosa), Tween 20 al 0,05 % (v/v) o Tween 80 al 0,02 % (v/v), y se almacenaron a 55 °C durante un período de 14 días. En T0, T7 y T14 (días), se analizaron las muestras por SE-HPLC, SPR y SDS-PAGE reductora y no reductora.

25 Los estudios de SPR y HPLC indican que D-sorbitol y D-manitol mejoran la estabilidad del anticuerpo en aproximadamente un 20 %/3 % (datos de SPR/HPLC, T14) y 14 %/4 % (datos de SPR/HPLC, T14), respectivamente. La trehalosa y la sacarosa tienen ambas efectos reducidos en un 7 %/0,7 % (datos de SPR/HPLC, T14) y 6 %/2 % (datos de SPR/HPLC, T14), respectivamente. Además, los datos de HPLC indican que D-sorbitol y D-manitol reducen la formación de los agregados de anticuerpos en un 43 % y 50 %, respectivamente, los que también está respaldado por datos obtenidos por SDS-PAGE. Ni Tween 20 al 0,05 % (v/v) ni Tween 80 al 0,02 % (v/v) parecían tener un efecto sobre la estabilidad medido por SE-HPLC, SPR y SDS-PAGE.

30 **Ejemplo 8: Efecto de combinaciones de tampones, aminoácidos y azúcares**

35 Basándose en estudios previos, se realizó un estudio para evaluar la estabilidad de 1 mg/ml del anticuerpo formulado en combinaciones de tampones, aminoácidos y azúcares. Estudios previos indicaron efectos estabilizadores de: acetato 20 mM pH 5; histidina 20 mM pH 6; ácido glutámico 250 mM; treonina 250 mM, sorbitol al 6 % (p/v) y manitol al 6 % (p/v). El anticuerpo se formuló a una concentración de 5,4 mg/ml en disoluciones de combinaciones de tampón 20 mM, aminoácido 250 mM y azúcar al 6 % (v/v) como se indica en la tabla 1, y se almacenó a 55 °C durante un período de 14 días. Se incluyó anticuerpo en 1xPBS como control. En T0, T7 y T14 (días), se analizaron las muestras por SE-HPLC y SPR.

40 Adicionalmente, se sometieron a prueba muestras de T0 que comprendían el anticuerpo (5,4 mg/ml) en 1xPBS para determinar la susceptibilidad a la congelación y descongelación. Los viales de almacenamiento se congelaron lentamente a -20 °C en el congelador. Después de que se completara la congelación, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. Este proceso se repitió hasta que se completaron cinco ciclos de congelación-descongelación. Cada muestra se examinó para determinar la recuperación por SPR y SE-HPLC después de dos y cinco ciclos.

45 50 Tabla 1: Combinación de tampones, azúcares y aminoácidos (Ac = tampón acetato; His = tampón histidina; M = manitol; S = sorbitol)

Muestra		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
Tampón	<b>Ac</b>	X	X			X	X			X	X	X	X					
	<b>His</b>			X	X			X	X					X	X	X	X	
Amino-ácido	<b>Glu</b>	X		X						X	X			X	X			
	<b>Thr</b>		X		X							X	X			X	X	
Azúcar	<b>M</b>					X		X		X		X		X		X		
	<b>S</b>						X		X		X		X		X		X	

Los datos de SPR muestran que las actividades de unión en las muestras 5-16 a T14/55 °C son > 93 % en relación con T0. Para el anticuerpo en 1xPBS (muestra 17) y muestras 1-4 (todas sin manitol o sorbitol), los números son el 62 %, 19 %, 26 %, 91 % y 85 %, respectivamente. Por lo tanto, los datos de SPR indican que la adición de manitol o sorbitol mejora la estabilidad de la actividad de unión. Además, las muestras 1-4 aparecieron amarillentas a T7 y T14, lo que indica oxidación. Los datos de SE-HPLC muestran que los niveles más bajos de agregados (3,5 % - 5,6 %) y productos de degradación (4,2% - 5,4%) se encuentran en las muestras 5-8, 11-12 y 15-16 (datos de T14/55 °C), respaldando el efecto estabilizador del manitol y el sorbitol sobre el monómero de anticuerpo e indicando un posible efecto menor de la adición de treonina 250 mM. Sin embargo, el efecto de la treonina es al menos solo mínimo determinado por los niveles de monómero encontrados en las muestras 5-8, 11-12 y 15-16 (91,2 %, 89,8 %, 91,5 %, 90,8 %, 89,8 %, 89,0 %, 91,4 % y 90,9 %, respectivamente), para la muestra 17 (PBS) el número es el 80,3% (datos de T14/55 °C). Ácido glutámico 250 mM junto con sorbitol o manitol tiene un efecto negativo sobre la estabilidad del monómero de anticuerpo, especialmente en tampón acetato. En conclusión, el monómero de anticuerpo parece ser más estable en la combinación de tampón acetato 20 mM pH 5 o tampón histidina 20 mM pH 6 y sorbitol al 6 % (p/v) o manitol al 6 % (p/v).

Los datos de SE-HPLC de los experimentos de congelación/descongelación indican un efecto superior menor de sorbitol sobre manitol en la estabilización del monómero de anticuerpo. En las muestras 6 y 8, el contenido de monómero es del 98,6 % y el 98,4 %, respectivamente, después de 5 rondas de congelación/descongelación en comparación con el contenido de monómero en las muestras 5 y 7 del 96,9 % y el 96,0%.

**Ejemplo 9: Efecto de combinaciones de tampones histidina o acetato, sorbitol o manitol, y Tween 20 o Tween 80**

Basándose en los datos de estabilidad de los estudios previos (que muestran un efecto estabilizante en particular de acetato 20 mM pH 5, histidina 20 mM pH 6, sorbitol al 6 % (p/v) y manitol al 6 % (p/v)), se realizó un nuevo estudio para evaluar la estabilidad de 10 mg/ml del anticuerpo formulado en combinaciones de tampones histidina o acetato, sorbitol o manitol, y Tween 20 o Tween 80. Debido a las concentraciones del anticuerpo a 10 mg/ml, también se sometió a prueba la adición de Tween 20 al 0,02% (p/v) y Tween 80 al 0,02 % (p/v) para determinar su efecto sobre la agregación tal como se midió por SE-HPLC.

El anticuerpo se formuló a una concentración de 10 mg/ml en disoluciones de tampón acetato 20 mM pH 5,0 o tampón histidina 20 mM pH 6,0 y con los aditivos indicados en la tabla 2, y se almacenaron a 55 °C durante un período de 14 días. En T0, T7 y T14 (días), se analizaron las muestras por SE-HPLC y SPR.

Adicionalmente, se sometieron a prueba muestras de anticuerpos para determinar la susceptibilidad a la congelación y descongelación. El anticuerpo se congeló lentamente en una concentración de 10 mg/ml a -20 °C en el congelador. Después de que se completara la congelación, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente. Este proceso se repitió hasta que se habían completado tres y/o cinco ciclos de congelación y descongelación. Cada muestra se examinó para determinar la recuperación por SPR y SE-HPLC después de tres y/o cinco ciclos de congelación y descongelación.

Tabla 2: Combinación de tampones, azúcares y detergentes (Ac = tampón acetato; His = tampón histidina; M = manitol; S = sorbitol; T20 = Tween 20; T80 = Tween 80)

1 x PBS

Muestra		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Pampon	Ac	X	X			X	X	X	X				
	His			X	X					X	X	X	X
Azucar	M		X		X			X	X			X	X
	S	X		X		X	X			X	X		
Detergente	T20					X		X		X		X	
	T80						X		X		X		X

5 Los datos de HPLC mostraron que, aunque hubo diferencias menores entre acetato e histidina, la histidina parece al menos tan buena como el acetato. Después de 1 semana, las formulaciones que contienen acetato, sorbitol y tween 80, e histidina, sorbitol y tween 20 tuvieron una degradación similar en comparación con las formulaciones correspondientes sin tensioactivo.

10 Los experimentos de congelación y descongelación indican que no hay al menos ningún efecto de los detergentes sobre el nivel de monómero de anticuerpo después de cinco rondas de congelación y descongelación. Sin embargo, el monómero de anticuerpo es más estable cuando se añade sorbitol al 6 % (p/v) a la formulación en comparación con manitol al 6 % (p/v). Con manitol añadido, el monómero de anticuerpo se agrega en mayor grado después de cinco rondas de congelación y descongelación. Los datos de HPLC del experimento de congelación y descongelación no muestran diferencias entre el uso de acetato e histidina.

15 En conclusión, una preformulación que contiene histidina 20 mM, pH 6,0 y sorbitol al 6 % (p/v) parece óptima para la estabilidad del monómero de anticuerpo según se somete a ensayo por HPLC.

20 **Ejemplo 10: Evaluación de la estabilidad a corto plazo de una preformulación de histidina 20 mM, D-sorbitol al 6 % (p/v)**

Basándose en la identificación de histidina 20 mM pH 6,0 y sorbitol al 6 % (p/v) como preformulación óptima, se realizó una prueba de estabilidad a corto plazo para evaluar esta preformulación a concentraciones más altas del anticuerpo.

25 El anticuerpo se formuló en la disolución anterior a concentraciones de aproximadamente 22, 36, 42, 83 y 118 mg/ml. El anticuerpo formulado se almacenó a 5 °C y 25 °C durante un periodo de hasta 4 semanas. En T0, T14 y T28 (días), se analizaron las muestras por SE-HPLC.

30 Los datos de SE-HPLC muestran claramente que el anticuerpo es estable en histidina 20 mM pH 6,0, sorbitol al 6 % (p/v). La concentración de monómero de anticuerpo detectada después de 28 días de almacenamiento a 5 °C o 25 °C siempre fue superior al 97 %, con la excepción de la concentración de anticuerpo más alta sometida a prueba (118 mg/ml) a 25 °C, donde la concentración de monómero de anticuerpo fue de aproximadamente el 96,5 %. Los resultados se muestran en la figura 1.

35 **Ejemplo 11: Ajuste fino de excipientes finales**

40 Basándose en los datos generados en los experimentos anteriores, se han elegido sorbitol e histidina para estabilizar el anticuerpo. En la siguiente etapa, se ajustaron de manera fina la cantidad de excipientes, así como el valor de pH, para concentraciones de anticuerpos de entre 10 y 100 mg/ml usando "diseño del experimento" (*Design of Experiment, DOE*), incluyendo 3 puntos centrales y dando como resultado 30 ejecuciones individuales. El plan experimental aleatorizado se llevó a cabo con los siguientes parámetros:

Anticuerpo: 10 - 55 - 100 mg/ml

pH: 5-6-7

45

Histidina: 10 - 30 - 50 mM

Sorbitol: 2 - 6 - 10 % (p/v)

Para permitir una evaluación a corto plazo, las muestras se sometieron a estrés en condiciones aceleradas de 50 °C durante 14 días. Además, se realizaron tres ciclos de congelación y descongelación (-20 °C) para imitar el almacenamiento del anticuerpo.

5 **Resultados:**

Se determinó la osmolalidad para garantizar las condiciones fisiológicas para la formulación. Para una aplicación i.v. o s.c. del anticuerpo, una osmolalidad de entre 250 y 450 mOsmol/kg es un intervalo aceptable. Como se muestra en la figura 2, la osmolalidad está controlada principalmente por la cantidad de sorbitol en la formulación. Tanto la histidina en bajas concentraciones (10-50 mM) como el propio anticuerpo tienen solo efectos mínimos sobre la osmolalidad.

10 La dependencia de la osmolalidad de la concentración de sorbitol e histidina puede representarse en una transferencia de contorno. Esta transferencia muestra que, para mantener la osmolalidad en el intervalo fisiológico, es necesaria una concentración de entre el 3 % y el 7 % (p/v) de sorbitol. Los datos generados aluden a una concentración óptima de sorbitol de aproximadamente el 6 %, dando como resultado un valor de osmolalidad bastante alto. Dado que una cierta reducción de sorbitol no afecta a la estabilidad del anticuerpo, la concentración de sorbitol puede disminuirse hasta el 5 % para alcanzar una osmolalidad de aproximadamente 400 mOsmol/kg y, por lo tanto, aumentar la comodidad del paciente.

15 20 La concentración óptima de histidina se estableció en 30 mM basándose en los datos generados. En un intervalo de concentración de entre 10 mM y 50 mM de histidina, no se detectó ningún impacto sobre la agregación o fragmentación, medido por SE-HPLC.

25 30 La agregación del anticuerpo depende principalmente de la concentración. El aumento de las concentraciones de anticuerpos da como resultado un mayor nivel de agregados y valores de claridad aumentados durante la congelación/descongelación y en condiciones de estrés por temperatura acelerado. Además, el valor de pH afecta al contenido de monómero del anticuerpo. Mientras que el estrés acelerado a pH<6 conduce a una mayor fragmentación del anticuerpo, la estabilidad durante la congelación/descongelación no se ve afectada, sino que más bien se observa una estabilidad ligeramente mejor. A valores de pH de pH>6, tanto para la temperatura acelerada como para el tratamiento de congelación/descongelación, podría medirse un contenido de monómero reducido usando SE-HPLC y análisis de claridad. Para equilibrar los efectos contrarios, un pH de 5,8 parece ser el más apropiado para la formulación de anticuerpos.

35 Esto dio como resultado una formulación con los siguientes parámetros:

Anticuerpo	10 mg/ml - 55 mg/ml - 100 mg/ml
D-sorbitol	5% (p/v)
Tampón L-histidina	30 mM (clorhidrato monohidratado)
pH	5,8 (ajustado con hidróxido de sodio 2 M)

Las condiciones o parámetros de esta composición también pueden transmitirse a una composición que tiene mayores concentraciones de anticuerpos, como se mostrará en los siguientes ejemplos.

40 **Ejemplo 12: Estudios de estabilidad**

**Estudios a largo plazo**

45 El estudio se diseñó para un período de prueba de hasta 60 meses. Durante este período, las muestras de anticuerpos se almacenaron a  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  en viales de vidrio DIN R2. Además, se realizó un estudio acelerado a  $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  y un estudio de estrés a  $+40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  en viales de vidrio DIN R2 durante hasta 12 y 6 meses, respectivamente. Las pruebas se llevaron a cabo usando el anticuerpo en una concentración de 106 mg/ml y 145 mg/ml, en una formulación con monoclorhidrato de histidina 30 mM y sorbitol al 5 % (p/v) a pH 5,8.

50 55 Se midieron los siguientes parámetros: pH, osmolalidad, concentración (DO280), porcentaje de monómeros, agregados y fragmentos por SE-HPLC, potencia (ensayo basado en células). Los resultados se muestran en las siguientes tablas 3-8.

Tabla 3: Pruebas de estabilidad a  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  (anticuerpo 106 mg/ml)

Tiempo de almacenamiento	pH	Osmolalidad	Concentración (DO280)	Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC	Potencia (ensayo basado en células)

[Meses]	-	[mOsmol/kg]	[mg/ml]	M / A / F [%]			Potencia relativa (en comparación con el patrón de referencia)
0	5,83	379	106,51	99,20	0,80	0	0,83
1	5,88	379	103,00	99,18	0,82	0	1,03
3	5,90	379	108,75	99,07	0,93	0	1,23
6	5,89	376	100,05	98,87	1,13	0	0,89
9	5,83	377	102,59	99,01	0,99	0	1,00
12	5,86	387	103,34	98,97	1,03	0	1,01
18	5,87	379	102,49	98,78	1,04	0,18	0,84
24	5,85	377	101,73	98,68	1,11	0,21	1,05
30	5,81	383	102,52	98,55	1,17	0,28	0,83
36	5,84	380	107,78	98,56	1,18	0,25	1,06
42	5,92	384	96,32	98,34	1,11	0,55	1,26
48	5,90	376	94,33	98,54	1,23	0,23	1,03
54	5,86	382	107,67	98,25	1,28	0,47	1,04
60	5,90	379	106,79	98,26	1,26	0,48	0,97

Tabla 4: Pruebas de estabilidad a  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  (anticuerpo 145 mg/ml)

Tiempo de almacenamiento	pH	Osmolalidad	Concentración (DO280)	Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC	Potencia (ensayo basado en células)		
[Meses]	-	[mOsmol·kg <sup>-1</sup> ]	[mg·ml <sup>-1</sup> ]	M / A / F [%]	Potencia relativa (en comparación con el patrón de referencia)		
0	5,91	392	143,31	99,10	0,90	0	0,72
1	5,91	393	139,52	99,06	0,94	0	0,95
3	5,93	385	139,44	98,89	1,11	0	1,06
6	5,90	381	145,66	98,79	1,21	0	0,81
9	5,87	383	144,12	98,86	1,14	0	1,07
12	5,89	388	140,52	98,80	1,20	0	1,13
18	5,90	387	143,66	98,62	1,22	0,16	1,09
24	5,85	385	137,07	98,45	1,38	0,17	0,83
30	5,84	387	131,98	98,30	1,42	0,28	0,87
36	5,88	384	148,55	98,35	1,39	0,26	0,99
42	5,94	383	134,11	98,17	1,33	0,50	0,97
48	5,94	385	125,09	98,23	1,50	0,26	1,03
54	5,90	394	150,81	97,94	1,57	0,49	1,04
60	5,90	386	147,01	97,94	1,53	0,53	0,82

5 Tabla 5: Pruebas de estabilidad a  $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (anticuerpo 106 mg/ml)

Tiempo de almacenamiento	pH	Osmolalidad	Concentración (DO280)	Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC	Potencia (ensayo basado en células)		
[Meses]	-	[mOsmol·kg <sup>-1</sup> ]	[mg·ml <sup>-1</sup> ]	M / A / F [%]	Potencia relativa (en comparación con el patrón de referencia)		
0	5,83	379	106,51	99,20	0,80	0	0,83
1	5,84	385	101,35	98,77	1,06	0,17	1,20
3	5,90	382	107,36	98,15	1,44	0,42	0,92
6	5,85	387	100,14	97,85	1,51	0,64	1,00
9	5,83	374	107,49	94,71	1,49	3,80	1,10
12	5,85	383	106,27	94,71	1,56	3,73	1,30

Tabla 6: Pruebas de estabilidad a  $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (145 mg/ml de anticuerpo)

Tiempo de almacenamiento	pH	Osmolalidad	Concentración (DO280)	Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F)	Potencia (ensayo basado en células)	

[Meses]	-	[mOsmol·kg <sup>-1</sup> ]	[mg·ml <sup>-1</sup> ]	SE-HPLC			Potencia relativa (en comparación con el patrón de referencia)
				M	A	F [%]	
0	5,91	392	143,31	99,10	0,90	0	0,72
1	5,90	384	142,84	98,49	1,19	0,31	0,95
3	5,93	386	147,84	98,12	1,50	0,37	1,04
6	5,88	383	134,73	97,62	1,78	0,60	0,78
9	5,91	387	144,59	94,46	1,85	3,69	0,97
12	5,87	387	143,12	94,36	1,90	3,74	1,23

Tabla 7: Pruebas de estabilidad a +40 °C ± 2 °C (106 mg/ml de anticuerpo)

Tiempo de almacenamiento	pH	Osmolalidad	Concentración (DO280)	Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC			Potencia (ensayo basado en células)
				M	A	F [%]	
[Mes]	-	[mOsmol·kg <sup>-1</sup> ]	[mg·ml <sup>-1</sup> ]	M / A / F [%]			Potencia relativa (en comparación con el patrón de referencia)
0	5,83	379	106,51	99,20	0,80	0	0,83
1	5,88	377	102,68	94,66	1,34	3,99	1,05
3	5,89	382	108,60	91,85	2,06	6,09	1,01
6	5,85	378	99,75	87,39	2,46	10,15	0,97

5 Tabla 8: Pruebas de estabilidad a +40 °C ± 2 °C (145 mg/ml de anticuerpo)

Tiempo de almacenamiento	pH	Osmolalidad	Concentración (DO280)	Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC			Potencia (ensayo basado en células)
				M	A	F [%]	
[Mes]	-	[mOsmol·kg <sup>-1</sup> ]	[mg·ml <sup>-1</sup> ]	M / A / F [%]			Potencia relativa (en comparación con el patrón de referencia)
0	5,91	392	143,31	99,10	0,90	0	0,72
1	5,92	388	136,96	94,96	1,69	3,35	0,77
3	5,91	386	143,07	92,02	2,40	5,58	0,87
6	5,88	388	137,11	86,56	3,33	10,11	0,94

**Estudios acelerados/de estrés**

- 10 Para demostrar la comparabilidad de la sustancia farmacológica, por lo tanto, el anticuerpo, después del aumento de escala, se ha realizado un estudio de estabilidad en condiciones aceleradas (25 °C) y de estrés (40 °C) usando dos lotes de sustancia farmacológica con concentraciones de anticuerpo de 165 mg/ml y 171 mg/ml formuladas en una disolución de histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,8.
- 15 Se midieron los siguientes parámetros: pH, osmolalidad, concentración (DO280), porcentaje de monómeros, agregados y fragmentos por SE-HPLC, potencia (ensayo basado en células). Los resultados para la concentración de anticuerpos de 171 mg/ml se muestran en las siguientes tablas 9 y 10.

20 Tabla 9: Pruebas de estabilidad a +25 °C ± 2 °C (anticuerpo 171 mg/ml)

Tiempo de almacenamiento	pH	Osmolalidad	Concentración (DO280)	Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC			Potencia (ensayo basado en células)
				M	A	F [%]	
[Meses]	-	[mOsmol·kg <sup>-1</sup> ]	[mg·ml <sup>-1</sup> ]	M / A / F [%]			Potencia relativa (en comparación con el patrón de referencia)
0	5,7	--	169,00	>99,0	0,6	<1 %	0,97
2	5,6	--	171,00	98,3	1,7	<1 %	0,92
3	5,7	--	173,00	98,0	2,0	<1 %	1,14

Tabla 10: Pruebas de estabilidad a  $+40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  (anticuerpo 171 mg/ml)

Tiempo de almacenamiento	pH	Osmolalidad	Concentración (DO280)	Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC	Potencia (ensayo basado en células)		
[Mes]	-	[mOsmol·kg <sup>-1</sup> ]	[mg·ml <sup>-1</sup> ]	M / A / F [%]			Potencia relativa (en comparación con el patrón de referencia)
0	5,7	--	169,0	>99,0	0,6	<1 %	0,97
2	5,6	--	171,0	92,5	2,9	<5 %	0,90
3	5,7	--	175,0	90,3	3,5	<7 %	0,91

**Estudios de congelación/descongelación**

- 5 Se sometió a prueba la estabilidad de congelación/descongelación para concentraciones de anticuerpos de 106 mg/ml y 145 mg/ml formuladas en una disolución de histidina 30 mM pH 5,8 y sorbitol al 5 %. El anticuerpo se congeló a  $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  durante al menos una noche. La descongelación se realizó durante  $\geq 6$  h a temperatura ambiente. Se llevó a cabo un número de 0, 1, 3, 5, 7 y 10 ciclos de congelación/descongelación.
- 10 Se midieron los siguientes parámetros: pH, osmolalidad, concentración (DO280), porcentaje de monómeros, agregados y fragmentos por SE-HPLC, potencia (ensayo basado en células). Los resultados se muestran en las siguientes tablas 11 y 12.

Tabla 11: Pruebas de estabilidad de congelación/descongelación a  $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  (anticuerpo 106 mg/ml)

15

Número de ciclos de F/T	pH	Osmolalidad	Concentración (DO280)	Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC	Potencia (ensayo basado en células)		
[N.º]	-	[mOsmol·kg <sup>-1</sup> ]	[mg·ml <sup>-1</sup> ]	M / A / F [%]			Potencia relativa (en comparación con el patrón de referencia)
0x	5,86	373	99,07	99,05	0,95	0	0,84
1x	5,86	381	99,37	99,19	0,81	0	1,05
3x	5,89	379	98,23	99,20	0,80	0	1,11
5x	5,87	380	99,69	99,15	0,85	0	1,15
7x	5,86	380	99,96	99,12	0,88	0	1,24
10x	5,87	378	98,94	99,08	0,92	0	0,83

Tabla 12: Pruebas de estabilidad de congelación/descongelación a  $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  (anticuerpo 145 mg/ml)

Número de ciclos de F/T	pH	Osmolalidad	Concentración (DO280)	Monómero (M) Agregados (A) Fragmentos (F) SE-HPLC	Potencia (ensayo basado en células)		
[N.º]	-	[mOsmol·kg <sup>-1</sup> ]	[mg·ml <sup>-1</sup> ]	M / A / F [%]			Potencia relativa (en comparación con el patrón de referencia)
0x	5,86	373	133,13	98,94	1,06	0	0,81
1x	5,90	379	132,98	99,11	0,89	0	1,16
3x	5,89	380	134,56	99,09	0,91	0	1,04
5x	5,90	384	132,74	99,07	0,93	0	1,11
7x	5,90	383	134,54	99,03	0,97	0	1,04
10x	5,91	385	132,89	98,96	1,04	0	1,05

20 **Resultados y conclusión**

- Se llevó a cabo un estudio de estabilidad a largo plazo que incluía condiciones aceleradas y de estrés durante hasta 60 meses para concentraciones de anticuerpos de aproximadamente 106 mg/ml y aproximadamente 145 mg/ml en formulaciones de histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,8. También se realizaron estudios de estabilidad adicionales en condiciones aceleradas y de estrés para concentraciones de anticuerpos de hasta aproximadamente 171 mg/ml en histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,8.

Durante el período de 60 meses, las muestras almacenadas a  $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  para ambas concentraciones mostraron menos del 2 % de agregación y tuvieron la misma potencia en comparación con la referencia.

5 Después de 12 meses de almacenamiento en condiciones aceleradas ( $+25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), ambas concentraciones (106 mg/ml y 145 mg/ml) mostraron menos del 2 % de agregación y tuvieron la misma potencia en comparación con la referencia. Después de 6 meses de almacenamiento en condiciones de estrés ( $+40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ ), ambas concentraciones mostraron menos del 5 % de agregación y tuvieron aproximadamente la misma potencia en comparación con la referencia.

10 Los datos de los estudios adicionales acelerados/de estrés mostraron estabilidad durante 3 meses y 1 mes a  $25^{\circ}\text{C}$  y  $40^{\circ}\text{C}$ , respectivamente. Esto indica que puede esperarse que la estabilidad a  $2-8^{\circ}\text{C}$  sea comparable a la obtenida para concentraciones de anticuerpos de 106 mg/ml y 145 mg/ml, como se comentó anteriormente.

15 Además, el anticuerpo en histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,8 es estable durante al menos 10 ciclos de congelación/descongelación a  $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$  a ambas concentraciones de anticuerpos sometidas a prueba de aproximadamente 106 mg/ml y aproximadamente 145 mg/ml.

#### **Ejemplo 13: Evaluación de viscosidad**

20 La viscosidad se determina para una concentración de anticuerpo de 150 mg/ml formulada en una disolución de histidina 30 mM pH 5,8 y sorbitol al 5 % con un reómetro. Se usa un reómetro para aquellos fluidos que no pueden definirse por un solo valor de viscosidad y, por lo tanto, requieren que se establezcan y midan más parámetros que en el caso de un viscosímetro.

25 Para algunos fluidos, la viscosidad es una constante en un amplio intervalo de velocidades de cizallamiento (fluidos newtonianos). Los fluidos sin una viscosidad constante (fluidos no newtonianos) no pueden describirse por un solo número. Los fluidos no newtonianos presentan una variedad de correlaciones diferentes entre la tensión de cizallamiento y la velocidad de cizallamiento. Por lo tanto, la viscosidad depende de la temperatura, así como de la velocidad de cizallamiento para fluidos no newtonianos. La viscosidad se indica en mili Pascal \* segundos (mPas\*s) a una temperatura dada y una velocidad de cizallamiento  $\dot{\gamma}$  dada [1/s].

30 La viscosidad de la formulación con aproximadamente 150 mg/ml de anticuerpo está por debajo de 12 mPa\*s a una velocidad de cizallamiento de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1000 [1/s] a una temperatura de  $20^{\circ}\text{C}$ .

35 La viscosidad de la formulación con aproximadamente 150 mg/ml de anticuerpo está por debajo de 20 mPa\*s a una velocidad de cizallamiento de entre aproximadamente 50 y aproximadamente 1000 [1/s] a una temperatura de  $5^{\circ}\text{C}$ .

#### **Ejemplo 14: Estabilidad bajo agitación/tensión de cizallamiento**

40 Se prepararon formulaciones de 80 mg/ml de anticuerpo con sorbitol al 5 %, histidina 30 mM, pH 5,8 con Tween 20 al 0, 0,01, 0,05, 0,1%, y se prepararon formulaciones de 150 mg/ml de proteína con sorbitol al 5%, histidina 30 mM, pH 5,8 con TWEEN® 20 al 0, 0,01, 0,05, 0,1 y 0,15 % (PS20). Estas formulaciones se agitaron en una célula de cizallamiento o un mezclador durante hasta 24 horas y se midieron las partículas subvisibles por MFI a las 0, 4, 8 y 24 horas. La adición de al menos un 0,01 % de TWEEN® 20 redujo la tasa de formación de partículas subvisibles en comparación con la formulación sin TWEEN®.

45 Se prepararon formulaciones de 150 mg/ml de anticuerpo con sorbitol al 5 %, histidina 30 mM, pH 5,8 con de TWEEN® 80 al 0, 0,01, 0,05, 0,1 % (PS80), y se prepararon formulaciones de 150 mg/ml de proteína con sorbitol al 5%, histidina 30 mM, pH 5,8 con TWEEN® 80 al 0, 0,01, 0,05, 0,1 y 0,15 %. Estas formulaciones se agitaron durante hasta 8 horas y se midieron las partículas subvisibles por MFI a las 0, 4, 6, y 8 horas. La adición de al menos un 0,01 % de TWEEN® 80 redujo la tasa de formación de partículas subvisibles en comparación con la formulación sin TWEEN®.

50 Se muestran los resultados preliminares de esta prueba adicional realizada con 80 y 150 mg/ml de proteína (el anticuerpo) en histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,8 con TWEEN® 20 o TWEEN® 80 añadido (% p/v) (como número de partículas por ml por factor de dilución) en las figuras 3-6. Estas formulaciones se sometieron a cizallamiento/agitaron para examinar su propensión a formar partículas subvisibles en disolución, y se encontró que los tensioactivos reducían la formación de partículas subvisibles. Por lo tanto, se necesita un tensioactivo para evitar la formación de partículas subvisibles o se reducirá la formación de partículas subvisibles durante la fabricación y el almacenamiento.

#### **Ejemplo 15: Evaluación de interacciones con tensioactivos**

60 Se realizaron mediciones de tensión superficial para caracterizar la interacción de TWEEN® 20 y TWEEN® 80 con 80 mg/ml de proteína y 150 mg/ml de proteína en sorbitol al 5%, histidina 30 mM, pH 5,8. Se obtuvieron curvas de tensión superficial similares a las de la figura 7. Se determinó la concentración de agregación crítica (CAC), que es la concentración a la que el tensioactivo comienza a interactuar con la proteína. Además, también se determinó la concentración micelar crítica, la concentración a la que se forman micelas de tensioactivo, que indica que las

interacciones con la proteína estaban en equilibrio. Los resultados se resumen en la tabla 13. TWEEN® 20 y TWEEN® 80 interactúan con la proteína de manera similar con razones molares de tensioactivo de CAC:proteína similares para ambas concentraciones. La CMC es mayor a concentraciones de proteína más altas, pero a una razón molar de tensioactivo:proteína, es similar para ambas concentraciones de proteína. TWEEN® 20 tiene una razón molar de tensioactivo de CMC:proteína menor que TWEEN® 80. A partir de las mediciones de tensión superficial, el intervalo en el que el tensioactivo interactúa con la proteína es de desde la CAC hasta la CMC. Para TWEEN® 20, el intervalo de la razón molar es de aproximadamente 0,004 a 2,6, mientras que para TWEEN® 80, el intervalo de la razón molar es de aproximadamente 0,003 a 3,3. El nivel óptimo de tensioactivo en una formulación de proteína está por encima de la CAC.

10 Tabla 13. Resumen de los datos de la curva de tensión superficial

Tensioactivo	Concentración de proteína (mg/ml)	CAC (mg/ml)	CMC (mg/ml)	Razón molar de tensioactivo de CAC:proteína	Razón molar de tensioactivo de CMC:proteína
TWEEN® 20	80	0,0054	1,70	0,008	2,6
TWEEN® 20	150	0,0053	3,18	0,004	2,6
TWEEN® 80	80	0,0045	2,31	0,006	3,3
TWEEN® 80	150	0,0043	3,90	0,003	3,0

15 CAC = concentración de agregación crítica

CMC = concentración micelar crítica

15 **Ejemplo 16: Estabilidad a congelación - descongelación**

20 Se caracterizaron formulaciones de anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml en histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,8 con concentraciones de TWEEN® 20 (PS20) y TWEEN® 80 (PS80) al 0, 0,01 % y 0,1% a través de 10 ciclos de congelación/descongelación por MFI. Como se observa en la figura 8, hubo un aumento significativo en partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$  con el número de ciclos de congelación/descongelación para formulaciones sin tensioactivo en las mismas. Desde el 0,01 % hasta el 0,1 % de TWEEN® 20 u 80, no hubo un aumento significativo en las partículas.

25 Se caracterizaron formulaciones de anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml en histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,8 con concentraciones de TWEEN® 20 y TWEEN® 80 al 0, 0,05 % y 0,15 % a través de 10 ciclos de congelación/descongelación por MFI. Como se observa en la figura 9, para una de las formulaciones sin tensioactivo en la misma, hubo un aumento significativo en partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$  de tamaño. Desde el 0,05 % hasta el 0,15 % de TWEEN® 20 u 80, no hubo un aumento significativo en las partículas.

30 **Ejemplo 17: Estabilidad acelerada**

35 Se pusieron formulaciones de anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml en histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,8 con concentraciones de TWEEN® 20 (PS20) y TWEEN® 80 (PS80) al 0, 0,05 % y 0,1 % en estabilidad acelerada a 40 °C durante 1 semana. Las muestras se caracterizaron por MFI (tabla 14) y SE-HPLC (tabla 15).

40 Durante 1 semana a 40 °C, no hubo crecimiento en partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$  tal como se midió por MFI. Sin embargo, hubo un aumento en agregados multiméricos (HMW) tal como se midió por SE-HPLC. Después de 7 días, había una cantidad ligeramente mayor de especies de HMW para formulaciones que contenían tensioactivo, pero no significativamente más que la formulación sin tensioactivo. Adicionalmente, el crecimiento de la concentración de HMW no dependía de la cantidad de tensioactivo ni de los dos tipos diferentes de tensioactivo.

45 Tabla 14 Crecimiento de la concentración de partículas de anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,8 a 40 °C durante 7 días

Descripción de la formulación	Concentración de partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ (partículas/ml)		
	0 días	4 días	7 días
anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml + 0 % de PS80	138	1075	69
anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml + 0,05% de PS80	617	91	297
anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml + 0,1 % de PS80	0	160	183
anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml + 0 % de PS20	NA	252	23
anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml + 0,05 % de PS20	69	69	NA
anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml + 0,1 % de PS20	138	23	320

NA = no disponible

Tabla 15 Resultados de SE-HPLC de anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,8 a 40 °C durante 7 días

Descripción de la formulación	HMW			LMW			Monómero		
	0 días	4 días	7 días	0 días	4 días	7 días	0 días	4 días	7 días
anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml + 0 % de PS80	0,76	1,00	1,03	1,6	1,8	1,8	97,7	97,3	97,2
anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml + 0,05 % de PS80	0,71	1,06	1,19	1,8	1,9	1,9	97,5	97,1	96,9
anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml + 0,1 % de PS80	0,72	1,04	1,19	1,9	1,7	1,9	97,4	97,2	96,9
anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml + 0 % de PS20	0,94	0,94	1,07	1,7	1,8	1,8	97,4	97,3	97,2
anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml + 0,05 % de PS20	0,78	1,01	1,16	1,8	1,9	1,8	97,4	97,1	97,1
anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml + 0,1 % de PS20	0,76	1,06	1,19	1,7	1,8	1,9	97,6	97,1	96,9

Se pusieron formulaciones de anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml en histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,8 con concentraciones de TWEEN® 20 (PS20) y TWEEN® 80 (PS80) al 0, 0,1 % y 0,15 % en estabilidad acelerada a 40 °C durante 1 semana. Las muestras se caracterizaron por MFI y SE-HPLC.

Durante 1 semana a 40 °C, no hubo crecimiento en la concentración de partículas  $\geq 10$  um tal como se mide por MFI (tabla 16). Sin embargo, hubo un aumento en los agregados solubles (HMW) tal como se mide por SE-HPLC (tabla 17). La tasa de crecimiento de especies de HMW es mayor a 150 mg/ml frente a 80 mg/ml de anticuerpo, pero no se ve afectado por la cantidad de tensioactivo ni el tipo de tensioactivo en la formulación. Con la adición del tensioactivo, hay un ligero aumento en la cantidad de especies de HMW después de siete días en comparación con las formulaciones sin tensioactivo, pero no es estadísticamente significativo.

Tabla 16. Crecimiento de partículas de anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,8 a 40 °C durante 7 días

Descripción de la formulación	Concentración de partículas $\geq 10$ um (partículas/ml)		
	0 días	4 días	7 días
anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml + 0 % de PS80	137	983	274
anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml + 0,1 % de PS80	114	23	23
anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml + 0,15 % de PS80	343	46	206
anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml + 0 % de PS20	160	183	92
anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml + 0,1 % de PS20	46	183	23
anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml + 0,15 % de PS20	23	46	0

Tabla 17. Resultados de SE-HPLC de anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,8 a 40 °C durante 7 días

Descripción de la formulación	HMW			LMW			Monómero		
	0 días	4 días	7 días	0 días	4 días	7 días	0 días	4 días	7 días
anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml + 0 % de PS80	0,85	1,40	1,53	1,6	1,7	1,9	97,6	96,9	96,6
anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml + 0,05 % de PS80	0,81	1,49	1,79	1,7	1,7	2,0	97,5	96,9	96,2
anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml + 0,1 % de PS80	0,85	1,54	1,79	1,6	1,8	2,1	97,6	96,7	96,1
anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml + 0 % de PS20	0,97	1,41	1,55	1,6	1,8	1,8	97,4	96,8	96,6
anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml + 0,1 % de PS20	0,96	1,37	1,65	1,7	1,7	2,0	97,4	97,0	96,3
anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml + 0,15 % de PS20	0,98	1,39	1,73	1,6	1,4	2,2	97,4	97,0	96,1

**Ejemplo 18: Estabilidad en jeringas precargadas**

La estabilidad de diversas formulaciones se estudia con jeringas precargadas de 3 fabricantes diferentes con diferentes cantidades de silicona, componentes de caucho, etc. Adicionalmente, se estudian formulaciones de placebo. Las formulaciones se colocan a 2-8 °C y 25 °C durante hasta 12 meses. Las formulaciones que contienen proteína, el anticuerpo (Ab), se caracterizan por su aspecto visual, SE-HPLC, cromatografía de intercambio catiónico y MFI, mientras que las formulaciones de placebo se caracterizan por su aspecto visual y MFI.

Las formulaciones estudiadas se muestran en la tabla 18.

10 Tabla 18. Condiciones de la jeringa precargada para el análisis de estabilidad

Formulación n.º	Composición	Fabricante de jeringas
1	150 mg/ml de Ab, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,04 % de PS80	A
2	150 mg/ml de Ab, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,04 % de PS80	B
3	150 mg/ml de Ab, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,04 % de PS80	C
4	80 mg/ml de Ab, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,04 % de PS80	A
5	80 mg/ml de Ab, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,04 % de PS80	B
6	80 mg/ml de Ab, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,04 % de PS80	C
7	80 mg/ml de Ab, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,02 % de PS80	A
8	150 mg/ml de Ab, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,02 % de PS80	A
9	Histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,02 % de PS80	A
10	Histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,04 % de PS80	A

**Ejemplo 19: Estabilidad en jeringas precargadas**

- 15 La estabilidad de diversas formulaciones con diferentes concentraciones de anticuerpos y cantidad de polisorbato se estudió con jeringas precargadas, todas las jeringas típicas para administración subcutánea, de 3 fabricantes diferentes con diferentes cantidades de aceite de silicona y formulación de caucho usada para el protector de aguja. Se usó la misma formulación de tapón/émbolo para los 3 fabricantes de jeringas. La cantidad de polisorbato se seleccionó para que estuviera por encima de la CAC y en una parte bastante plana de la curva de tensión superficial.
- 20 Adicionalmente, se estudiaron formulaciones de placebo. Las formulaciones se colocaron a 2-8 °C y 25 °C para el muestreo a largo plazo. Las formulaciones que contienen proteína se caracterizan por su aspecto visual, SE-HPLC, cromatografía de intercambio catiónico y MFI, mientras que las formulaciones de placebo se caracterizan por su aspecto visual y MFI.
- 25 Las formulaciones estudiadas se muestran en la tabla 19 y los resultados se proporcionan en las tablas 20-26. Para las formulaciones de 80 mg/ml de anticuerpo, el aspecto visual fue incoloro sin partículas visibles para todas las formulaciones y tipos de jeringa y no cambió con el tiempo. Para las formulaciones de 150 mg/ml de anticuerpo, el aspecto visual era de color amarillo claro sin partículas visibles para todas las formulaciones y tipos de jeringa y no cambió con el tiempo. La tasa de aumento de agregados por SE-HPLC fue mayor para las formulaciones de 150 mg/ml que para las de 80 mg/ml, la cantidad de tensioactivo no tuvo un impacto sobre la tasa de agregación. El cambio en el perfil de carga a lo largo del tiempo fue el mismo para todas las formulaciones y tipos de jeringas examinadas.
- 30

Tabla 19. Condiciones de la jeringa precargada para el análisis de estabilidad

Formulación n.º	Composición	Fabricante de jeringas
1	anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,04 % de PS80	A
2	anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,04 % de PS80	B
3	anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,04 % de PS80	C
4	anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,04 % de PS80	A

5	anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,04 % de PS80	B
6	anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,04 % de PS80	C
7	anticuerpo anti-GM-CSF 80 mg/ml, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,02 % de PS80	A
8	anticuerpo anti-GM-CSF 150 mg/ml, histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,02 % de PS80	A
9	Histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,02 % de PS80	A
10	Histidina 30 mM, sorbitol al 5 %, 0,04 % de PS80	A

Tabla 20. Resultados de SE-HPLC de formulaciones de jeringa precargada almacenadas a +5 °C ± 3 °C

Formulación n.º	1	2	3	4	5	6	7	8
Conc. de anticuerpo (mg/ml)	150	150	150	80	80	80	80	150
% de PS 80	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02
Tipo de jeringa	A	B	C	A	B	C	A	A
% de LMW	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	3,27	2,51
	3 m	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	1,76	1,85
	6 m							
% de HWM	0	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9	0,82
	3 m	1,2	1,2	1,2	1,0	1,0	1,0	1,98
	6 m							
% de monómero	0	98,8	98,8	98,9	98,9	98,9	98,9	95,91
	3 m	98,6	98,6	98,6	98,8	98,8	98,8	96,27
	6 m							

5 Nota: Las mediciones de % de LMW, % de HWM y % de monómero de las formulaciones 7 y 8 en las tablas 20 y 21 se realizaron en un sitio y por un método de integración diferente al usado para las formulaciones 1-6, dando como resultado umbrales diferentes.

Tabla 21. Resultados de SE-HPLC de formulaciones de jeringa precargada almacenadas a +25 °C/60 % de HR

Formulación n.º	1	2	3	4	5	6	7	8
Conc. de anticuerpo (mg/ml)	150	150	150	80	80	80	80	150
% de PS 80	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02
Tipo de jeringa	A	B	C	A	B	C	A	A
% de LMW	0	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	3,27	2,51
	1 m	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4	1,64	1,74
	2 m	0,3	0,3	0,3	0,3	0,3	2,19	2,1
	3 m	0,4	0,4	0,4	0,5	0,5	2,47	2,63
	6 m							
% de HWM	0	1,0	1,0	1,0	0,9	0,9	0,9	0,82
	1 m	1,7	1,6	1,7	1,3	1,2	1,2	1,24
	2 m	1,9	1,9	1,9	1,4	1,4	1,3	1,99
	3 m	1,9	1,9	1,9	1,4	1,3	1,3	2,52
	6 m							
% de monómero	0	98,8	98,8	98,9	98,9	98,9	98,9	95,91
	1 m	98	98	98	98,3	98,4	98,4	97,11
	2 m	97,7	97,9	97,8	98,2	98,3	98,3	95,83
	3 m	97,7	97,7	97,7	98,2	98,2	98,2	95,01
	6 m							

Tabla 22. Resultados de CEX de formulaciones de jeringa precargada almacenadas a +5 °C ± 3 °C

Formulación n.º	1	2	3	4	5	6
Conc. de anticuerpo (mg/ml)	150	150	150	80	80	80
% de PS 80	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Tipo de jeringa	A	B	C	A	B	C
% ácido	0	42	42	42	42	42
	3 m	43	42	43	43	43
	6 m					
% de isoforma principal	0	55	55	55	55	53

	3 m	54	54	54	54	54	54
	6 m						
% básico	0	2	2	2	2	2	3
	3 m	3	3	3	3	3	3
	6 m						

Tabla 23. Resultados de CEX de formulaciones de jeringa precargada almacenadas a +25 °C/60 % de HR

Formulación n.º	1	2	3	4	5	6
Conc. de anticuerpo (mg/ml)	150	150	150	80	80	80
% de PS 80	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
Tipo de jeringa	A	B	C	A	B	C
% ácido	0	42	42	42	42	42
	1 m	43	43	43	43	43
	2 m	47	46	46	48	48
	3 m	48	47	48	49	49
	6 m					
% de isoforma principal	0	55	55	55	55	53
	1 m	53	53	53	53	53
	2 m	50	50	50	48	49
	3 m	48	49	48	47	47
	6 m					
% básico	0	2	2	2	2	3
	1 m	4	4	3	3	3
	2 m	4	4	4	3	4
	3 m	4	4	4	4	4
	6 m					

5 Tabla 24. Resultados de la fuerza de inyección de las formulaciones de jeringa precargada almacenadas a +5 °C ± 3 °C

Formulación n.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Conc. de anticuerpo (mg/ml)	150	150	150	80	80	80	80	150	0	0
% de PS 80	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02	0,02	0,04
Tipo de jeringa	A	B	C	A	B	C	A	A	A	A
Fuerza de desprendimiento máxima (N)	0	4,6	5,2	4,7	4,2	4,7	4,5	4,5	4,5	4,3
	1 m	4,4	5,0	4,9	4,6	4,5	4,2	4,8	4,8	4,4
	2 m	4,3	5,2	4,7	4,2	4,5	4,5	4,3	4,5	4,3
	3 m									
	6 m									
Fuerza de deslizamiento prom. (N)	0	9,6	7,1	7,4	5,4	4,4	5,0	5,0	10,1	4,6
	1 m	10,4	7,4	8,7	5,8	5,2	5,5	7,1	10,6	4,8
	2 m	9,4	6,6	7,5	6,4	5,3	5,1	8,2	8,0	3,8
	3 m									
	6 m									

10 Tabla 26. Resultados de la fuerza de inyección de las formulaciones de jeringa precargada almacenadas a +25 °C/60 % de HR

Formulación n.º	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Conc. de anticuerpo (mg/ml)	150	150	150	80	80	80	80	150	0	0
% de PS 80	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,02	0,02	0,02	0,04
Tipo de jeringa	A	B	C	A	B	C	A	A	A	A
Fuerza de desprendimiento máxima (N)	0	4,6	5,2	4,7	4,2	4,7	4,5	4,5	4,5	4,3
	1 m	5,0	6,0	4,6	4,2	5,3	4,8	4,9	4,5	5,0
	2 m	4,7	5,5	5,0	4,8	4,1	3,9	4,4	5,2	4,5
	3 m	4,5	6,2	4,7	3,8	4,9	4,8	5,2	5,1	4,7
	6 m									
Fuerza de deslizamiento prom. (N)	0	9,6	7,1	7,4	5,4	4,4	5,0	5,0	10,1	4,6
	1 m	8,7	7,4	8,9	5,3	5,7	6,2	6,6	13,0	4,4
	2 m	11,0	7,2	10,5	6,2	4,5	8,1	5,8	12,9	4,7
	3 m	10,3	6,7	12,4	6,5	5,6	6,7	7,9	7,9	4,8
	6 m									

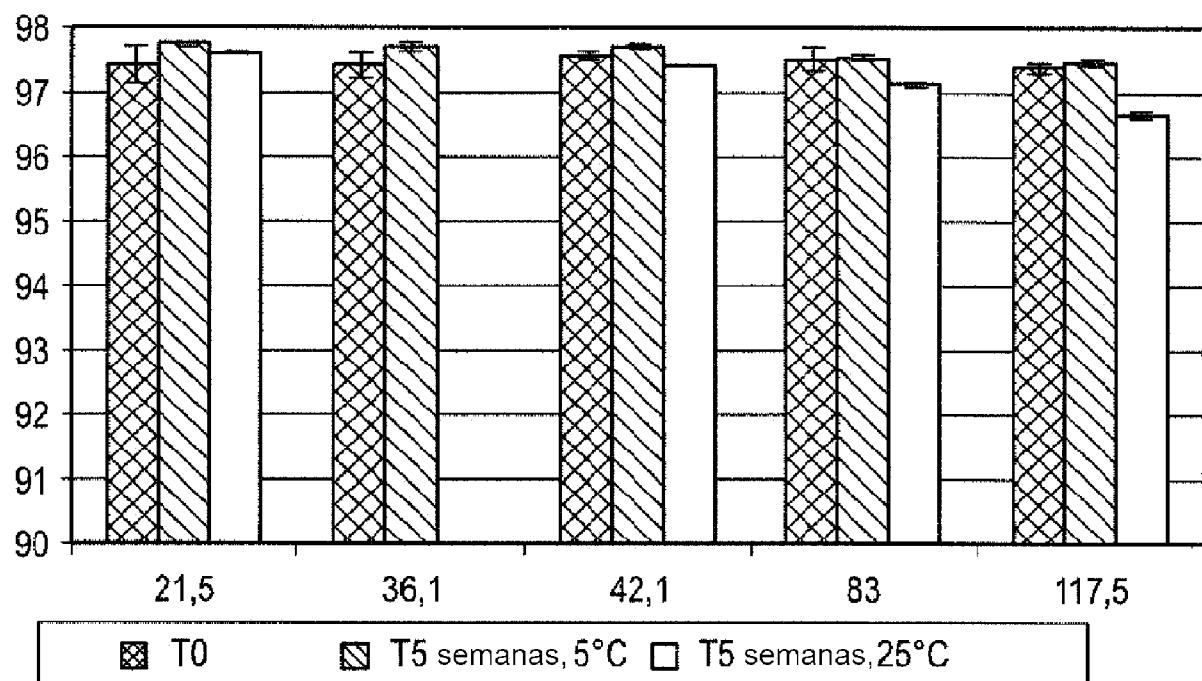
Los resultados de la fuerza de inyección muestran que la fuerza de deslizamiento promedio es de aproximadamente 4-11 N para cada formulación y cada jeringa sometida a prueba. Este intervalo de fuerza brinda la posibilidad de que este anticuerpo anti-GM-CSF en las formulaciones descritas en el presente documento se proporcione tanto para uso manual como para uso con autoinyector.

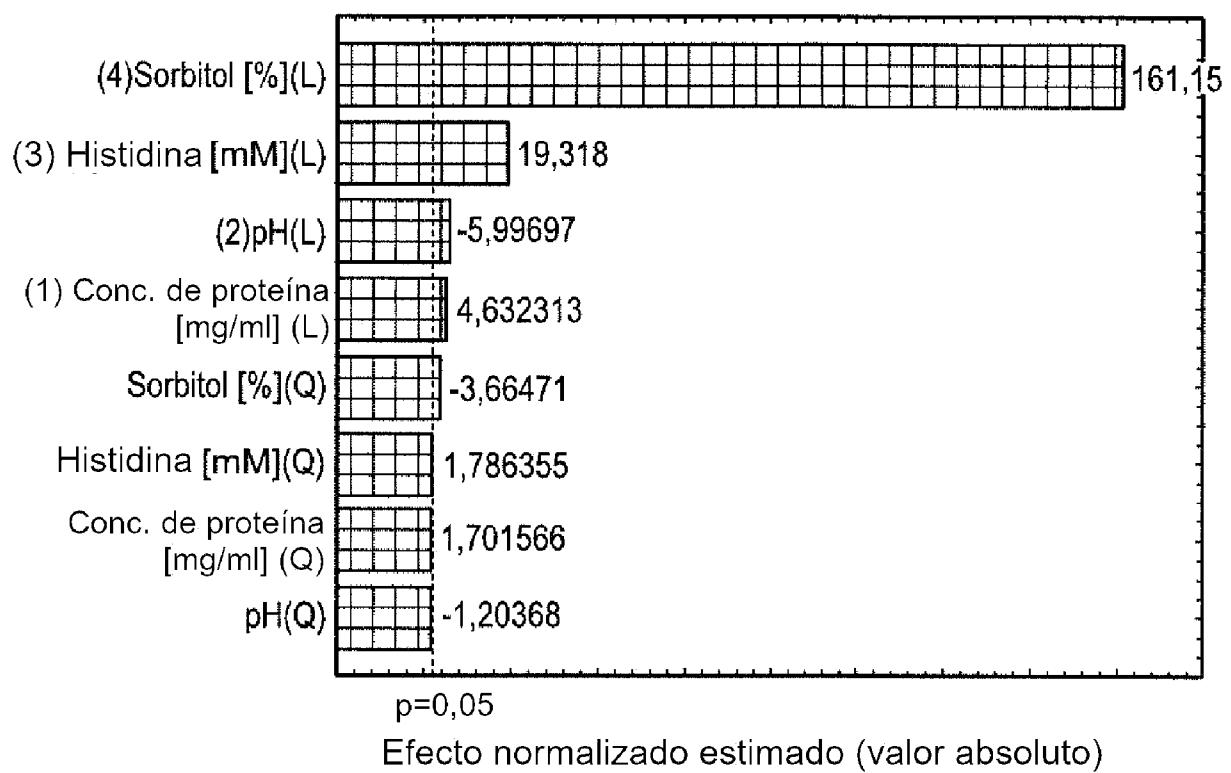
REIVINDICACIONES

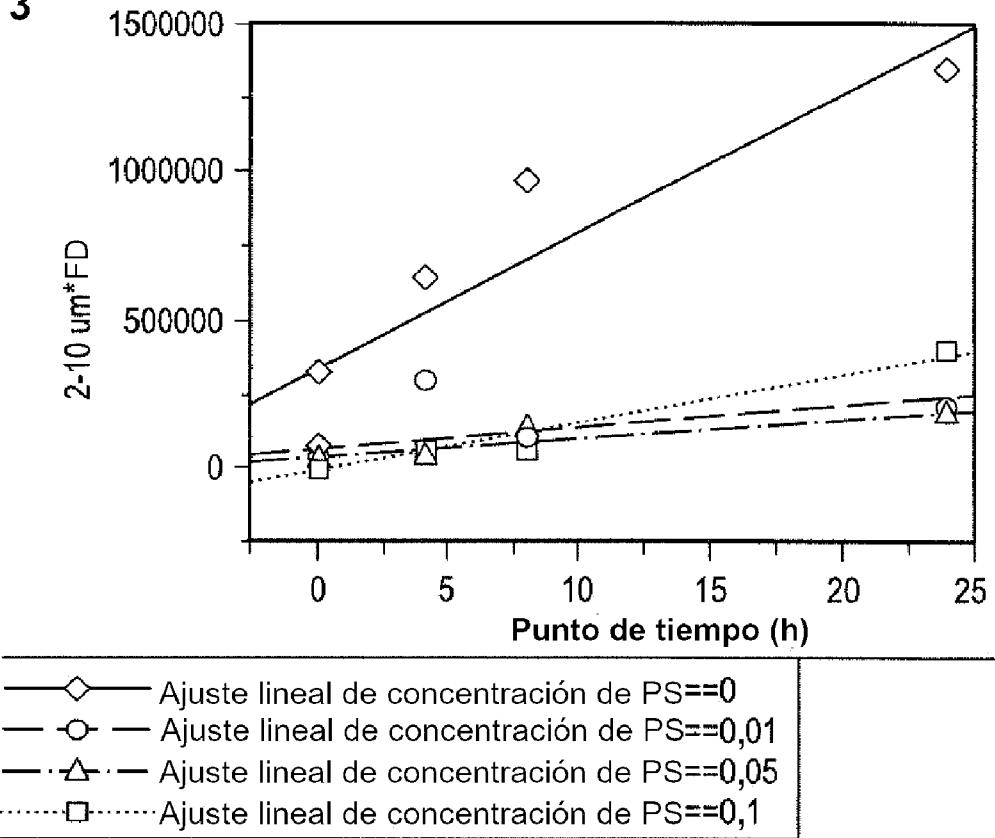
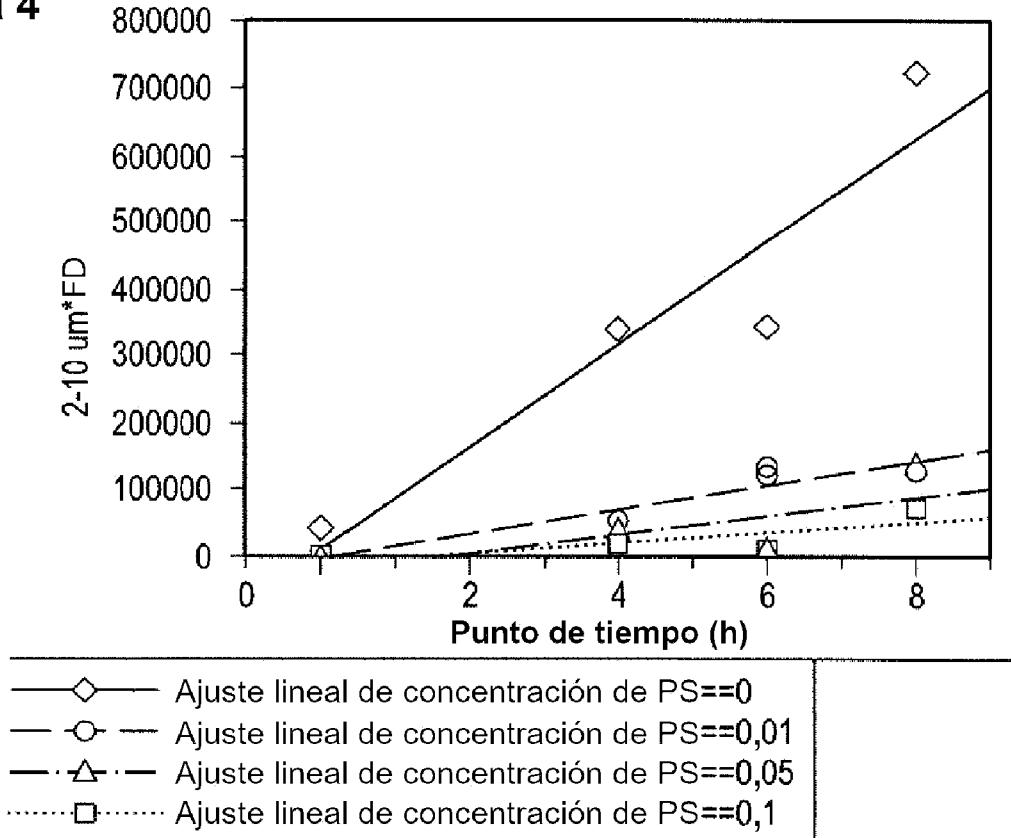
1. Una composición acuosa que comprende
  - 5 i) un anticuerpo monoclonal humano o un fragmento funcional del mismo que se une a GM-CSF, en la que el anticuerpo o fragmento funcional del mismo comprende una secuencia de aminoácidos de cadena ligera como se expone en la SEQ ID NO: 34 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada como se expone en la SEQ ID NO: 35, que está presente en una concentración de desde 50 mg/ml hasta 180 mg/ml,
  - 10 ii) sorbitol al 5 % (p/v);
  - 15 iii) L-histidina 30 mM;
  - iv) desde el 0,01 % hasta el 0,08 % (p/v) de polisorbato 80; y
  - v) tiene un pH de 5,8.
2. La composición según la reivindicación 1, que comprende además un antioxidante.
- 20 3. La composición según la reivindicación 1 o 2, en la que la cantidad de polisorbato 80 está por encima de la concentración de agregación crítica (CAC).
4. La composición según la reivindicación 1 o 2, en la que la razón de polisorbato 80 con respecto a proteína es desde aproximadamente 0,3:1 hasta aproximadamente 0,6:1.
- 25 5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende aproximadamente 80 mg/ml o 150 mg/ml del anticuerpo o un fragmento funcional del mismo que se une a GM-CSF.
6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que es estable durante al menos 24 meses a aproximadamente 2-8 °C o al menos 28 días a temperatura ambiente.
- 30 7. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que se envasa en una jeringa precargada.
8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores para su uso en el tratamiento de trastornos inflamatorios y autoinmunitarios, en la que los trastornos se seleccionan de trastornos alérgicos, psoriásicos, artríticos y asmáticos.

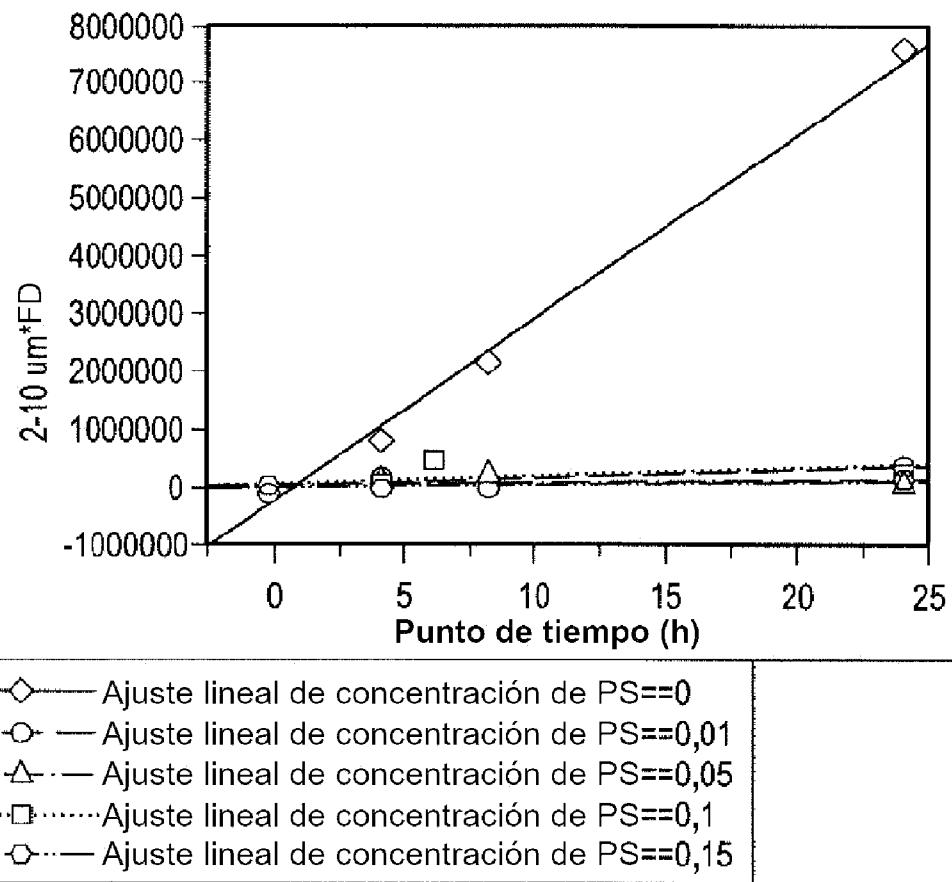
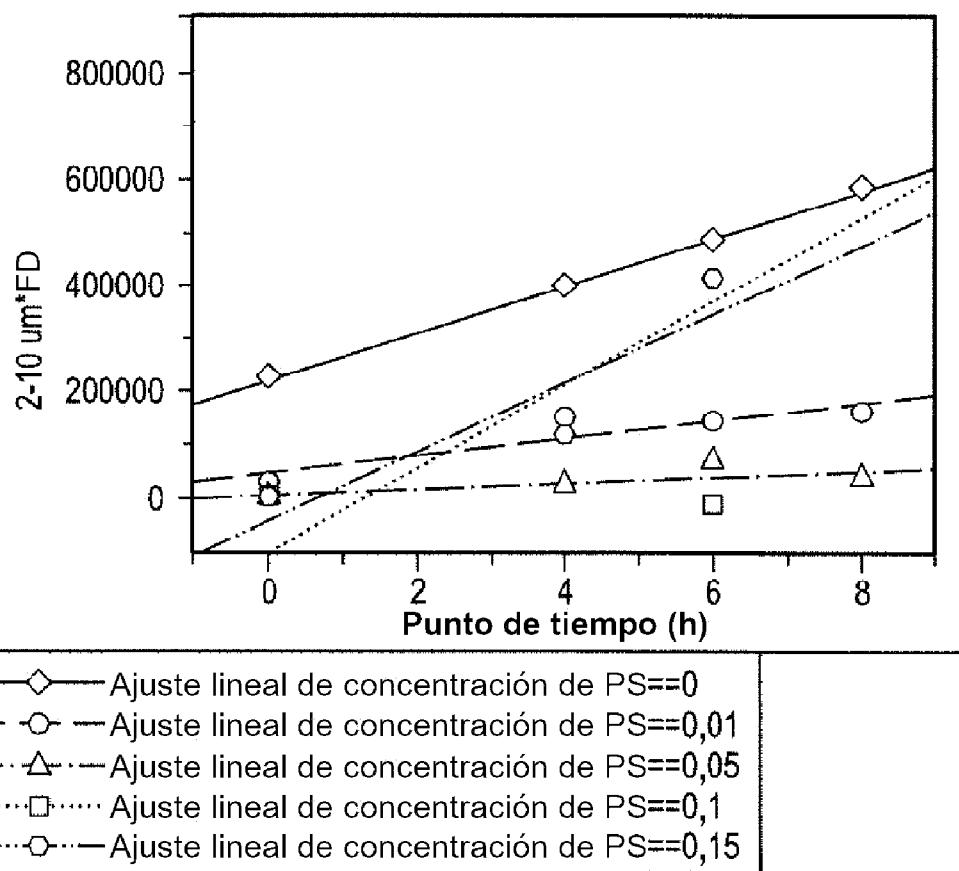
**Figura 1**

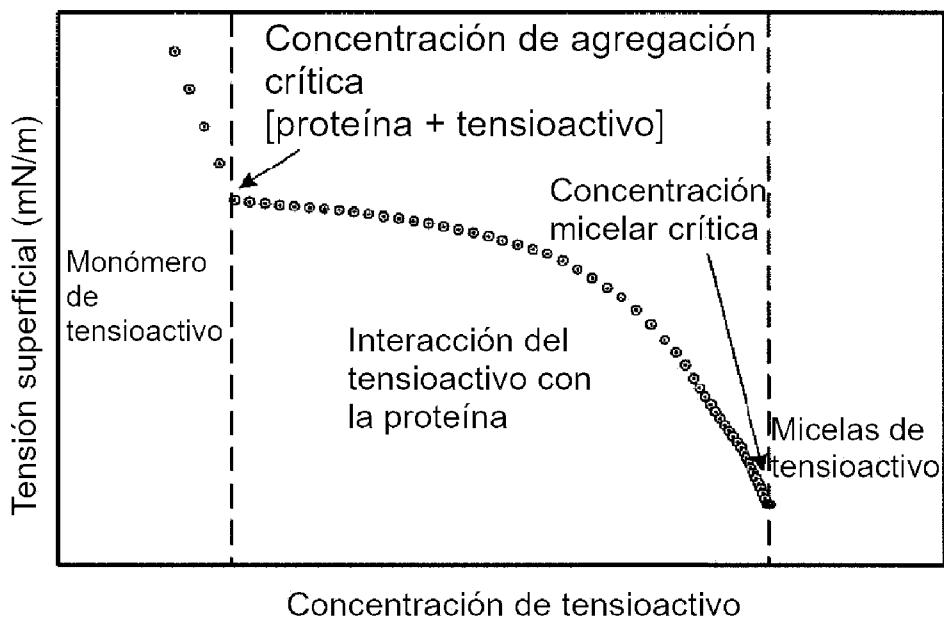
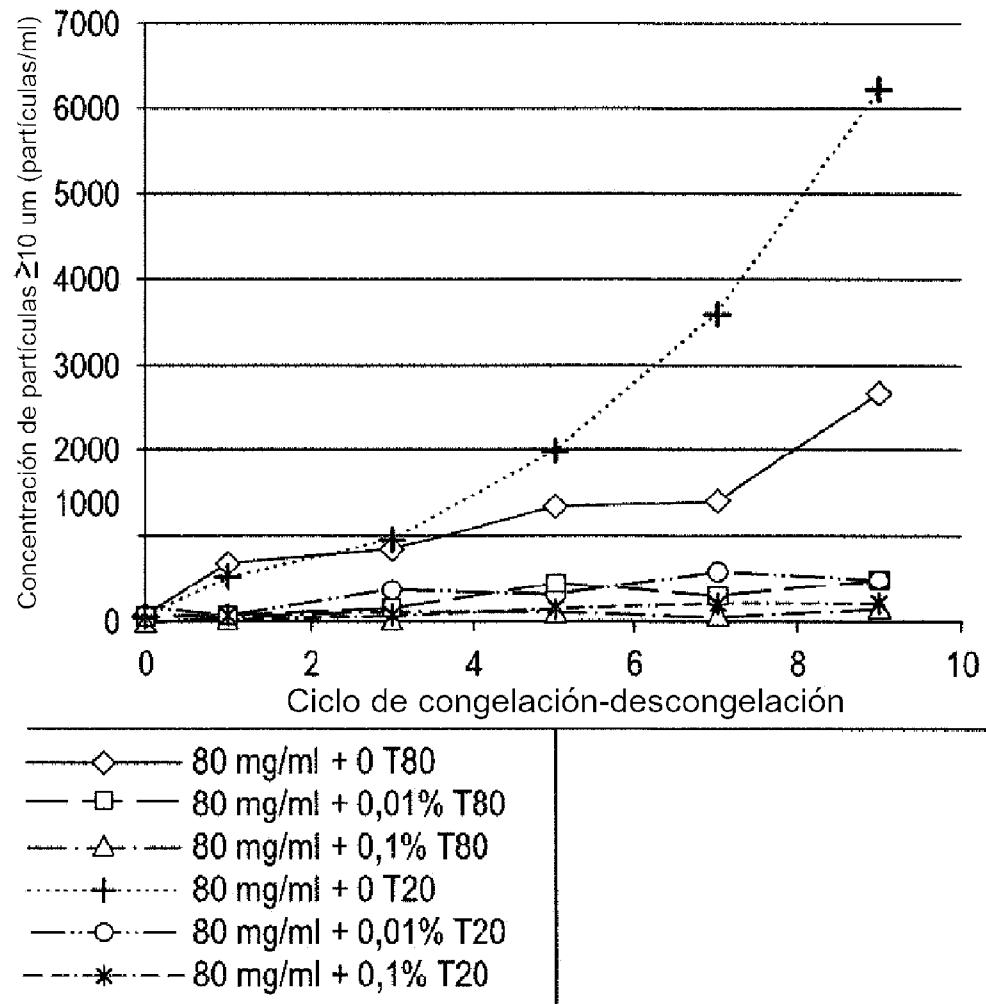
% de monómero



**Figura 2**

**Figura 3****Figura 4**

**Figura 5****Figura 6**

**Figura 7****Figura 8**

**Figura 9**