

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 784 861**

(51) Int. Cl.:

A61K 39/00

(2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.09.2013 PCT/US2013/058618**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **13.03.2014 WO14039903**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.09.2013 E 13835291 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.12.2019 EP 2892550**

(54) Título: **Formulaciones acuosas estables de adalimumab**

(30) Prioridad:

**07.09.2012 US 201261698138 P
26.02.2013 US 201361769581 P
28.02.2013 US 201361770421 P**

(73) Titular/es:

**COHERUS BIOSCIENCES, INC. (100.0%)
201 Redwood Shores Parkway Suite 200
Redwood City, CA 94065, US**

(72) Inventor/es:

**MANNING, MARK y
PAYNE, ROBERT W.**

(74) Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 784 861 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones acuosas estables de adalimumab

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a composiciones farmacéuticas acuosas adecuadas para el almacenamiento a largo plazo de adalimumab (que incluye proteínas de anticuerpos consideradas o dirigidas a variantes "biosimilares" o "bio-mejores" de adalimumab disponible en el mercado), a métodos de fabricación de las composiciones, métodos para su administración y kits que lo contienen.

Antecedentes de la invención

10 El factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) es una citoquina de mamífero que se encuentra de forma natural, producida por varios tipos de células, que incluyen monocitos y macrófagos en respuesta a endotoxina u otros estímulos. El TNF α es un mediador importante de reacciones inflamatorias, inmunológicas y fisiopatológicas (Grell, M., et al. (1995) *Cell*, 83: 793-802).

15 El TNF α soluble se forma por la escisión de una proteína transmembrana precursora (Kriegler, et al. (1988) *Cell* 53: 45-53), y los polipéptidos secretados de 17 kDa se ensamblan en complejos homotímeros solubles (Smith, et al. (1987), *J. Biol. Chem.* 262: 6951-6954; para revisiones del TNF, véase Butler, et al. (1986), *Nature* 320: 584; Old (1986), *Science* 230: 630). Estos complejos después se unen a los receptores que se encuentran en una variedad de células. La unión produce un conjunto de efectos proinflamatorios, que incluyen (i) liberación de otras citoquinas proinflamatorias como la interleuquina (IL)-6, IL-8 e IL-1, (ii) liberación de metaloproteinasas de la matriz y (iii) regulación por aumento de la expresión de moléculas de adhesión endotelial, amplificando más la cascada inflamatoria e inmunitaria por la atracción de leucocitos a los tejidos extravasculares.

20 Hay muchos trastornos asociados con niveles elevados de TNF α . Por ejemplo, se ha demostrado que el TNF α está regulado por aumento en una serie de enfermedades humanas, incluyendo enfermedades crónicas tales como la artritis reumatoide (AR), trastornos inflamatorios del intestino, que incluyen la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, septicemia, insuficiencia cardíaca congestiva, asma bronquial y esclerosis múltiple. El TNF α también se menciona como una citoquina proinflamatoria.

25 Fisiológicamente, el TNF α también está asociado con la protección contra infecciones particulares (Cerami et al. (1988), *Immunol. Today* 9:28). El TNF α es liberado por macrófagos que han sido activados por lipopolisacáridos de bacterias Gram negativas. Como tal, el TNF α parece que es un mediador endógeno de importancia central implicado en el desarrollo y la patogénesis del choque endotóxico asociado con la septicemia bacteriana.

30 Adalimumab (Humira®, AbbVie, Inc.) es un anticuerpo monoclonal IgG1 humano recombinante específico para el TNF humano. Este anticuerpo también se conoce como D2E7. Adalimumab consiste en 1330 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 148 kilodaltons. Adalimumab ha sido descrito y reivindicado en la patente N° 6.090.382. El adalimumab normalmente se produce por tecnología de ADN recombinante en un sistema de expresión de células de mamífero, tal como, por ejemplo, células de ovario de hámster chino. El adalimumab se une específicamente al TNF α y neutraliza la función biológica del TNF al bloquear su interacción con los receptores de TNF de la superficie celular p55 y p75.

35 Se conocen varias formulaciones de adalimumab en la técnica. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 8.216.583 y 8.420.081. Todavía son necesarias formulaciones líquidas estables de adalimumab que permitan su almacenamiento a largo plazo sin pérdida sustancial de eficacia.

40 La publicación internacional WO 2012/065072 A2 y el documento US 2010/0278822 A2 describen formulaciones de alta concentración de proteínas de anticuerpos anti-TNF α .

Compendio de la invención

45 La presente invención se define por la reivindicación independiente 1. La reivindicación dependiente representa realizaciones adicionales de la invención.

50 La invención proporciona formulaciones acuosas estables que comprenden adalimumab que permite su almacenamiento a largo plazo.

En la realización (A), una composición farmacéutica acuosa consiste en: (i) adalimumab 50 mg/ml, (ii) tampón de histidina 10 mM, (iii) glicina 120 mM, (iv) arginina 120 mM, y (v) polisorbato 80 al 0,1% en peso.

En la realización (B), una composición farmacéutica acuosa consiste en: (i) adalimumab 50 mg/ml, (ii) tampón de histidina 10 mM, (iii) glicina 120 mM, (iv) arginina 120 mM, y (v) polisorbato 80 al 0,05% en peso.

En la realización (C), una composición farmacéutica acuosa consiste en: (i) adalimumab 50 mg/ml, (ii) tampón de histidina 10 mM, (iii) glicina 120 mM, (iv) arginina 120 mM, y (v) polisorbato 80 al 0,01% en peso.

En la realización (D), una composición farmacéutica acuosa consiste en: (i) adalimumab 50 mg/ml, (ii) tampón de histidina 10 mM, (iii) glicina 120 mM, (iv) arginina 120 mM, y (v) polisorbato 20 al 0,05% en peso.

5 En la realización (E), una composición farmacéutica acuosa consiste en: (i) adalimumab 50 mg/ml, (ii) tampón de histidina 10 mM, (iii) glicina 120 mM, (iv) arginina 120 mM, y (v) pluronic F-68 al 0,1% en peso.

En la realización (F), una composición farmacéutica acuosa consiste en: (i) adalimumab 50 mg/ml, (ii) tampón de histidina 20 mM, (iii) glicina 150 mM, (iv) arginina 100 mM, y (v) polisorbato 80 al 0,01% en peso.

10 En la realización (G), una composición farmacéutica acuosa consiste en: (i) adalimumab 50 mg/ml, (ii) tampón de histidina 20 mM, (iii) glicina 120 mM, (iv) arginina 120 mM, y (v) polisorbato 20 al 0,01% en peso.

En cada una de las realizaciones (A)-(G), la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5,2.

En un aspecto adicional, la invención se dirige a una composición para usar en un método para tratar una afección inflamatoria en un sujeto, que comprende administrar a dicho sujeto cualquiera de las realizaciones de formulaciones de adalimumab (A)-(G) como se ha descrito antes.

15 Breve descripción de los dibujos

La fig. 1 es una gráfica de barras de la estabilidad de diferentes formulaciones de adalimumab determinada por cromatografía de exclusión por tamaños (SEC).

La fig. 2 es una gráfica de barras de la estabilidad de diferentes formulaciones de adalimumab determinada por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) de fase inversa (RP).

20 La fig. 3 es una gráfica de un modelo de mínimos cuadrados parciales (PLS) 1 que demuestra el efecto de citrato/fosfato en la estabilidad.

La fig. 4 es una gráfica de un modelo de PLS 2 que demuestra el efecto de citrato/fosfato en la estabilidad.

La fig. 5 es una gráfica de un modelo de PLS 1 que demuestra el efecto de histidina/glicina en la estabilidad.

La fig. 6 es una gráfica de un modelo de PLS 1 que demuestra el efecto de arginina/sorbitol en la estabilidad.

25 La fig. 7 es una gráfica de un modelo de PLS 1 que demuestra el efecto de pH/histidina en la estabilidad.

La fig. 8 es una gráfica de un modelo de PLS 2 que demuestra el efecto de pH/histidina en la estabilidad.

La fig. 9 es una gráfica de un modelo de PLS 2 que demuestra el efecto de trehalosa/PS80 en la estabilidad.

La fig. 10 es una gráfica de un modelo de PLS 2 que demuestra el efecto de manitol/PS80 en la estabilidad.

La fig. 11 es una gráfica de un modelo de PLS 1 que demuestra el efecto de manitol/NaCl en la estabilidad.

30 La fig. 12 es una gráfica de un modelo de PLS 1 que demuestra el efecto de EDTA/metionina en la estabilidad.

La fig. 13 es una gráfica de un modelo de PLS A que demuestra el efecto del citrato y fosfato en la estabilidad.

La fig. 14 es una gráfica de un modelo de PLS A que demuestra el efecto del pH y tampón de histidina en la estabilidad.

La fig. 15 es una gráfica de un modelo de PLS A que demuestra el efecto de la glicina y arginina en la estabilidad.

35 La fig. 16 es una gráfica de un modelo de PLS A que demuestra el efecto del NaCl y polisorbato 80 (PS 80) en la estabilidad.

La fig. 17 es una gráfica de un modelo de PLS B que demuestra el efecto del citrato y fosfato en la estabilidad.

La fig. 18 es una gráfica de un modelo de PLS B que demuestra el efecto del pH y tampón de histidina en la estabilidad.

La fig. 19 es una gráfica de un modelo de PLS B que demuestra el efecto de la arginina y glicina en la estabilidad.

La fig. 20 es una gráfica de un modelo de PLS B que demuestra el efecto del PS80 y manitol en la estabilidad.

40 La fig. 21 es una gráfica de un modelo de PLS B que demuestra el efecto del EDTA y NaCl en la estabilidad.

La fig. 22 es una gráfica de un modelo de PLS B que demuestra el efecto del tampón de succinato y tampón de histidina en la estabilidad.

La fig. 23 es una gráfica de un modelo de PLS C que demuestra el efecto del citrato y fosfato en la estabilidad.

La fig. 24 es una gráfica de un modelo de PLS C que demuestra el efecto del pH y tampón de histidina en la estabilidad.

5 La fig. 25 es una gráfica de un modelo de PLS C que demuestra el efecto de la arginina y glicina en la estabilidad.

La fig. 26 es una gráfica de un modelo de PLS C que demuestra el efecto del manitol y PS 80 en la estabilidad.

La fig. 27 es una gráfica de un modelo de PLS C que demuestra el efecto del PS 80 y NaCl en la estabilidad.

La fig. 28 es una gráfica de un modelo de PLS C que demuestra el efecto del pH y la concentración de proteínas en la estabilidad.

10 Descripción detallada de la invención

Se describen ahora en detalle diversas realizaciones de la invención. Como se usa en la descripción y a lo largo de las reivindicaciones, el significado de "un", "una" y "el", "la" incluye la referencia plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Además, como se usa en la descripción y a lo largo de las reivindicaciones, el significado de "en" incluye "en" y "sobre" a menos que el contexto indique claramente lo contrario. Adicionalmente, algunos términos usados en esta memoria descriptiva se definen más específicamente a continuación.

Definiciones

Los términos usados en esta memoria descriptiva generalmente tienen sus significados ordinarios en la técnica, dentro del contexto de la invención y en el contexto específico donde se usa cada término. Ciertos términos que se usan para describir la invención se discuten a continuación, o en otra parte de la memoria descriptiva, para proporcionar orientación adicional al profesional con respecto a la descripción de la invención. Se proporcionan sinónimos para ciertos términos. Una mención de uno o más sinónimos no excluye el uso de otros sinónimos. El uso de ejemplos en cualquier parte de esta memoria descriptiva, incluyendo ejemplos de cualquiera de los términos descritos en la presente memoria es solo ilustrativo, y de ninguna manera limita el alcance y el significado de la invención o de cualquier término ilustrado. A menos que se defina de otra forma, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente memoria tienen el mismo significado que entiende normalmente un experto en la materia a la que pertenece esta invención. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria, incluidas las definiciones.

"Alrededor", "aproximadamente" o "de forma aproximada" en general significará dentro del 20 por ciento, dentro del 10 por ciento, dentro del 5, 4, 3, 2 o 1 por ciento de un valor o intervalo dado. Las cantidades numéricas dadas son aproximadas, lo que significa que el término "alrededor", "aproximadamente" o "de forma aproximada" se pueden inferir si no se indica expresamente.

El término "adalimumab" es sinónimo del principio farmacéutico activo en Humira®, así como de proteínas consideradas o previstas como variantes del mismo biosimilares o biomejores. Adalimumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 humano recombinante específico para TNF humano. Adalimumab también se conoce como D2E7. Adalimumab tiene dos cadenas ligeras, cada una con un peso molecular de aproximadamente 24 kilodaltons (kDa) y dos cadenas pesadas de IgG1, cada una con un peso molecular de aproximadamente 49 kDa. Cada cadena ligera consta de 214 restos de aminoácidos y cada cadena pesada consta de 451 restos de aminoácidos. Por lo tanto, adalimumab consta de 1330 aminoácidos y tiene un peso molecular total de aproximadamente 148 kDa. El término adalimumab también pretende abarcar las denominadas variantes biosimilares o biomejores de la proteína adalimumab usadas en Humira® disponible en el mercado. Por ejemplo, una variante de Humira® comercial puede ser aceptable por la FDA cuando tiene esencialmente los mismos efectos farmacológicos que el Humira® disponible en el mercado, incluso aunque pueda presentar ciertas propiedades físicas, tales como perfil de glicosilación, que pueden ser similares, sino idénticos a Humira®.

Para los fines de la presente solicitud, el término "adalimumab" también abarca adalimumab con modificaciones menores en la estructura de aminoácidos (que incluyen eliminaciones, adiciones y/o sustituciones de aminoácidos) o en las propiedades de glicosilación, que no afectan significativamente a la función del polipéptido. El término "adalimumab" abarca todas las formas y formulaciones de Humira®, que incluyen, pero no se limitan a formulaciones concentradas, formulaciones inyectables listas para usar; formulaciones reconstituidas con agua, alcohol y/u otros ingredientes, y otros.

50 La expresión "TNF α humano" (que se puede abbreviar como hTNF α , o simplemente hTNF), como se usa en la presente memoria, pretende referirse a una citoquina humana que existe como una forma secretada de 17 kD y una forma asociada a la membrana de 26 kD, cuya forma biológicamente activa está compuesta de un trímero de moléculas de 17 kD unidas de forma no covalente. La estructura del hTNF α se describe además, por ejemplo, en Pennica, D., et al.

(1984) *Nature* 312:724-729; Davis, J.M. et al. (1987) *Biochemistry* 26:1322-1326; y Jones, E.Y., et al. (1989) *Nature* 338:225-228. La expresión TNF α humano pretende incluir TNF α humano recombinante (rhTNF α), que se puede preparar por métodos de expresión recombinante estándar o adquirir en el mercado (R & D Systems, nº de catálogo 210-TA, Minneapolis, Minn.).

- 5 El término "anticuerpo", como se usa en la presente memoria, se refiere a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente memoria como HCVR o VH) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente memoria como LCVR o VL) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL se pueden subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones armazón (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxi en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En una realización de la invención, la formulación contiene un anticuerpo con secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 como las descritas en las Pat. Nº 6.090.382; 6.258.562 y 8.216.583.

Un anticuerpo o parte de unión al antígeno del mismo puede ser parte de una molécula de inmunoadhesión más grande, formada por asociación covalente o no covalente del anticuerpo o parte del anticuerpo con una o más proteínas o péptidos diferentes. Los ejemplos de dichas moléculas de inmunoadhesión incluyen el uso de la región central de estreptavidina para hacer una molécula scFv tetrámera (Kipriyanov, S.M., et al. (1995) *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101) y el uso de un resto de cisteína, un péptido marcador y un marcador de polihistidina C-terminal para hacer moléculas scFv bivalentes y biotiniladas (Kipriyanov, S.M., et al. (1994) *Mol. Immunol.* 31:1047-1058). Las partes de anticuerpos, tales como los fragmentos Fab y F (ab') $_2$, se pueden preparar a partir de anticuerpos completos usando técnicas convencionales, tales como digestión con papaína o pepsina, respectivamente, de anticuerpos completos. Además, los anticuerpos, las partes de anticuerpos y las moléculas de inmunoadhesión se pueden obtener usando técnicas estándar de ADN recombinante, como se describe en la presente memoria.

La expresión "anticuerpo aislado", como se usa en la presente memoria, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos que tienen especificidades antigenicas diferentes (p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a hTNF α está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos del hTNF α). Sin embargo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hTNF α puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de TNF α de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos.

El término "glicina" se refiere a un aminoácido cuyos codones son GGT, GGC, GGA y GGG.

El término "arginina" se refiere a un α -aminoácido cuyos codones son CCU, CCC, CCA y CCG.

35 El término "alanina" se refiere a un aminoácido cuyos codones son GCT, GCC, GCA y GCG.

El término "metionina" se refiere a un aminoácido cuyo codón es ATG.

El término "glutamato" se refiere a un aminoácido cuyos codones son GAA y GAG.

El término "azúcar" se refiere a monosacáridos, disacáridos y polisacáridos. Los ejemplos de azúcares incluyen, pero no se limitan a sacarosa, glucosa, dextrosa y otros.

40 El término "poliol" se refiere a un alcohol que contiene múltiples grupos hidroxilo. Los ejemplos de polioles incluyen, pero no se limitan a manitol, sorbitol y otros.

La expresión "ión metálico" se refiere a un átomo de metal con una carga eléctrica neta positiva o negativa. Para los fines de la presente solicitud, la expresión "ión metálico" también incluye fuentes de iones metálicos, que incluyen pero no se limitan a sales metálicas.

45 La expresión "almacenamiento a largo plazo" o "estabilidad a largo plazo" se entiende que significa que la composición farmacéutica se puede almacenar durante tres meses o más, durante seis meses o más, y preferiblemente durante un año o más, lo más preferiblemente una vida en anaquel estable mínima de al menos dos años. En términos generales, las expresiones "almacenamiento a largo plazo" y "estabilidad a largo plazo" incluyen además duraciones de almacenamiento estable que son al menos comparables o mejores que la vida en anaquel estable típicamente requerida para las formulaciones comerciales actualmente disponibles de adalimumab, sin pérdidas en la estabilidad que podrían hacer que la formulación no fuera adecuada para su aplicación farmacéutica prevista. También se entiende que almacenamiento a largo plazo significa que la composición farmacéutica se almacena como un líquido a 2-8°C, o se congela, p. ej., a -20°C, o más frío. También está contemplado que la composición se pueda congelar y

descongelar más de una vez.

Se entiende que el término "estable" con respecto al almacenamiento a largo plazo significa que el adalimumab contenido en las composiciones farmacéuticas no pierde más de 20%, o más preferiblemente 15%, o incluso más preferiblemente 10%, y lo más preferiblemente 5% de su actividad con respecto a la actividad de la composición al comienzo del almacenamiento.

La expresión "sustancialmente exento" significa que, o bien no hay ninguna sustancia presente o están presentes cantidades en trazas mínimas de la sustancia que no tienen ningún impacto sustancial en las propiedades de la composición. Si no se hace referencia a ninguna cantidad de una sustancia, debe entenderse como "cantidad no detectable".

10 El término "mamífero" incluye, pero no se limita a, un ser humano.

La expresión "vehículo farmacéuticamente aceptable" se refiere a una carga, diluyente, material de encapsulación, formulación auxiliar o excipiente sólido, semisólido o líquido no tóxico de cualquier tipo convencional. Un vehículo farmacéuticamente aceptable no es tóxico para los receptores en las dosis y concentraciones empleadas y es compatible con otros ingredientes de la formulación.

15 El término "composición" se refiere a una mezcla que normalmente contiene un vehículo, tal como un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable que es convencional en la técnica y que es adecuado para la administración a un sujeto para fines terapéuticos, de diagnóstico o profilácticos. Puede incluir un cultivo celular en el que el polipéptido o polinucleótido está presente en las células o en el medio de cultivo. Por ejemplo, las composiciones para administración oral pueden formar soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación sostenida, enjuagues orales o polvos.

20 Las expresiones "composición farmacéutica" y "formulación" se usan indistintamente.

El término "tratamiento" se refiere a cualquier administración o aplicación de remedios para la enfermedad en un mamífero e incluye inhibir la enfermedad, detener su desarrollo, aliviar la enfermedad, por ejemplo, produciendo el retroceso, o restableciendo o reparando una función perdida, ausente o defectuosa; o estimular un proceso ineficiente.

25 El término incluye la obtención de un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado, que cubre cualquier tratamiento de una afección o trastorno patológico en un mamífero. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir total o parcialmente un trastorno o síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa para un trastorno y/o efecto adverso atribuible al trastorno. Incluye, (1) prevenir la aparición o recurrencia del trastorno en un sujeto que puede estar predisposto al trastorno, pero todavía no es sintomático, (2) inhibir el trastorno, tal como deteniendo su desarrollo, (3) detener o terminar el trastorno o al menos sus síntomas asociados, de modo que el hospedante ya no padezca el trastorno o sus síntomas, tal como produciendo el retroceso del trastorno o sus síntomas, por ejemplo, restableciendo o reparando una función perdida, ausente o defectuosa, o estimulando un proceso ineficiente, o (4) mitigar, aliviar o mejorar el trastorno, o los síntomas asociados con el mismo, donde mejorar se usa en un sentido amplio para referirse a al menos una reducción en la magnitud de un parámetro, tal como inflamación, dolor y/o tamaño tumoral.

30 El término "enfermedad" se refiere a cualquier afección, infección, trastorno o síndrome que requiere intervención médica o para la cual es deseable la intervención médica. Dicha intervención médica puede incluir tratamiento, diagnóstico y/o prevención.

35 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad que, cuando se administra a un sujeto vivo, logra un efecto deseado en el sujeto vivo. Por ejemplo, una cantidad eficaz del polipéptido de la invención para la administración al sujeto vivo es una cantidad que previene y/o trata una enfermedad mediada por integrina av β 3. La cantidad exacta dependerá del propósito del tratamiento, y podrá ser determinada por un experto en la técnica usando técnicas conocidas. Como se sabe en la técnica, pueden ser necesarios ajustes para el suministro sistémico frente al localizado, la edad, peso corporal, salud general, sexo, dieta, tiempo de administración, interacción farmacológica y la gravedad de la afección, y los expertos en la técnica los podrán determinar con experimentación rutinaria.

Realizaciones de la invención

40 Cuando las composiciones farmacéuticas que contienen adalimumab (Humira®), incluyendo formulaciones acuosas y liofilizadas de adalimumab se almacenan a largo plazo, la actividad de adalimumab se puede perder o disminuir debido a la agregación y/o degradación. Por lo tanto, la presente invención proporciona formulaciones acuosas de adalimumab que permiten el almacenamiento estable a largo plazo de adalimumab, de modo que adalimumab es estable durante el transcurso del almacenamiento, ya sea en estado líquido o congelado. Las formulaciones proporcionadas no requieren ninguna etapa adicional tal como rehidratación.

45 Numerosas realizaciones y ejemplos de la presente descripción se explican con mayor detalle a continuación.

Adalimumab

Todas las composiciones de la presente invención comprenden adalimumab. Como se explica en la sección de antecedentes de esta solicitud, adalimumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 humano recombinante específico para el factor de necrosis tumoral humano (TNF). Este anticuerpo también se conoce como D2E7. Adalimumab consiste

5 en 1330 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 148 kilodaltons. Adalimumab se ha descrito y reivindicado en la patente de EE.UU. nº 6.090.382. El término "adalimumab" también pretende significar las versiones denominadas "biosimilares" y "biomejores" de la proteína adalimumab activa presente en Humira® disponible en el mercado.

10 El adalimumab adecuado para el almacenamiento en la presente composición farmacéutica se puede producir por métodos estándar conocidos en la técnica. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.090.382 y 8.216.583 describen varios métodos que podría usar un experto en la técnica para preparar la proteína adalimumab para usar en las formulaciones de la presente invención. Por ejemplo, adalimumab se puede preparar por expresión recombinante de genes de la cadena ligera y pesada de inmunoglobulina en una célula hospedante.

15 La purificación de adalimumab expresado se puede llevar a cabo por cualquier método convencional. Cuando adalimumab se produce por vía intracelular, el residuo en partículas se elimina, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando adalimumab es secretado en el medio, los líquidos sobrenadantes de dichos sistemas de expresión primero se pueden concentrar usando filtros de concentración de polipéptidos convencionales. También se pueden añadir inhibidores de proteasa para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para prevenir el crecimiento de microorganismos.

20 El adalimumab se puede purificar usando, por ejemplo, cromatografía de hidroxiapatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, y cualquier combinación de técnicas de purificación conocidas o aún por descubrir, que incluyen, pero no se limitan a cromatografía de proteína A, fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSET®, una cromatografía de resina de intercambio aniónico o catiónico (tal como una columna de poli(ácido aspártico)), 25 cromato enfoque, SDS-PAGE y precipitación con sulfato amónico.

I Formulaciones de adalimumab con un poliol y/o tensioactivo, pero sin un tampón de citrato/fosfato

En un primer ejemplo, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab; un estabilizante que comprende al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en un poliol y un tensioactivo; y un tampón seleccionado del grupo que consiste en citrato, fosfato, succinato, histidina, tartrato y maleato, en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, y preferiblemente de 30 aproximadamente 5 a aproximadamente 6, y en donde dicho tampón no comprende un combinación de citrato y fosfato. En este ejemplo, el estabilizante comprende preferiblemente tanto poliol como tensioactivo. La composición farmacéutica puede comprender uno, o cualquier combinación de dos o más tampones, siempre que no comprenda citrato y fosfato. El tensioactivo puede ser cualquier tensioactivo farmacéuticamente aceptable, preferiblemente polisorbatos (p. ej., polisorbato 80) o poloxámeros (p. ej., Pluronic F-68).

II Formulaciones de adalimumab que usan un sistema de tampón único

En un segundo ejemplo, que usa un sistema de tampón único, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab, un poliol, un tensioactivo y un sistema de tampón que comprende un agente de tamponamiento único, seleccionándose dicho agente de tamponamiento único de citrato, fosfato, succinato, histidina, tartrato o maleato, pero sin incluir combinaciones de los anteriores; en donde la formulación tiene un pH de aproximadamente 4 a 8, y preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 6. La histidina y el succinato son particularmente preferidos para usar como agentes de tamponamiento únicos. Sorprendentemente se descubrió que las composiciones de adalimumab que comprenden solo un tampón (en oposición a dos o más tampones) son más estables que las composiciones de adalimumab que comprenden tanto un tampón de citrato como un tampón de fosfato. En el ejemplo de tampón único, el adalimumab puede estar presente en una concentración de aproximadamente 20 a aproximadamente 150 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg/ml, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 mg/ml. El tampón está presente en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM. El pH de las composiciones está entre aproximadamente 5 y aproximadamente 6. Las 40 composiciones de tampón único de la descripción pueden comprender además un estabilizante seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido, una sal, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y un ion metálico. El aminoácido se selecciona del grupo que consiste en glicina, alanina, glutamato, arginina y metionina, lo más preferiblemente glicina, arginina y metionina. La sal se selecciona del grupo que consiste en cloruro de sodio y sulfato de sodio. El ion metálico se selecciona del grupo que consiste en cinc, magnesio y calcio. Las composiciones de la descripción pueden 45 comprender además un tensioactivo. El tensioactivo es un tensioactivo de polisorbato o un tensioactivo de poloxámero. Los tensioactivos de polisorbato incluyen polisorbato 80, polisorbato 40 y polisorbato 20. Un tensioactivo de polisorbato preferido es el polisorbato 80. Los tensioactivos de poloxámero incluyen poloxámero 188 (también disponible en el 50 55

mercado como Pluronic F-68). Lo más preferiblemente, el tensioactivo es polisorbato 80. La composición de tampón único puede comprender además un poliol. Preferiblemente, el poliol es un alcohol de azúcar; e incluso más preferiblemente, el alcohol de azúcar es manitol, sorbitol o trehalosa. La composición de adalimumab de tampón único también puede comprender un azúcar, preferiblemente sacarosa, glucosa o dextrosa.

- 5 En un ejemplo de una formulación de adalimumab de tampón único, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab en una concentración de aproximadamente 20 y aproximadamente 150 mg/ml, polisorbato 80 en una concentración de aproximadamente 1 a 50 μ M y succinato en una concentración de aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM, en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5, y en donde dicha composición está sustancialmente exenta de cualquier otro tampón.

10 En otro ejemplo de una formulación de adalimumab con tampón único, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab en una concentración de aproximadamente 20 y aproximadamente 150 mg/ml, polisorbato 80 en una concentración de aproximadamente 1 a 50 μ M e histidina en una concentración de aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM, en donde dicha composición tiene un pH de 15 aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5, y en donde dicha composición está sustancialmente exenta de cualquier otro tampón.

20 En otro ejemplo de una formulación de adalimumab de tampón único, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab en una concentración de aproximadamente 20 y aproximadamente 150 mg/ml, polisorbato 80 en una concentración de aproximadamente 1 a 50 μ M, y tartrato, maleato o acetato en una concentración de aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM, en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5, y en donde dicha composición está sustancialmente exenta de cualquier otro tampón.

III Formulaciones de adalimumab que excluyen tampón

25 En un tercer ejemplo, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab, un estabilizante que comprende al menos un miembro seleccionado de un poliol y un tensioactivo, en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 y preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 6, y en donde dicha composición está sustancialmente exenta de un tampón. Debe entenderse que la expresión "exenta de tampón" permite la inclusión del efecto de tamponamiento inherente de 30 la propia proteína. En una formulación exenta de tampón, también pueden estar presentes los estabilizantes mencionados antes (p. ej., glicina, arginina y combinaciones de los mismos).

IV Formulaciones de adalimumab que excluyen tensioactivo

35 En un cuarto ejemplo, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab, un poliol y un tampón seleccionado del grupo que consiste en citrato, fosfato, succinato, histidina, tartrato y maleato, en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 y preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 6, y en donde dicha composición está exenta o sustancialmente exenta de un tensioactivo. Preferiblemente, la composición (i) no contiene la combinación de tampón de citrato y fosfato; y (ii) el tampón es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en histidina y succinato; y (iii) el poliol no es manitol en concentraciones inferiores a aproximadamente 150 mM, sino que en su lugar se selecciona del grupo que consiste en manitol en concentraciones superiores a aproximadamente 150 mM, sorbitol y trehalosa.

40 V Formulaciones de adalimumab que excluyen poliol

En un quinto ejemplo, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab, un tensioactivo y un tampón seleccionado del grupo que consiste en citrato, fosfato, succinato, histidina, tartrato y maleato, en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, y preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 6, y en donde dicha composición está sustancialmente exenta de poliol. Preferiblemente, la composición (i) no contiene la combinación de tampón de citrato y fosfato; y (ii) el 45 tampón es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en histidina y succinato.

50 Estabilizantes adicionales útiles en los ejemplos I a V. Opcionalmente, en cada uno de los cinco ejemplos resumidos antes, la composición puede comprender además un estabilizante seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido, una sal, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y un ion metálico. El aminoácido estabilizante se puede seleccionar del grupo que consiste en glicina, alanina, glutamato, arginina y metionina. La sal estabilizante se puede seleccionar del grupo que consiste en cloruro de sodio y sulfato de sodio. El ion metálico estabilizante se puede seleccionar del grupo que consiste en cinc, magnesio y calcio. Preferiblemente, las formulaciones de adalimumab que contienen los estabilizantes mencionados antes tampoco contienen sistemas de tampones en los que el tampón de fosfato y el tampón de citrato están presentes en combinación. Lo más preferiblemente (i) el estabilizante adicional opcional presente en este ejemplo no es cloruro de sodio, y comprende al menos uno o ambos de arginina y glicina;

(ii) el tampón, cuando está presente, no contiene combinación de citrato y fosfato, sino que en su lugar es al menos uno de histidina y succinato; y (iii) el estabilizante cuando incluye un poliol no es manitol, salvo en cantidades mayores de aproximadamente 150 mM, y también puede incluir trehalosa y sorbitol. Preferiblemente, la cantidad de manitol es mayor que aproximadamente 150 mM, y lo más preferiblemente mayor que aproximadamente 200 mM.

5 VI Formulaciones de adalimumab que sustituyen tanto el tensioactivo como el poliol por otros estabilizantes

Se ha descubierto además que se puede lograr una estabilización satisfactoria cuando se usan los estabilizantes mencionados antes en lugar tanto de poliol como de tensioactivo, por consiguiente, en un sexto ejemplo, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab, opcionalmente un tampón, un estabilizante seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido, una sal, EDTA y un ion metálico, y en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8, y preferiblemente de aproximadamente 5 a aproximadamente 6, y en donde dicha composición está exenta o sustancialmente exenta de un poliol y tensioactivo. Cuando el tampón está presente en este ejemplo, se prefiere en especial que (i) el tampón no incluya la combinación de citrato y fosfato; (ii) el tampón se seleccione del grupo que consiste en histidina y succinato; y (iii) el estabilizante no comprenda cloruro sódico, sino que en su lugar sea al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en arginina y glicina. También se prefiere que el tampón esté exento o sustancialmente exento de tampón de citrato, ya que se ha descubierto que en general es más pobre en términos de contribución a la estabilidad que otros tampones, tales como histidina y succinato.

En cada uno de los ejemplos anteriores, puede estar opcionalmente presente al menos una de las siguientes condiciones ventajosas (a menos que se indique como requerido): (i) el tampón preferiblemente no contiene una combinación de citrato y fosfato, o está exento o sustancialmente exento de tampón de citrato; (ii) el tampón preferiblemente es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en histidina y succinato; y (iii) el estabilizante preferiblemente no incluye cloruro sódico, o si está presente se controla a niveles inferiores a aproximadamente 100 mM; (iv) el estabilizante es al menos un miembro seleccionado del grupo que consiste en arginina y glicina, incluyendo combinaciones de los mismos; y (v) el poliol preferiblemente no es manitol (a menos que el manitol esté presente en cantidades mayores que aproximadamente 150 mM y preferiblemente mayor que aproximadamente 200 mM), pero puede incluir sorbitol y trehalosa. Se ha descubierto en la presente memoria que cuando se usan polioles para la estabilización, el manitol es desestabilizante en comparación con el sorbitol y la trehalosa a menos que el manitol esté presente en cantidades generalmente superiores a aproximadamente 150 a 200 mM. Se ha descubierto en la presente memoria, que cuando se usan otros estabilizantes el cloruro sódico es desestabilizante en comparación con la arginina o la glicina, pero se observa cierta estabilización cuando los niveles de cloruro sódico se controlan a menos de aproximadamente 100 mM y preferiblemente a menos de aproximadamente 75 mM.

Preferiblemente, el adalimumab está presente en la composición de la presente descripción en una concentración de aproximadamente 20 a aproximadamente 150 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 100 mg/ml, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 30 a aproximadamente 50 mg/ml.

El tampón, si está presente, está presente en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM.

El tensioactivo, si está presente, es preferiblemente un polisorbato (PS). En un ejemplo aún más preferido, el polisorbato es polisorbato 80 (PS 80). Los tensioactivos de poloxámero también son adecuados (p. ej., Pluronic® F-68).

El poliol, si está presente, es un alcohol de azúcar. En un ejemplo aún más preferido, el alcohol de azúcar se selecciona del grupo que consiste en manitol, sorbitol y trehalosa, y lo más preferiblemente sorbitol y trehalosa.

Preferiblemente, el poliol está en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 10%, más preferiblemente, de aproximadamente 2 a aproximadamente 6%, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 3 a 5%, en donde dichos valores son en peso por volumen (p/v) de la composición total.

Un estabilizante, cuando está presente, se puede seleccionar del grupo que consiste en un aminoácido, una sal, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) y un ion metálico. El aminoácido se puede seleccionar del grupo que consiste en glicina, alanina, glutamato, arginina y metionina. La sal se puede seleccionar del grupo que consiste en cloruro sódico y sulfato sódico. El ion metálico se puede seleccionar del grupo que consiste en cinc, magnesio y calcio. La glicina y la arginina son estabilizantes particularmente preferidos.

El cinc, magnesio y calcio, cuando están presentes para la estabilización, pueden estar en una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, y más preferiblemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mM.

La glicina o arginina, o combinaciones de las mismas, si están presentes para la estabilización, es en una

concentración total de hasta aproximadamente 300 mM, y preferiblemente de aproximadamente 150 a 300 mM.

La metionina, si está presente para la estabilización, está presente en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/ml, más preferiblemente de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml.

5 El cloruro sódico, si está presente para la estabilización, está en una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 150 mM, más preferiblemente, de aproximadamente 20 a aproximadamente 140 mM, e incluso más preferiblemente menos de aproximadamente 100 mM.

El sulfato sódico, si está presente si está presente para la estabilización, está en una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 150 mM, más preferiblemente, de aproximadamente 20 a aproximadamente 120 mM, e incluso más preferiblemente de aproximadamente 60 a aproximadamente 100 mM.

10 El EDTA, si está presente para la estabilización, está presente en una concentración de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,05%, más preferiblemente de aproximadamente 0,05% a aproximadamente 0,25%, e incluso más preferiblemente de aproximadamente el 0,08% a aproximadamente 0,2%.

Preferiblemente, el pH de la composición es de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5; e incluso más preferiblemente es de aproximadamente 5,2 a 5,4.

15 En un ejemplo de los ejemplos I y II anteriores, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab en una concentración de aproximadamente 20 y aproximadamente 150 mg/ml, sorbitol o trehalosa en una concentración de aproximadamente 1 a 10% en peso por volumen, polisorbato 80 en una concentración de aproximadamente 1 a 50 µM, y al menos uno de tampón desuccinato, histidina, fosfato, tartrato, maleato o citrato, en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5, y con la condición de que dicha composición esté exenta o sustancialmente exenta de la combinación de tampones de citrato/fosfato. Además, se clasifica al citrato como el más pobre de los tampones, y preferiblemente se evita, aunque todavía está dentro del alcance de la descripción para formular formulaciones estables de adalimumab que incluyan el tampón de citrato, si no su combinación con fosfato.

20 25 En un ejemplo del ejemplo IV, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab en una concentración de aproximadamente 20 y aproximadamente 150 mg/ml, sorbitol o trehalosa en una concentración de aproximadamente 1 a 10% en peso por volumen, y al menos uno de tampón de succinato, histidina, fosfato, tartrato, maleato o citrato, en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5, y en donde dicha composición esté sustancialmente exenta de un tensioactivo y, opcionalmente, y preferiblemente, exenta o sustancialmente exenta de combinación de tampones de citrato/fosfato.

30 35 En un ejemplo del ejemplo VI, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab en una concentración de aproximadamente 20 y aproximadamente 150 mg/ml, glicina en una concentración de aproximadamente 20 a aproximadamente 200 mM, y al menos uno de tampón de succinato, histidina, fosfato, tartrato, maleato o citrato, en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5, y en donde dicha composición esté exenta o sustancialmente exenta de poliol; el tensioactivo (p. ej., PS8) está preferiblemente, pero opcionalmente presente; y la composición está, opcionalmente, y preferiblemente, exenta o sustancialmente exenta de combinación de tampones de citrato/fosfato.

40 45 En otro ejemplo del ejemplo VI, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab en una concentración de aproximadamente 20 y aproximadamente 150 mg/ml, arginina o glicina en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 mM, y al menos uno de tampón de succinato, histidina, fosfato, tartrato, maleato o citrato, en una concentración de aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM, en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5, y en donde dicha composición esté sustancialmente exenta de poliol. El tensioactivo (p. ej., PS80) está presente preferiblemente pero opcionalmente, y la composición está, opcionalmente, y preferiblemente, exenta o sustancialmente exenta de combinación de tampones de citrato/fosfato.

50 55 En un ejemplo adicional del ejemplo VI, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab en una concentración de aproximadamente 20 y aproximadamente 150 mg/ml, cloruro sódico en una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 150 mM, y al menos uno de tampón de succinato, histidina, fosfato, tartrato, maleato o citrato, en una concentración de aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5, y en donde dicha composición esté exenta o sustancialmente exenta de un poliol. El tensioactivo (p. ej. PS80) está presente preferiblemente pero opcionalmente; y la composición está, opcionalmente, y preferiblemente, exenta o sustancialmente exenta de combinación de tampones de citrato/fosfato.

En un ejemplo del ejemplo V, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab en una concentración de aproximadamente 20 y aproximadamente 150 mg/ml, cloruro sódico en una concentración de aproximadamente 5 a aproximadamente 150 mM, polisorbato 80 en una concentración de aproximadamente 1 a 50 μ M, y al menos uno de tampón de succinato, histidina, fosfato, tartrato, maleato o citrato, en

5 una concentración de aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM, en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5, y en donde dicha la composición está exenta o sustancialmente exenta de un poliol y, opcionalmente, y preferiblemente, exenta o sustancialmente exenta de tampones de citrato/fosfato.

10 En un ejemplo de los ejemplos I y II, con estabilización adicional, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab en una concentración de aproximadamente 20 y aproximadamente 150 mg/ml, polisorbato 80 en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 μ M, sorbitol o trehalosa en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 10% en peso por volumen, EDTA en una concentración de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 0,5%, y al menos uno de succinato, histidina, fosfato, tartrato, maleato o citrato, como un único tampón, en una concentración de aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5, y en donde la composición está exenta, o sustancialmente exenta de combinación de tampones de citrato/fosfato.

15 En un ejemplo adicional de los ejemplos I y II, con estabilización adicional, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab en una concentración de aproximadamente 20 y aproximadamente 150 mg/ml, polisorbato 80 en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 μ M, sorbitol o trehalosa en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 10% en peso por volumen, metionina en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 10 mg/ml, y al menos uno de succinato, histidina, fosfato, tartrato, maleato o citrato en una concentración de aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5, en donde la composición está exenta o sustancialmente exenta de cualquier combinación de tampones de citrato/fosfato.

20 25 En un ejemplo adicional de los ejemplos I y II, con estabilización de aminoácidos adicional, se proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab en una concentración de aproximadamente 20 y aproximadamente 150 mg/ml, polisorbato 80 en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 μ M, manitol, sorbitol o trehalosa (preferiblemente sorbitol) en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 10% en peso por volumen, y un aminoácido que es preferiblemente uno y no ambos de (a) arginina en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 mg/ml, y (b) glicina en una concentración de aproximadamente 20 a 200 mg/ml, y tampón de histidina o tampón succinato en una concentración de aproximadamente 5 mM y aproximadamente 50 mM, y en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5; y en donde la composición está exenta o sustancialmente exenta de cualquier combinación de tampones de citrato/fosfato.

30 35 En un ejemplo adicional del ejemplo IV, con estabilización de aminoácidos adicional, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa estable que comprende adalimumab en una concentración de aproximadamente 20 y aproximadamente 150 mg/ml, polisorbato 80 en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 50 μ M, arginina en una concentración de aproximadamente 1 a aproximadamente 250 mg/ml, glicina en una concentración de aproximadamente 20 a 200 mg/ml y tampón de histidina o tampón succinato en una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, y en donde dicha composición tiene un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5 y está exenta o sustancialmente exenta de poliol; y, opcionalmente, en donde la composición está preferiblemente exenta de cualquier combinación de tampón de citrato/fosfato.

40 45 Se prepararon numerosas realizaciones y ejemplos de las formulaciones de adalimumab de la presente descripción en ocho bloques separados de experimentos, denominados en la presente memoria "Bloque A" a "Bloque H". Cada bloque tenía de 12 a 16 formulaciones diferentes que se expusieron a condiciones de almacenamiento aceleradas, 1 semana a 40°C y 2 semanas a 25°C. Para cada tiempo de medición, la estabilidad química y física de la proteína adalimumab se midió por SEC, RP, UV, pH, CE-IEF y CE-SDS.

Materiales y métodos

1. Equipo usado en los estudios de formulación

Equipo	Fabricación	Modelo	Número de serie
Balanza	Sartorius	CPA124S	23350022
pH-ímetro	Denver Instrument	Modelo 250	E25006B100
UV	Cary	Bio 100	EL07103025
HPLC	Dionex 3	Ultimate 3000 UPLC	8047439
HPLC	Dionex 2	Ultimate 3000, UPLC	8036991
Beckman CE	Beckman	P/ACE	455436

Agilent CE	Agilent	3DCE 1600A	3546G00736
Agitador de balanceo	Labnet	Orbit P4	8091840

2. Productos químicos y materiales usados en los estudios de formulación

Productos químicos/Materiales	Productor	Pureza	Número de lote:
Citrato	Mallinckrodt	ACS	H28475
Fosfato	Fisher	FCC	103372
	Fisher	ACS	113670
Succinato	Spectrum	Reactiva	ZM0462
Histidina	Spectrum	USP	XV0239
	Spectrum	USP	ZG0216
Tartrato	Spectrum	FCC	1BC0152
Maleato	TCI	>99%	206-738-1
Manitol	BDH	USP	57910
Glicina	Spectrum	FCC	YM3312
	Spectrum	FCC	1 BJ0243
	Fisher	Calidad tejido	070082
Arginina	Spectrum	USP	2AK0238
	Spectrum	USP	1CB0771
Cloruro sódico	Mallinckrodt	ACS	J52619
	Macron	USP	26434
Polisorbato 80	Sigma-Aldrich	Bajo en peróxidos	028K5309
Sorbitol	Spectrum	NF	1AH0521
Trehalosa	Spectrum	N/A	1AE0739
Acetato	Mallinckrodt	FCC	H31613
EDTA	Sigma	98,5%	057K00071
Metionina	Spectrum	USP	ZF0377
F-68	Sigma	Cultivo celular	057K00331
Polisorbato 20	Spectrum	NF	1AE0882
Dodecilsulfato sódico	Fluka	ACS	1344034
Base Tris	Fisher	ACS	S61374
2-mercaptopetanol	Fisher	Electroforesis	107667

Material/Reactivos	Número de pieza	Suministrador
Slide-A-Lyzers corte molecular 7K	66373	Thermo
Unidades de Mini-Dialisis	69550	Thermo
Millex®-GV 0,22µM, Filtro	SLGV004SL	Millipore
Viales de 1 ml	4500050375	SCHOTT
Solución de polímero gel de cIEF	477497	Beckman Coulter
Kit de marcador pl	A58481	Beckman Coulter
Anfolito Pharmalyte 3-10	17-0456-01	GE Healthcare
Capilar de sílice fundida (50 µm d.i.)	TSP050375	Polymicro
SDS-tampón gel de PM	A10663	Beckman
Referencia interna de 10 kD	A26487	Beckman

3. Columnas de HPLC usadas en los estudios de formulación

Columna	Empresa	Nº pieza	Lote
Poroshell 300SB-C8, 2,1x75mm, 5um	Agilent	660750-906	USZW003083
Poroshell 300SB-C8, 2,1 x75mm, 5um	Agilent	660750-906	USZW003073
ACQUITY UPLC BEH200 SEC, Columna de 1,7 um, 4,6 x 150 mm	Waters	186005225	138123331
ACQUITY UPLC BEH200 SEC, Columna de 1,7 um, 4,6 x 150 mm	Waters	186005225	01471130951

Procesamiento de Humira®. Los experimentos del Bloque A usaban adalimumab presente en Humira® disponible en el mercado. El material de Humira® se dializó como sigue: se pusieron 100 µl de Humira® en unidades de Mini-Dialisis

con MWCO (corte de exclusión de peso molecular)3,5 y se dializaron en 1 litro de tampón de formulación durante 24 horas de 4 a 8°C. Algunas muestras experimentaron un pequeño aumento de volumen debido a la diáisisis, pero nunca hasta el punto de que la concentración del polisorbato 80 cayera por debajo de la CMC (concentración micelar crítica).

5 La concentración de proteínas para cada formulación se midió por espectroscopía de absorbancia UV, usando una capacidad de absorción molar experimental calculada basada en la concentración descrita de Humira®, 50 mg/ml. Para una serie de las formulaciones, la concentración de proteínas se ajustó usando un concentrador centrífugo. La muestra se colocó en el concentrador centrífugo y rotó a 14.000 RPM durante 30 a 60 segundos. Después la concentración de proteínas se verificó con UV. Después de alcanzar la concentración de proteína objetivo de aproximadamente 50 mg/ml, las muestras se filtraron a través de un filtro estéril de 0,22 µM en viales estériles en una campana de bioseguridad. Despues las muestras se pusieron de forma estable a 40°C durante una y dos semanas.

10 Procesamiento de una proteína adalimumab patentada. Los estudios de formulación descritos en la presente memoria usaron una proteína biosimilar de adalimumab patentada que no contenía polisorbato 80. El material se dializó usando Slide-A-Lyzers de MWCO 7.000 en diferentes tampones de formulación durante 24 horas en un intervalo de temperatura entre 4 y 8°C. Despues de la diáisisis, se midió la concentración de proteína por UV y se midió el pH de la muestra. La concentración objetivo de las muestras era $50 \pm 2,5$ mg/ml, que se ajustó si la concentración de la muestra caía fuera del intervalo anterior. Algunas de las muestras experimentaron un aumento del volumen de muestra debido a la dilución, requiriendo el aumento de la concentración de proteína. Para estas muestras, la concentración de proteína se aumentó usando concentradores centrífugos, normalmente a 14.000 rpm durante 30 a 60 segundos. El pH de una serie de muestras se ajustó usando NaOH 1 M o HCl 1 M para alcanzar el pH objetivo de 5,2.

15 20 Despues de determinar que la concentración de proteína objetivo y el pH de las muestras estaban dentro de los parámetros experimentales, las muestras se filtraron a través de un filtro estéril de 0,22 µM en viales estériles en una campana de bioseguridad. Despues las muestras se colocaron en forma estable a 40°C durante una semana y a 25°C durante dos semanas.

25 Condiciones de congelación-descongelación: Las muestras de congelación y descongelación se prepararon el día del análisis para que correspondiera a $t = 0$. Las muestras se congelaron a -80°C entre 3 y 7 minutos. La muestra congelada despues se descongeló a temperatura ambiente hasta que todo el hielo se había descongelado. El ciclo de congelación y descongelación se repitió 5 veces para cada muestra.

30 Estudios de agitación. Las muestras se agregaron a 150 rpm durante 24 horas a 4°C en un agitador de balanceo. Se preparó un control y se colocó al lado del agitador de balanceo para cada muestra que se sometió a agitación.

35 30 Mediciones de pH. El pH de cada muestra se midió usando una sonda de microelectrodo de pH. Antes del inicio del análisis, la sonda de pH se calibró con tres patrones de pH encargados de Fisher. Los valores de pH de las muestras de estabilidad se midieron transfiriendo 60 µl de cada muestra de estabilidad a un tubo de PCR de 100 µl. La sonda de microelectrodo de pH se sumergió en la muestra y se registró despues de que se estabilizara el valor.

40 Espectroscopía de absorbancia UV. Se usó espectroscopía UV para medir la concentración de proteína en las muestras. El coeficiente de extinción molar a 280 nm para la sustancia en masa era de 1,6355 mg/ml, que se determinó de manera empírica. Las concentraciones de proteína de todas las formulaciones para LB-140 se midieron usando una longitud de paso de celda de 0,0096 cm. A continuación, se muestran los parámetros de análisis usados para LB-140.

Intervalo de barrido: de 400 a 200 nm

45 40 Tiempo promedio (min): 0,1

Intervalo de datos (nm): 1

Velocidad de barrido (nm/min): 600

Recuento de ciclos: 5

45 Método de cromatografía de exclusión por tamaños (SEC). El método SEC usado para analizar las muestras de estabilidad LB-140 se desarrolló en Legacy BioDesign. A continuación, se da un breve resumen de los parámetros del método SEC usado para el análisis de las muestras LB-140.

Parámetros del método

Información de la columna: ACQUITY UPLC BEH200 SEC, columna de 1,7 um, 4,6 x 150 mm

Tampón de análisis: fosfato 50 mM, NaCl 250 mM, pH 6,8

Caudal: 0,3 ml/min

Temperatura de la columna: 30°C

Detección: 280 nm

Volumen de inyección: 2 µl

5 Temperatura de la muestra: aprox. 5°C

Método RP-HPLC. Se encontró que el método RP HPLC indicaba la estabilidad y se usó para analizar muestras de estabilidad LB-140. A continuación, se da un resumen de los parámetros del método RP usado para el análisis de LB-140.

Parámetros del método

10 Información de columna: Poroshell 300SB-C8,2,1x75mm, 5um

Fase móvil A: 98% (v/v) de H₂O/2% (v/v) de IPA/0,1% (v/v) de TFA

Fase móvil B: 10% (v/v) de H₂O/70% (v/v) de IPA/20% (v/v) de ACN /0,1% (v/v) de TFA

Caudal: 0,25 ml/min

Temperatura de la columna: 80°C

15 Detección: 225 nm

Volumen de inyección: 1 µl

Temperatura de la muestra: aprox. 5°C

Tiempo de análisis: 15 minutos

Gradiente:

Tiempo	% de A	% de B
0	100	0
10	50	50
10,1	100	0
15	100	0

20 Análisis CE-IEF. El enfoque isoelectrónico capilar (cIEF) se realizó como se describe en la Guía de aplicación de PA 800 plus publicada por Beckman Coulter. Se puede encontrar una descripción más detallada en un artículo de investigación publicado por Mack et al.¹. Todos los análisis se llevaron a cabo usando un sistema Beckman Coulter P/ACE MDQ (Beckman Coulter, Inc.; Brea, CA) operado a temperatura ambiente con un capilar neutro de 30 cm de longitud total (20 cm efectivos). El capilar neutro se preparó inmovilizando poli(acrilamida) en la pared del capilar usando un método descrito por Gao et al.². Las muestras de cIEF se prepararon mezclando la proteína de interés en 0,25 mg/ml con una mezcla de gel de urea-cIEF 3 M que contenía anfolito, estabilizante catódico, estabilizante anódico y marcadores de pl. La muestra se inyectó a presión a 0,66 kg/cm² (9,5 psi) en el capilar durante 4,1 minutos, y después de este tiempo se enfocó aplicando un voltaje de 25 kV durante 15 minutos entre el analito y el catolito. A esta etapa le siguió la movilización química a 30 kV durante 30 minutos entre el analito y el movilizador químico. Los marcadores de pl y la proteína de interés se detectaron con absorbancia a 280 nm durante la etapa de movilización. El pl de la proteína se calculó a partir de la ecuación de regresión resultante de pl frente al momento del primer pico obtenido a partir de los patrones de pl.

35 Análisis por CE-SDS. El análisis por CE-SDS se llevó a cabo en condiciones reductoras usando un método adaptado del SOP publicado por Beckman-Coulter para determinar la pureza/heterogeneidad de IgG. Brevemente, el anticuerpo se diluyó con agua DDI a 6 mg/ml, se desnaturalizó añadiendo tampón de muestra (Tris 0,1 M/SDS al 1,0%, pH 8,0) y se redujo por adición de 2-mercaptoetanol; la concentración final de anticuerpos era 1,2 mg/ml. La desnaturalización y la reducción se facilitaron calentando la muestra a 70°C durante 10 min. La muestra se enfrió durante 10 minutos a temperatura ambiente antes del análisis. Se empleó una etapa de centrifugación (300 g, 5 min) antes de calentar la muestra y directamente después de enfriarla. El análisis de CE se llevó a cabo un sistema Beckman Coulter P/ACE MDQ operado a temperatura ambiente con un capilar de 30 cm de longitud total (20 cm efectivos, 50 µm de d.i.). Antes de introducir la muestra, el capilar se enjuagó secuencialmente con NaOH 0,1 M, HCl 0,1 M, agua DDI y solución

tampón de gel de SDS. La muestra se inyectó de forma electrocinética a 5 kV durante 30 s seguido de separación a 30 kV durante 30 min. Tanto para la inyección como para la separación, el instrumento se operó en modo de polaridad inversa. Se detectaron fragmentos de anticuerpos usando absorbancia a 214 nm (adquisición a 4 Hz) y se dieron áreas normalizadas en el tiempo para los picos medidos.

5 Estudios de formulaciones del bloque A

Los estudios del bloque A examinaban diferentes sistemas de tampones y usaban un material de adalimumab disponible en el mercado que se reprocesó para estos estudios. Se observa que la patente de EE.UU. 8.216.583 hace referencia a la estabilidad de una formulación de adalimumab en relación con el uso de un sistema tampón de citrato/fosfato a pH 5,2, y de hecho la patente requería el uso de dicha combinación de tampones. El trabajo que se ha hecho, reflejado aquí, indica que el citrato/fosfato es, de hecho, una elección de tampón bastante mala en comparación con otros tales como histidina y succinato. En los estudios del bloque A continuación, el pH se mantuvo constante en 5,2. Las concentraciones de manitol y polisorbato 80 también se mantuvieron constantes. Las muestras se mantuvieron a 40°C durante dos semanas. El diseño del estudio se resume en la tabla a continuación.

Tabla A

Diseño del estudio del bloque A

Forma N°	API	Citrato (mM)	Fosfato (mM)	Succinato (mM)	Histidina (mM)	Tartato (mM)	Maleato (mM)	Manitol (mM)	PS80 (%)
1	Humira®	8	18	0	0	0	0	12	0,1
2	Humira®	10	0	0	0	0	0	12	0,1
3	Humira®	0	10	0	0	0	0	12	0,1
4	Humira®	0	0	10	0	0	0	12	0,1
5	Humira®	0	0	0	10	0	0	12	0,1
6	Humira®	0	0	0	0	10	0	12	0,1
7	Humira®	0	0	0	0	0	10	12	0,1

El análisis por SEC mostró que la formulación solo con citrato tenía peor comportamiento que la combinación de tampones (Tabla A), lo que indica que el fosfato era el estabilizante principal en esa combinación. Esto era sorprendente e inesperado, ya que este pH está fuera del intervalo de capacidad de tamponamiento nominal del fosfato, pero dentro del intervalo de tamponamiento para el citrato. Además, el succinato, la histidina y el tartrato funcionaron tan bien o mejor que la combinación de citrato/fosfato, lo que indica que otros sistemas tampón proporcionarían una estabilidad igual o superior para adalimumab. Por consiguiente, la presente invención en una de sus realizaciones se dirige a formulaciones de adalimumab que presentan estabilidad a largo plazo, en donde se evita una combinación de tampones de citrato y fosfato a favor de histidina. La pureza de estas muestras almacenadas se verificó usando RP HPLC (Figura 2). Al igual que por SEC, la formulación de citrato presentaba la peor estabilidad, mientras que todos los demás tampones funcionaron tan bien o mejor que la combinación de tampones que se encuentra en el adalimumab disponible en el mercado (Humira®). Estos resultados demuestran el descubrimiento de los autores de la invención de que cambiar el tampón (es decir, evitar la combinación de tampones de citrato/fosfato del adalimumab comercial) podría mejorar el perfil de estabilidad del adalimumab.

15 Estudios de formulaciones del bloque B

Se llevó a cabo un segundo estudio ("Bloque B") que examinaba solo cambios en las especies de tampón, donde no se cambiaba el pH (5,2), como se describe en la tabla a continuación denominada "Diseño del estudio del bloque B". En este caso, la formulación disponible en el mercado para Humira® se usó como control, mientras que todas las otras formulaciones usaban una proteína biosimilar de adalimumab patentada. La Tabla B-1, a continuación, resume el porcentaje de monómero para las formulaciones del bloque B (así como la cantidad en porcentaje de una impureza que se determinó que era un fragmento de la proteína adalimumab).

Tabla B
Diseño del estudio del bloque B

Forma Nº	API	Citrato (mM)	Fosfato (mM)	Succinato (mM)	Histidina (mM)	Tartrato (mM)	Maleato (mM)	Manitol (mM)	PS80 (%)
1	Humira®	8	18	0	0	0	0	12	0,1
2	Biosimilar de Adalimumab	10	0	0	0	0	0	12	0,1
3	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	0	0	0	12	0,1
4	Biosimilar de Adalimumab	0	0	10	0	0	0	12	0,1
5	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	10	0	0	12	0,1
6	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	0	10	0	12	0,1
7	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	0	0	10	12	0,1

ES 2 784 861 T3

Tabla B-1

Porcentaje de monómero para las formulaciones del bloque B en t0 y después de dos semanas a 40°C (t2)

Forma N°	API	Tampón	Monómero (t0)	Monómero (t2)	Fragmento (t0)	Fragmento (t2)
1	Humira®	Citrato/fosfato	99,34		0,26	
2	Biosimilar de Adalimumab	citrato	98,71	97,92	0,62	0,40
3	Biosimilar de Adalimumab	fosfato	99,21	98,07	0,05	0,30
4	Biosimilar de Adalimumab	succinato	99,19	98,04	0,04	0,31
5	Biosimilar de Adalimumab	histidina	99,19	98,41	0,07	0,23
6	Biosimilar de Adalimumab	tartrato	99,13	98,10	0,04	0,29
7	Biosimilar de Adalimumab	maleato	98,91	97,90	0,36	0,76

Como se puede ver en la Tabla B-1 anterior, tras el almacenamiento durante dos semanas a 40°C, el contenido de monómero disminuye en más de 1% para todas las muestras en el bloque B, excepto para la que contiene el tampón de histidina (His) (Tabla B-1). A partir de este estudio se descubrió la probabilidad de que la His fuera un sistema de tampón superior para adalimumab. (Se observa que el nivel de fragmentos medido por SEC dado para la formulación 2 parece ser incorrecto ya que todos los otros niveles de fragmentos iniciales son menores de 0,1%).

5 Estudios de formulaciones del bloque C.

Se llevó a cabo un estudio de cribado de formulaciones a gran escala en los estudios realizados en el bloque C (véase la Tabla C, a continuación). Las muestras se almacenaron durante una semana a 40°C (en lo sucesivo denominado "t1") o dos semanas a 25°C (en lo sucesivo denominado "t2"). Estas condiciones se usaron durante el resto de los 10 estudios, por lo que esta terminología se empleará a lo largo de toda la presente descripción detallada. El bloque C se diseñó para ampliar la evaluación de tampón realizada en el bloque B. Además, examinaba la glicina (Gly) y/o arginina (Arg) como posibles estabilizantes en lugar de manitol y/o NaCl (Tabla C). Obsérvese que el sistema de tampón usado en el producto Humira® emplea el tampón de citrato 8 mM/fosfato 18 mM, que es la composición de la formulación 1 15 del bloque C. En este caso, se usó una proteína biosimilar de adalimumab patentada para la formulación 1 del bloque C, en lugar de la proteína adalimumab obtenida de Humira® disponible en el mercado.

Tabla C
Diseño del estudio del bloque C

Forma Nº	API	citrato	fosfato	succinato	histidina	glicina	arginina	manitol	NaCl
1	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	0	0	65	100
2	Biosimilar de Adalimumab	18	8	0	0	0	0	65	100
3	Biosimilar de Adalimumab	20	0	0	0	0	0	65	100
4	Biosimilar de Adalimumab	20	0	0	0	65	0	0	100
5	Biosimilar de Adalimumab	0	20	0	0	65	0	0	100
6	Biosimilar de Adalimumab	20	0	0	0	0	65	0	100
7	Biosimilar de Adalimumab	0	20	0	0	0	65	0	100
8	Biosimilar de Adalimumab	0	0	20	0	65	0	0	100
9	Biosimilar de Adalimumab	0	0	20	0	0	65	0	100
10	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	20	65	0	0	100
11	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	20	0	65	0	100
12	Biosimilar de Adalimumab	0	20	0	0	0	130	0	35
13	Biosimilar de Adalimumab	0	0	20	0	0	130	0	35
14	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	20	0	130	0	35
15	Biosimilar de Adalimumab	0	20	0	0	130	0	0	60
16	Biosimilar de Adalimumab	0	20	0	20	130	0	0	60

ES 2 784 861 T3

Tabla C-1

pH medido para las formulaciones del bloque C en t0 y t1 (una semana, 40°C)

Forma N°	citrato	fosfato	succinato	histidina	glicina	arginina	manitol	NaCl	pH t0	pH t2
1	8	18	0	0	0	0	65	100	5,51	5,57
2	18	8	0	0	0	0	65	100	5,46	5,43
3	20	0	0	0	0	0	65	100	5,28	5,27
4	20	0	0	0	65	0	0	100	5,27	5,24
5	0	20	0	0	65	0	0	100	5,43	5,44
6	20	0	0	0	0	65	0	100	5,29	5,29
7	0	20	0	0	0	65	0	100	5,28	5,32
8	0	0	20	0	65	0	0	100	5,22	5,17
9	0	0	20	0	0	65	0	100	5,19	5,16
10	0	0	0	20	65	0	0	100	5,28	5,30
11	0	0	0	20	0	65	0	100	5,26	5,29
12	0	20	0	0	0	130	0	35	5,24	5,24
13	0	0	20	0	0	130	0	35	5,18	5,16
14	0	0	0	20	0	130	0	35	5,28	5,35
15	0	20	0	0	130	0	0	60	5,31	5,31
16	0	20	0	20	130	0	0	60	5,36	5,40

Tabla C-2

Contenido de monómero por SEC para las formulaciones del bloque C en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma N°	citrato	fosfato	succinato	His	Gly	Arg	manitol	NaCl	t0	t1	t2
1	8	18	0	0	0	0	65	100	98,75	97,90	98,06
2	18	8	0	0	0	0	65	100	99,26	98,22	98,80
3	20	0	0	0	0	0	65	100	99,28	98,32	98,78
4	20	0	0	0	65	0	0	100	99,36	98,45	99,03
5	0	20	0	0	65	0	0	100	99,25	98,20	98,77
6	20	0	0	0	0	65	0	100	99,42	98,68	99,10
7	0	20	0	0	0	65	0	100	99,39	98,59	99,13
8	0	0	20	0	65	0	0	100	99,41	98,51	99,04
9	0	0	20	0	0	65	0	100	99,36	98,52	98,96
10	0	0	0	20	65	0	0	100	99,41	98,66	99,15
11	0	0	0	20	0	65	0	100	99,37	98,70	99,15
12	0	20	0	0	0	130	0	35	99,41	98,66	99,14
13	0	0	20	0	0	130	0	35	99,42	98,71	99,17
14	0	0	0	20	0	130	0	35	99,40	98,75	99,26
15	0	20	0	0	130	0	0	60	99,32	98,53	99,05
16	0	20	0	20	130	0	0	60	99,40	98,66	99,19

Tabla C-3

Porcentaje de pureza por RP HPLC para formulaciones en el bloque C en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma N°	citrato	fosfato	succinato	His	Gly	Arg	manitol	NaCl	t0	t1	t2
1	8	18	0	0	0	0	65	100	98,04	97,92	98,10
2	18	8	0	0	0	0	65	100	97,94	97,83	98,03
3	20	0	0	0	0	0	65	100	98,03	97,92	98,00
4	20	0	0	0	65	0	0	100	97,94	97,75	97,98
5	0	20	0	0	65	0	0	100	97,98	97,69	97,95
6	20	0	0	0	0	65	0	100	97,89	97,72	97,92
7	0	20	0	0	0	65	0	100	97,80	97,70	97,91
8	0	0	20	0	65	0	0	100	97,98	97,77	98,01
9	0	0	20	0	0	65	0	100	97,98	97,73	97,94
10	0	0	0	20	65	0	0	100	97,98	97,76	98,00
11	0	0	0	20	0	65	0	100	97,87	97,78	97,97
12	0	20	0	0	0	130	0	35	97,88	97,71	97,95
13	0	0	20	0	0	130	0	35	97,95	97,62	97,93
14	0	0	0	20	0	130	0	35	97,98	97,72	98,04
15	0	20	0	0	130	0	0	60	97,91	97,72	97,96
16	0	20	0	20	130	0	0	60	98,00	97,79	97,78

ES 2 784 861 T3

Tabla C-4

Porcentaje de bandas principales observadas en el perfil de cIEF de formulaciones en el bloque C ent0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma N°	pH	t0	t1	t2
1	8,59	1,94	1,97	1,82
	8,43	11,76	11,30	12,49
	8,27	58,29	49,88	51,54
	8,20		7,18	7,59
	8,05	21,49	22,38	19,79
	7,86	6,53	5,35	4,66
2	8,60	1,96		1,84
	8,44	12,08		10,89
	8,29	51,70		47,63
	8,22	9,74		12,32
	8,09	16,29		18,25
	7,91	3,50		3,64
3	8,60	1,83	1,82	1,12
	8,43	11,58	9,67	10,40
	8,27	45,80	32,99	44,04
	8,20	12,44	22,27	18,68
	8,01	17,57	16,21	14,40
	7,86	4,39		3,61
4	8,57	2,31	2,04	2,13
	8,41	12,94	11,51	12,62
	8,25	33,37	59,98	61,97
	8,20	23,03		
	8,02	15,21	18,33	16,07
	7,88	3,45	5,32	3,70
5	8,58	2,40	2,00	2,30
	8,41	13,01	11,02	12,34
	8,25	42,09	46,32	37,30
	8,21	15,58	10,65	15,80
	8,03	18,48	20,58	16,80
	7,86	3,74	6,13	4,83
6	8,57			2,83
	8,38	13,17		13,23
	8,23	32,66		31,18
	8,18	17,52		18,54
	8,02	17,48		13,82
	7,91	5,30		5,83
7	8,58	2,08	2,41	2,64
	8,44	13,42	12,64	12,63

ES 2 784 861 T3

	8,27	56,79	52,48	54,76
	8,16	5,36	6,16	6,38
	8,04	16,91	20,09	18,45
	7,94	5,44	4,12	5,15
8	8,57	1,76	2,37	1,55
	8,44	14,41	12,13	11,61
	8,29	60,01	48,87	52,94
	8,19		7,07	10,66
	8,10	16,22	16,55	17,10
	7,95	7,61	5,02	4,55
9	8,58	2,19	2,06	0,99
	8,41	11,69	10,64	12,73
	8,26	50,07	44,21	60,33
	8,19	10,66	10,39	
	8,01	15,62	21,51	17,79
	7,87	4,67	5,37	8,16
10	8,57	1,78	2,64	1,62
	8,41	10,55	10,95	8,11
	8,25	43,82	42,93	36,11
	8,21	15,96	15,24	17,66
	8,02	14,63	14,58	14,22
	7,88	3,82	4,21	3,95
11	8,58	1,59	1,81	1,89
	8,41	12,98	11,58	12,86
	8,23	62,74	29,63	12,00
	8,19		22,86	34,77
	8,02	17,15	19,52	17,06
	7,87	5,54	5,56	4,77
12	8,61	0,35	1,57	1,47
	8,35	13,24	13,41	8,83
	8,19	43,18	60,12	26,52
	8,15	15,43	20,46	25,60
	7,98	16,74		17,38
	7,88	4,96	4,44	4,99
13	8,58	1,71		1,67
	8,41	11,63		10,01
	8,26	49,19		42,65
	8,20	14,25		16,64
	8,03	17,35		18,12
	7,86	4,28		4,18
14	8,56	1,64	1,79	1,73
	8,39	13,17	10,45	10,96
	8,25	58,68	46,06	45,60
	8,21		11,03	13,34
	8,07	14,10	20,24	14,50
	7,92	2,10	5,13	4,28
15	8,57	1,74	1,22	1,60
	8,41	10,49	15,21	10,78

	8,25	46,06	55,05	44,98	
	8,20	14,46		13,79	
	8,02	13,90	20,31	10,79	
	7,89	4,23	4,90	3,43	
16	8,56	1,96	1,08		
	8,40	9,25	12,23	12,58	
	8,24	38,08	31,03	58,61	
	8,20	19,02	22,08	21,50	
	8,03	12,00	13,24	7,31	
	7,89	4,73	4,82		

Tabla C-5

Porcentaje de bandas para la cadena ligera (LC), cadena pesada (HC), HC no glicosilada, y otras especies para las formulaciones en el bloque C en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma N°	Tiempo	LC	HC	ngHC	Otros
1	t0	35,87	63,20	0,51	0,42
	t1	29,71	63,08	0,37	6,84
	t2	31,01	67,83	0,54	0,61
2	t0	29,50	69,57	0,56	0,37
	t1	30,51	67,28	0,56	1,65
	t2	32,32	65,51	0,56	1,61
3	t0	32,53	66,45	0,54	0,47
	t1	33,04	65,34	0,55	1,07
	t2	31,94	66,60	0,57	0,90
4	t0	33,40	64,90	0,46	1,24
	t1	30,96	67,16	0,52	1,36
	t2	32,08	65,84	0,56	1,52
5	t0	34,17	63,89	0,49	1,45
	t1	33,60	64,27	0,56	1,57
	t2	32,15	66,20	0,48	1,17
6	t0	37,91	60,35	0,54	1,19
	t1	34,80	62,88	0,73	1,59
	t2	32,90	65,62	0,50	0,99
7	t0	32,17	66,80	0,55	0,49
	t1	29,83	68,33	0,59	1,25
	t2	33,32	65,97	0,55	0,15
8	t0	33,83	65,51	0,49	0,17
	t1	30,37	68,48	0,58	0,57
	t2	32,86	66,40	0,55	0,19
9	t0	30,69	69,31	0,00	0,00
	t1	34,30	64,24	0,52	0,94
	t2	29,08	69,87	0,62	0,43
10	t0	38,68	59,95	0,57	0,80
	t1	36,52	58,65	0,00	4,83
	t2	43,68	54,39	1,92	0,00
11	t0	35,25	59,00	1,75	4,00
	t1	30,71	67,58	0,66	1,05
	t2	30,18	67,14	0,47	2,21
13	t0	44,58	55,42	0,00	0,00
	t1	37,73	60,75	0,25	1,28
	t2	38,05	61,44	0,52	0,00
14	t0	32,50	66,66	0,60	0,24
	t1	30,91	67,77	0,61	0,70
	t2	29,14	70,32	0,23	0,31
15	t0	30,07	68,95	0,63	0,35
	t1	30,14	68,49	0,62	0,75
	t2	31,57	67,55	0,62	0,26
16	t0	30,54	68,61	0,63	0,22

Forma Nº	Tiempo	LC	HC	ngHC	Otros
	t1	29,81	68,81	0,63	0,75
	t2	29,46	69,14	0,59	0,81

Discusión de los resultados del bloque C

Con referencia a la Tabla C-1 anterior, se midió el pH y se encontró que era relativamente estable para todas las formulaciones. Sin embargo, los valores iniciales de pH eran ligeramente más altos para las formulaciones de citrato/fosfato. La formulación menos estable por análisis de SEC parece que es la formulación 1, la que usa el sistema de tampón de Humira®. En comparación, se descubrió que las formulaciones que usan His como el tampón y/o las formulaciones que contienen Gly o Arg presentaban la mayor estabilidad (véase la tabla C-2). Se observan tendencias similares cuando se considera la pureza por RP HPLC (véase la tabla C-3). Parece que SEC puede ser un mejor método indicador de estabilidad que la RP HPLC, aunque, cuando se considera en su conjunto, parece que el método de RP HPLC indica la estabilidad. Basándose en los datos del bloque C resumidos antes, se ha descubierto que la histidina es adecuada como tampón preferido en términos de estabilidad de la formulación, y que la glicina o arginina, o combinaciones de las mismas, también son componentes potenciadores de la estabilidad para la inclusión en una formulación de adalimumab.

Las muestras almacenadas se analizaron además por cIEF en t1 y t2 (tabla C-4 anterior). Un material de adalimumab patentado presenta de cuatro a cinco picos con intensidades integradas superiores a 1% o similar. En general, hay algunas pequeñas disminuciones en la intensidad del pico principal tras el almacenamiento. Estas pérdidas normalmente son mayores en t1 que en t2. No obstante, no se observan nuevos picos significativos, lo que sugiere que se produce una degradación química mínima que conduciría a cambios en la carga general de la proteína. La variación en los datos indica que este método, aunque es útil para la caracterización, no parece que indique la estabilidad.

El método analítico final usado para evaluar la estabilidad de la formulación de adalimumab es CE-SDS, que es esencialmente la versión CE de los geles de placa de SDS-PAGE. Este método indica que las áreas relativas del pico de LC disminuyen cuando se almacenan a temperaturas elevadas (tabla C-5), mientras que aumenta la cantidad de picos nuevos (de forma acumulada llamados "Otros"). Todos juntos, estos cambios normalmente son menores que 2% para cualquiera de las formulaciones. Hay algunas muestras donde el porcentaje de "Otros" está en el intervalo de 4-6%, pero estos son probablemente artefactos.

Estudio de formulaciones del bloque D

Otro conjunto de formulaciones se evaluó como "Bloque D". Se diseñaron 16 formulaciones para evaluar otros estabilizantes como alternativas al manitol, tales como el sorbitol y la trehalosa (véase la tabla D). El bloque D también examinaba el uso de manitol o NaCl como único agente de tonicidad, en lugar de usar una mezcla de los dos excipientes. La estabilidad del pH de las formulaciones era bastante buena, aunque los valores de pH iniciales reales eran ligeramente más bajos que los valores objetivo para algunas formulaciones (Tabla D-1).

Tabla D

Diseño del estudio del bloque D

Forma Nº	API	citrato	fósforo	sorbitol	trehalosa	manitol	NaCl	PS 80
1	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	65	100	0,1
2	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	65	100	0
3	Biosimilar de Adalimumab	20	0	0	0	65	100	0,1
4	Biosimilar de Adalimumab	20	0	0	0	65	100	0
5	Biosimilar de Adalimumab	0	20	0	0	65	100	0,1
6	Biosimilar de Adalimumab	0	20	0	0	65	100	0
7	Biosimilar de Adalimumab	8	18	65	0	0	100	0,1
8	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	65	0	100	0,1
9	Biosimilar de Adalimumab	0	20	65	0	0	100	0,1
10	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	0	240	0	0,1
11	Biosimilar de Adalimumab	0	10	240	0	0	0	0,1
12	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	240	0	0	0,1
13	Biosimilar de Adalimumab	10	0	0	0	0	150	0,1
14	Biosimilar de Adalimumab	10	0	0	0	0	150	0
15	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	0	0	150	0,1
16	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	0	0	150	0

Tabla D-1

pH medido para las formulaciones del bloque D en t0 y t1 (una semana, 40°C)

Forma Nº	API	citrato	fosfato	sorbitol	trehalosa	manitol	NaCl	PS80	t0	t1	t2
1	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	65	100	0,1	5,09	5,17	5,12
2	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	65	100	0	5,12	5,16	5,16
3	Biosimilar de Adalimumab	20	0	0	0	65	100	0,1	5,11	5,16	5,14
4	Biosimilar de Adalimumab	20	0	0	0	65	100	0	5,13	5,17	5,18
5	Biosimilar de Adalimumab	0	20	0	0	65	100	0,1	5,19	5,25	5,24
6	Biosimilar de Adalimumab	0	20	0	0	65	100	0	5,16	5,24	5,17
7	Biosimilar de Adalimumab	8	18	65	0	0	100	0,1	5,14	5,17	5,18
8	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	65	0	100	0,1	5,15	5,21	5,16
9	Biosimilar de Adalimumab	0	20	65	0	0	100	0,1	5,19	5,29	5,28
10	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	0	240	0	0,1	5,23	5,28	5,27
11	Biosimilar de Adalimumab	0	10	240	0	0	0	0,1	5,45	5,35	5,33
12	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	240	0	0	0,1	5,44	5,32	5,31
13	Biosimilar de Adalimumab	10	0	0	0	0	150	0,1	5,30	5,25	5,23
14	Biosimilar de Adalimumab	10	0	0	0	0	150	0	5,39	5,20	5,18
15	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	0	0	150	0,1	5,35	5,30	5,22
16	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	0	0	150	0	5,41	5,33	5,28

Tabla D-2

Contenido de monómero por SEC para formulaciones en el bloque D en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma N°	API	citrato	fosfato	sorbitol	trehalosa	manitol	NaCl	PS80	t0	t1	t2
1	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	65	100	0,1	99,28	98,21	98,96
2	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	65	100	0	99,25	98,11	98,85
3	Biosimilar de Adalimumab	20	0	0	0	65	100	0,1	99,25	98,16	98,86
4	Biosimilar de Adalimumab	20	0	0	0	65	100	0	99,27	98,26	98,92
5	Biosimilar de Adalimumab	0	20	0	0	65	100	0,1	99,24	98,16	98,84
6	Biosimilar de Adalimumab	0	20	0	0	65	100	0	99,21	98,23	98,82
7	Biosimilar de Adalimumab	8	18	65	0	0	100	0,1	99,30	98,19	98,94
8	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	65	0	100	0,1	99,28	98,14	98,85
9	Biosimilar de Adalimumab	0	20	65	0	0	100	0,1	99,29	98,23	98,90
10	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	0	240	0	0,1	97,93	98,54	
11	Biosimilar de Adalimumab	0	10	240	0	0	0	0,1	99,32	98,65	99,00
12	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	240	0	0	0,1	99,32	98,53	98,96
13	Biosimilar de Adalimumab	10	0	0	0	0	150	0,1	99,29	98,12	98,84
14	Biosimilar de Adalimumab	10	0	0	0	0	150	0	99,28	98,28	
15	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	0	0	150	0,1	99,26	97,99	98,83
16	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	0	0	150	0	99,20	97,76	98,62

Tabla D-3

Porcentaje de pureza por RP HPLC para formulaciones en el bloque D en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma Nº	API	cítrato	fosfato	sorbitol	trehalosa	manitol	NaCl	PS80	t0	t1	t2
1	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	65	100	0,1	98,17	97,75	98,02
2	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	65	100	0	98,09	97,84	98,08
3	Biosimilar de Adalimumab	20	0	0	0	65	100	0,1	98,03	97,81	98,19
4	Biosimilar de Adalimumab	20	0	0	0	65	100	0	98,17	97,85	98,06
5	Biosimilar de Adalimumab	0	20	0	0	65	100	0,1	98,11	97,88	98,18
6	Biosimilar de Adalimumab	0	20	0	0	65	100	0	98,21	97,77	98,10
7	Biosimilar de Adalimumab	8	18	65	0	0	100	0,1	98,11	97,80	98,14
8	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	65	0	100	0,1	98,06	97,73	98,03
9	Biosimilar de Adalimumab	0	20	65	0	0	100	0,1	98,09	97,80	98,07
10	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	0	240	0	0,1	98,13	97,82	98,08
11	Biosimilar de Adalimumab	0	10	240	0	0	0	0,1	98,10	97,90	98,06
12	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	240	0	0	0,1	98,13	97,95	98,14
13	Biosimilar de Adalimumab	10	0	0	0	0	150	0,1	98,07	97,79	98,02
14	Biosimilar de Adalimumab	10	0	0	0	0	150	0	98,13	97,78	98,14
15	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	0	0	150	0,1	98,17	97,80	98,10
16	Biosimilar de Adalimumab	0	10	0	0	0	150	0	98,14	97,79	98,06

Tabla D-4

Porcentaje de las bandas principales observadas en el perfil de cIEF de formulaciones en el bloque D en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma Nº	pH	t0	t1	t2
1	8,56	2,26		1,81
	8,41	13,84	12,88	11,73
	8,25	62,27	59,80	56,15
	8,14			6,48
	8,04	15,71	22,93	13,73
	7,99	5,92	4,39	4,13
2	8,55	2,08		1,58
	8,40	12,89		12,58
	8,24	60,15		53,24
	8,14	5,98		6,69
	8,03	11,92		9,72
	7,98	3,65		5,67
3	8,57	1,58	2,10	1,89
	8,41	11,87	11,83	11,99
	8,26	54,93	54,45	54,51
	8,16	9,10	6,31	8,24
	8,05	9,21	11,16	10,22
	7,91	7,60	4,16	5,26
4	8,57	3,57	1,82	1,05
	8,40	11,12	10,66	10,83
	8,24	49,37	47,85	42,34
	8,14	3,01	1,83	3,68
	8,03	10,11	10,06	17,12
	7,90	2,78	4,72	3,84
5	8,55	2,30	2,18	2,13
	8,40	7,63	8,86	8,63
	8,25	33,90	14,41	16,64
	8,20	23,41	33,90	33,75
	8,03	10,14	20,39	19,42
	7,99	6,76	5,42	4,63
6	8,59	1,87		1,39
	8,42	11,25	11,18	11,89
	8,27	50,07	61,72	64,17
	8,20	12,43	22,08	19,18
	8,03	10,20		
	7,91	2,70	5,01	3,38
7	8,55			
	8,40			
	8,25			

ES 2 784 861 T3

	8,20			
	8,03			
	7,99			
8	8,59	1,46	2,64	1,16
	8,39	13,52	13,62	7,37
	8,22	60,79	50,83	55,40
	8,08	5,21	11,28	9,78
	8,02	15,24	8,55	11,94
	7,91	3,79	3,02	5,18
9	8,53	2,64	3,25	1,94
	8,38	13,83	12,72	11,67
	8,25	64,97	51,32	54,14
	8,17	8,33	11,21	8,61
	8,06	11,75	9,98	9,03
	8,01	5,79	4,80	7,31
10	8,54	1,78	3,26	
	8,38	13,04	11,19	
	8,21	60,53	44,83	
	8,15	19,60	10,95	
	7,99		9,41	
	7,90	5,05	4,27	
11	8,52	1,95	2,11	1,89
	8,36	11,24	12,43	12,43
	8,21	48,64	54,10	59,90
	8,13	11,69		6,31
	8,00	10,30	21,14	11,14
	8,01	5,27	5,64	8,32
12	8,51	1,85		
	8,29	11,31	11,38	
	8,18	63,11	45,14	
	8,14	2,54		
	8,05	16,16	22,03	
	7,94	5,03	6,88	
13	8,62	3,51		3,05
	8,44	12,44		12,30
	8,29	65,10		51,44
	8,21			12,18
	8,06	15,37		17,25
	7,91	3,58		3,77
14	8,61		2,74	1,73
	8,43		10,60	12,19
	8,27		46,23	41,11
	8,21		13,97	10,49
	8,05		18,56	17,52
	7,91		5,15	
15	8,62			
	8,35	12,40	10,91	8,34
	8,21	31,87	30,32	36,39
	8,20	41,14	25,57	30,62
	8,02	12,42	13,72	18,26
	7,89	2,18	5,44	3,86
16	8,61			
	8,48	12,96	12,86	13,19
	8,34	34,40	31,45	39,25
	8,31	27,74	20,29	18,81
	8,05		22,76	19,35
	7,89	8,17	7,69	4,83

Tabla D-5

Porcentaje de bandas para la cadena ligera (LC), cadena pesada (HC), HC no glicosilada, y otras especies para las formulaciones en el bloque D en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma Nº	Tiempo	LC	HC	ngHC	Otros
1	t0				
	t1	34,11	62,58	0,58	2,73
	t2	33,19	64,28	0,60	1,92
2	t0	30,25	66,81	0,64	2,31
	t1	30,61	65,79	0,54	3,07
	t2	29,22	67,04	0,64	3,10
3	t0	27,48	68,51	0,59	3,42
	t1	30,84	67,27	0,54	1,35
	t2	30,30	68,13	0,58	0,99
4	t0	30,88	68,33	0,60	0,19
	t1	29,76	68,32	0,57	1,34
	t2	31,49	66,95	0,55	1,01
5	t0	33,77	64,50	0,56	1,17
	t1	31,59	66,54	0,52	1,34
	t2	29,19	69,16	0,59	1,06
6	t0	30,90	68,08	0,56	0,47
	t1	29,32	69,88	0,54	0,26
	t2	31,08	67,58	0,54	0,79
7	t0	30,41	68,60	0,56	0,43
	t1	30,87	66,95	0,55	1,63
	t2	30,14	68,28	0,55	1,03
8	t0	31,68	67,41	0,60	0,31
	t1				
	t2				
9	t0	29,62	68,12	0,51	1,75
	t1				
	t2				
10	t0	29,80	67,99	0,58	1,64
	t1	30,04	65,53	0,45	3,98
	t2	30,41	66,27	0,53	2,80
11	t0	29,85	67,63	0,61	1,91
	t1	29,02	68,18	0,60	2,20
	t2	30,44	67,14	0,58	1,84
12	t0	29,38	68,11	0,55	1,96
	t1	30,16	65,55	0,49	3,80
	t2	28,20	69,19	0,59	2,02
13	t0	31,38	66,28	0,55	1,79
	t1	33,67	64,10	0,56	1,67
	t2	29,72	67,99	0,58	1,71
14	t0	37,34	60,53	0,52	1,62
	t1	33,03	63,46	0,53	2,97
	t2	34,39	63,62	0,54	1,45
15	t0	30,20	68,42	0,59	0,79
	t1	28,67	69,42	0,58	1,33
	t2	29,96	68,24	0,56	1,24
16	t0	31,62	66,95	0,58	0,85
	t1	30,48	66,36	0,55	2,61
	t2	27,94	70,17	0,60	1,29

Resultados del bloque D

La estabilidad del pH era bastante buena para estas formulaciones (Tabla D-1). Una vez más, se usó la formulación comercial de adalimumab (Humira®) como control (pero usando una proteína biosimilar de adalimumab patentada como API). La formulación comercial mostró de nuevo peor estabilidad por SEC que las que usaban tampones únicos como fosfato e His (véase la tabla D-2). De los dos tampones usados en Humira®, ahora se ha descubierto que el fosfato es el mejor estabilizante. Esto es sorprendente, ya que el fosfato prácticamente no tiene capacidad de tampón a pH 5,2, mientras que el citrato es buen tampón a este pH. Esto sugiere que las diferencias en el perfil de estabilidad se pueden deber a la interacción directa del tampón con la proteína, un fenómeno que, en el caso de la formulación comercial de Humira®, se cree que no se había entendido ni apreciado previamente. Por consiguiente, el beneficio comparativo de seleccionar fosfato como un tampón en la formulación de adalimumab, debido a la estabilidad superior en la formulación frente a la selección de una combinación de citrato/fosfato, constituye uno de los aspectos importantes de la descripción de los autores de la invención.

Tanto el sorbitol como la trehalosa presentan mejores perfiles de estabilidad que el manitol cuando se usan como el único agente de tonicidad en estas formulaciones. También parece que la eliminación del polisorbato 80 (PS 80) disminuye algo la estabilidad. El mejor perfil de estabilidad por SEC parece que es para las formulaciones 10 y 11, que contienen altas concentraciones de sorbitol o trehalosa en lugar de manitol/NaCl (tabla D-2). Estos resultados nos indican que eliminar el NaCl de la formulación o limitar su concentración por debajo de ciertos niveles objetivo (por ejemplo, menos de aproximadamente 100 mM) será beneficioso para la estabilidad. (Se observa que el manitol parece que es un ingrediente estabilizante, pero en niveles preferiblemente por encima de 150, y lo más preferiblemente

Los datos de RP indican que el citrato o fosfato proporcionan mejor estabilidad que la combinación usada en Humira® (Tabla D-3). De nuevo, evitar la combinación de citrato/fosfato representa una característica importante de la invención. No se podía haber sabido ni predicho que el citrato solo o el fosfato solo proporcionarían mejor estabilidad de la formulación que el sistema de tampón comercial que comprende una combinación de citrato y fosfato.

Se realizaron los análisis de cIEF para muestras del bloque D (tabla D-4 anterior). Como antes, hay una disminución en la intensidad del pico principal, pero no se observan nuevos picos. En algunos casos, hay un pequeño aumento en la intensidad de los picos más ácidos. Las disminuciones en el pico principal parece que son mayores en t1 que en t2, lo que sugiere que la degradación a 5°C sería casi imperceptible. No obstante, en general, parece que se degrada menos de 5% (y probablemente mucho menos de 5%) según lo medido por cIEF (tabla D-4). Asimismo, se ve poca degradación por CE-SDS (tabla D-5). Como máximo se observa una degradación de 2 a 4%, pero la variabilidad en el método hace que sea difícil determinar si estos son cambios reales. Parece haber niveles de impureza más altos (Otros) para las formulaciones 1 y 2 y 10 a 14.

Estudios de formulaciones del bloque E

Este bloque de formulaciones se diseñó para evaluar la estabilidad de las formulaciones a diferentes niveles de pH. Si no se especifica un tampón, se empleó un tampón de acetato (10 mM) (tabla E). Un objetivo secundario era evaluar la Gly y Arg en concentraciones más altas y en combinación como estabilizantes alternativos al manitol y NaCl.

Tabla E-1

pH medido para las formulaciones del bloque E en t0 y t1 (una semana, 40°C)

Forma N°	pH	citrato	fosfato	sorbitol	Gly	Arg	manitol	NaCl	PS80	t0	t1	t2
1	5,2	8	18	0	0	0	65	100	0,1	5,15	5,11	5,21
2	3,5	8	18	0	0	0	65	100	0,1	3,36	3,49	3,50
3	5,2	0	0	0	0	0	65	100	0,1	5,13	5,24	5,24
4	3,5	0	0	0	0	0	65	100	0,1	3,31	3,43	3,45
5	3,5	0	0	65	0	0	0	100	0,1	3,30	3,48	3,42
6	3,5	0	0	0	0	130	0	0	0,1	3,24	3,52	3,42
7	3,5	0	0	0	0	130	0	0	0	3,27	3,59	3,48
8	3,5	0	0	0	240	0	0	0	0	3,27	3,33	3,39
9	5,2	0	0	0	240	0	0	0	0	5,05	5,25	5,20
10	3,5	0	0	0	100	100	0	0	0	3,30	3,45	3,41
11	5,2	0	0	0	100	100	0	0	0	5,20	5,38	5,39
12	3,5	0	0	0	150	50	0	0	0	3,24	3,38	3,37

ES 2 784 861 T3

Tabla E-2

Contenido de monómero por SEC para formulaciones en el bloque E en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma N°	pH	citrato	fosfato	sorbitol	Gly	Arg	manitol	NaCl	PS80	t0	t1	t2
1	5,2	8	18	0	0	0	65	100	0,1	99,23	98,20	98,85
2	3,5	8	18	0	0	~10	65	100	0,1	98,82	44,15	86,37
3	5,2	0	0	0	0	0	65	100	0,1	99,30	98,37	99,02
4	3,5	0	0	0	0	0	65	100	0,1	95,85	33,51	76,21
5	3,5	0	0	65	0	0	0	100	0,1	97,37	26,21	77,80
6	3,5	0	0	0	0	130	0	0	0,1	97,79	35,67	65,83
7	3,5	0	0	0	0	130	0	0	0	99,00	55,51	90,60
8	3,5	0	0	0	240	0	0	0	0	99,24	75,60	98,24
9	5,2	0	0	0	240	0	0	0	0	99,08	98,63	99,18
10	3,5	0	0	0	100	100	0	0	0	99,28	51,03	91,66
11	5,2	0	0	0	100	100	0	0	0	99,32	98,54	99,09
12	3,5	0	0	0	150	50	0	0	0	99,29	45,86	93,06

Tabla E-3

Porcentaje de pureza por RP HPLC para formulaciones en el bloque E en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma N°	pH	citrato	fosfato	sorbitol	Gly	Arg	manitol	NaCl	PS80	t0	t1	t2
1	5,2	8	18	0	0	0	65	100	0,1	98,58	96,88	96,91
2	3,5	8	18	0	0	0	65	100	0,1	98,51	90,29	95,99
3	5,2	0	0	0	0	0	65	100	0,1	98,50	96,90	96,83
4	3,5	0	0	0	0	0	65	100	0,1	98,56	91,18	95,55
5	3,5	0	0	65	0	0	0	100	0,1	98,45	90,96	95,71
6	3,5	0	0	0	0	130	0	0	0,1	98,71	93,28	95,38
7	3,5	0	0	0	0	130	0	0	0	98,40	90,65	96,54
8	3,5	0	0	0	240	0	0	0	0	98,03	93,94	96,82
9	5,2	0	0	0	240	0	0	0	0	98,23	97,19	97,12
10	3,5	0	0	0	100	100	0	0	0	98,13	91,10	96,67
11	5,2	0	0	0	100	100	0	0	0	98,13	97,17	97,12
12	3,5	0	0	0	150	50	0	0	0	98,07	93,40	96,48

Tabla E-4

Porcentaje de bandas para la cadena ligera (LC), cadena pesada (HC), HC no glicosilada, y otras especies para las formulaciones en el bloque E en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma Nº	Tiempo	LC	HC	ngHC	Otros
1	t0	29,97	68,80	0,59	0,64
	t1	28,49	70,07	0,60	0,81
	t2	28,21	70,29	0,59	0,90
2	t0	28,50	68,67	0,52	2,31
	t1	29,69	50,92	0,30	19,09
	t2	28,76	69,64	0,60	1,00
3	t0	24,30	74,01	0,60	1,09
	t1	28,27	69,63	0,60	1,51
	t2	28,17	69,89	0,54	1,40
4	t0	29,45	68,73	0,56	1,26
	t1	29,52	51,33	0,30	18,86
	t2	27,92	65,73	0,52	5,83
5	t0	35,59	63,85	0,56	0,00
	t1	32,47	48,72	0,30	18,52
	t2	34,98	60,88	0,46	3,68
6	t0	34,33	63,39	0,51	1,77
	t1				
	t2	35,32	61,31	0,45	2,92
7	t0	30,13	68,87	0,60	0,40
	t1	28,13	54,79	0,59	16,49
	t2	34,39	63,32	0,53	1,76
8	t0	33,27	64,97	0,55	1,21
	t1	33,20	52,62	0,33	13,85
	t2	33,25	65,26	0,58	0,92
9	t0	32,28	66,34	0,57	0,81
	t1	31,81	65,76	0,57	1,86
	t2	31,23	66,81	0,57	1,39
10	t0	35,66	63,36	0,43	0,56
	t1	24,96	58,61	0,33	16,10
	t2	33,44	66,03	0,53	0,00
11	t0	29,75	69,08	0,60	0,57
	t1	27,67	70,83	0,61	0,89
	t2	28,81	69,86	0,59	0,73
12	t0	30,23	49,07	0,26	20,44
	t1	28,14	70,11	0,58	1,18
	t2	29,75	69,08	0,60	0,57

Tabla E-5

Porcentaje de las bandas principales observadas en el perfil de cIEF de formulaciones en el bloque E en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma Nº	pH	t0	t1	t2
1	8,56			
	8,37		12,52	12,65
	8,23		51,77	50,04
	8,14			
	8,03		21,54	12,40
	7,93		14,17	16,26
			1,88	1,49
2	8,37	10,07	17,66	14,15
	8,21	37,52	32,26	33,88
	8,13	19,03	9,96	
	8,01	16,57		28,70
	7,93	4,12	7,45	
4	8,54	1,04	2,67	
	8,38	10,50	9,32	
	8,21	68,34	31,91	
	8,13		28,52	
	8,02	16,55	10,05	
	7,88	3,57	8,67	
5				
6				
7				
8				
9	8,60	1,40	2,60	3,26
	8,43	10,04	12,33	12,03
	8,26	62,39	63,19	63,89
	8,14			
	8,03	15,00	16,95	16,57
	7,88	7,08	4,93	4,25

Resultados de los estudios del bloque E

La estabilidad del pH era moderada, con aumentos en el pH que se producían en t1 para muchas de las formulaciones,

en especial las tamponadas con acetato a pH bajo (tabla E-1 anterior). Dos de las muestras (formulaciones 6 y 12) gelificaron en t1.

Había pérdidas considerables en el contenido de monómero para las muestras de pH 3,5 (Tabla E-3), mientras que las muestras de pH 5,2 presentaban una estabilidad comparable a la observada en los bloques anteriores. También estaba claro que la degradación era mucho más pronunciada a 40°C que a 25, a pesar de ser almacenada durante el doble de tiempo. De hecho, la formulación 8 perdió menos de 1% de monómero en t2 (tabla E-2). Todas las formulaciones de Gly y Arg mostraron buena estabilidad, siempre que el pH se mantuviera a 5,2. Los datos en este bloque de estudios confirman el descubrimiento de que la glicina o la arginina, o una mezcla de las mismas, son buenos estabilizantes en una formulación de adalimumab.

Los datos de RP HPLC muestran disminuciones grandes en la pureza, aunque no tan grandes como para la pérdida de monómero por SEC (Tabla E-3). Esto sugiere que la inestabilidad química es menor que la inestabilidad física. Al igual que con los resultados de la SEC, la pérdida de estabilidad es más pronunciada en t1 que en t2.

Los resultados de CE-SDS muestran aumentos grandes de nuevos picos, aumentando la categoría de Otros a 15-20% para muestras a pH bajo en t1 (tabla E-4). La formulación más estable por CE-SDS parece que es la formulación 11, que contiene tanto Gly como Arg como modificadores/estabilizantes de la tonicidad.

Se encontraron dificultades para realizar el cIEF para muchas de las muestras del bloque E. Sin embargo, dada la estabilidad claramente inferior a pH 3,5, es poco probable que el cIEF proporcione información nueva sobre esos perfiles de estabilidad. Por ejemplo, la formulación 4 (pH 3,5) muestra una división del pico principal en t1.

Estudios de formulaciones del bloque F

Los estudios del bloque F estaban dirigidos a investigar la estabilidad de la formulación que contiene His usando manitol, Gly o Arg como el único modificador de la tonicidad (tabla F a continuación). También sirvió como una oportunidad para evaluar aditivos tales como EDTA y metionina (Met), que pueden ser eficaces para ralentizar la oxidación. Además, se examinaron una formulación de concentración alta de citrato y una de concentración alta de fosfato.

Tabla F

Diseño del estudio del bloque F

Forma N°	API	pH	citrato	fosfato	His	Gly	Arg	manitol	NaCl	PS80	EDTA	Met
1	Biosimilar de Adalimumab	5,2	8	18	0	0	0	65	100	0,1	0	0
2	Biosimilar de Adalimumab	5,2	8	18	0	0	0	65	100	0,1	0,5	0
3	Biosimilar de Adalimumab	5,2	0	0	10	0	0	0	0	0	0,1	0
4	Biosimilar de Adalimumab	5,2	0	0	10	0	0	150	0	0	0	0,5
5	Biosimilar de Adalimumab	5,2	0	0	10	0	0	0	0	0	0	0
6	Biosimilar de Adalimumab	5,2	0	0	10	0	0	0	240	0	0	0
7	Biosimilar de Adalimumab	5,2	0	0	10	0	0	0	240	0	0	0
8	Biosimilar de Adalimumab	5,2	30	0	0	240	0	0	0	0	0	0
9	Biosimilar de Adalimumab	5,2	0	30	0	240	0	0	0	0	0	0
10	Biosimilar de Adalimumab	5,2	0	0	30	240	0	0	0	0	0	0
11	Biosimilar de Adalimumab	5,2	0	0	20	0	25	120	0	0,1	0	0
12	Biosimilar de Adalimumab	5,2	0	0	20	0	25	120	0	0,1	0	0

ES 2 784 861 T3

Tabla F-1

pH medido para las formulaciones del bloque F en t0 y t1 (una semana, 40°C)

Forma N°	citrato	fosfato	His	Gly	Arg	manitol	NaCl	PS80	EDTA	Met	t0	t1	t2
1	8	18	0	0	0	65	100	0,1	0	0	4,67	4,88	4,77
2	8	18	0	0	0	65	100	0,1	0,5	0	5,05	5,15	5,20
3	0	0	10	0	150	0	0	0	0,1	0	5,11	5,22	5,27
4	0	0	10	0	150	0	0	0	0,5	0	4,95	5,06	5,15
5	0	0	10	0	0	240	0	0	0	0	5,12	5,25	5,29
6	0	0	10	0	0	240	0	0	0	10	4,45	4,74	4,67
7	0	0	10	0	0	240	0	0	0	50	5,03	5,24	5,24
8	30	0	0	240	0	0	0	0	0	0	5,09	5,18	5,22
9	0	30	0	240	0	0	0	0	0	0	5,13	5,25	5,32
10	0	0	30	240	0	0	0	0	0	0	5,08	5,24	5,24
11	0	0	20	0	25	120	0	0,1	0	0	5,01	5,17	5,18
12	0	0	20	0	25	120	0	0,1	0	0	5,06	5,20	5,19

Tabla F-2

Contenido de monómero por SEC para formulaciones en el bloque F en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma N°	cítrato	fosfato	<u>His</u>	Gly	Arg	manitol	NaCl	PS80	EDTA	Met	t0	t1	t2
1	8	18	0	0	0	65	100	0,1	0	0	97,69	94,75	96,06
2	8	18	0	0	0	65	100	0,1	0,5	0	99,25	98,14	98,92
3	0	0	10	0	150	0	0	0	0,1	0	99,30	98,54	99,16
4	0	0	10	0	150	0	0	0	0,5	0	99,28	98,31	99,14
5	0	0	10	0	0	240	0	0	0	0	99,17	98,64	99,14
6	0	0	10	0	0	240	0	0	0	10	99,07	98,50	99,07
7	0	0	10	0	240	0	0	0	0	50	99,29	98,92	99,24
8	30	0	0	240	0	0	0	0	0	0	99,28	98,40	99,04
9	0	30	0	240	0	0	0	0	0	0	99,30	98,50	99,08
10	0	0	30	240	0	0	0	0	0	0	99,31	98,60	99,23
11	0	0	20	0	25	120	0	0,1	0	0	99,27	98,64	99,16
12	0	0	20	0	25	120	0	0,1	0	0	99,29	98,51	99,17

Tabla F-3

Porcentaje de pureza por RP HPLC para formulaciones en el bloque F en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma N°	citrato	Fosfato	His	Gly	Arg	manitol	NaCl	PS80	EDTA	Met	t0	t1	t2
1	8	18	0	0	0	65	100	0,1	0	0	97,47	96,89	97,98
2	8	18	0	0	0	65	100	0,1	0,5	0	97,33	97,02	97,99
3	0	0	10	0	150	0	0	0	0,1	0	97,64	97,14	98,04
4	0	0	10	0	150	0	0	0	0,5	0	97,59	97,00	97,97
5	0	0	10	0	0	240	0	0	0	0	97,11	97,30	98,03
6	0	0	10	0	0	240	0	0	0	0	10	97,61	97,27
7	0	0	10	0	0	240	0	0	0	0	50	97,55	97,37
8	30	0	0	240	0	0	0	0	0	0	97,48	97,51	98,05
9	0	30	0	240	0	0	0	0	0	0	97,64	97,58	98,03
10	0	0	30	240	0	0	0	0	0	0	97,68	97,41	98,06
11	0	0	20	0	25	120	0	0,1	0	0	97,67	97,18	98,03
12	0	0	20	0	25	120	0	0,1	0	0	97,68	97,33	98,02

Tabla F-4

Porcentaje de bandas para la cadena ligera (LC), cadena pesada (HC), HC no glicosilada, y otras especies para las formulaciones en el bloque F en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma N°	Tiempo	LC	HC	ngHC	Otros
1	t0	27,36	71,86	0,60	0,17
	t1				
	t2	25,34	73,18	0,63	0,86
2	t0	27,80	71,07	0,60	0,53
	t1	28,29	71,08	0,63	0,00
	t2	27,53	70,97	0,64	0,86
3	t0	27,78	70,62	0,65	0,95
	t1	28,26	70,85	0,66	0,23
	t2	28,26	70,50	0,63	0,61
4	t0	28,20	70,24	0,60	0,96
	t1	29,17	69,30	0,74	0,80
	t2	29,17	70,27	0,56	0,00
5	t0	27,50	70,74	0,59	1,17
	t1	29,56	65,79	0,41	4,24
	t2	28,24	69,90	0,58	1,28
6	t0	29,10	68,84	0,54	1,52
	t1	28,58	69,18	0,54	1,70
	t2	27,47	70,39	0,54	1,60
7	t0	27,87	70,28	0,55	1,30
	t1				
	t2				
8	t0	34,72	64,87	0,41	0,00
	t1	34,94	64,53	0,53	0,00
	t2	33,21	65,76	0,50	0,52
9	t0	31,96	68,04	0	0
	t1	48,51	51,49	0	0
	t2	33,15	65,82	0,57	0,46
10	t0	27,81	71,27	0,51	0,40
	t1	29,59	68,46	0,53	1,43
	t2	31,25	67,89	0,50	0,36
11	t0	27,33	70,80	0,61	1,26
	t1	26,54	71,00	0,64	1,82
	t2	29,46	69,85	0,69	0,00
12	t0	24,18	71,21	0	4,61
	t1				
	t2	28,95	68,98	0,59	1,46

Tabla F-5

Porcentaje de las bandas principales observadas en el perfil de cIEF de formulaciones en el bloque F en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

ES 2 784 861 T3

Forma Nº	pH	t0	t1	t2
1	8,65			2,11
	8,31	13,07	11,43	34,17
	8,24	64,66	67,99	28,67
	8,14			2,29
	8,08	16,13	17,73	15,98
	7,95	6,14		4,80
	2	8,60	1,56	1,93
		8,48	12,95	11,26
		8,24	58,99	55,85
		8,13	20,98	22,43
		7,93	3,56	6,41
3	8,60	1,56	1,93	1,12
	8,56		1,56	1,69
	8,34	10,88	12,85	10,83
	8,18	66,93	55,35	62,00
	8,02	17,28	19,04	20,13
4	7,89	4,91	11,21	5,35
	8,58	1,86	1,68	
	8,45	13,79	10,61	12,84
	8,27	65,06	51,89	61,94
	8,06	19,29	18,85	25,22
5	7,96	6,28	4,91	
	8,60	1,35	1,78	1,45
	8,45	12,35	13,63	8,59
	8,27	60,12	55,07	64,28
	8,07	20,50	20,35	19,73
6	7,94	5,69	9,17	5,95
	8,55	1,30	1,30	1,08
	8,43	13,29	13,26	13,23
	8,24	54,83	56,88	61,67
	8,08	20,76	19,79	17,19
7	7,96	9,82	8,76	6,84
	8,57	1,28	1,41	2,40
	8,44	12,08	12,63	13,05
	8,27	61,50	55,33	60,70
	8,08	17,55	19,48	17,43
8	7,94	5,93	8,92	4,25
	8,55	1,32	0,90	
	8,43	11,51	12,47	10,09
	8,24	62,99	54,09	63,81

	8,05	15,43	22,71	20,91
	7,90	8,75	9,83	5,19
9	8,59	1,35		1,63
	8,45	11,59	13,67	11,40
	8,28	63,60	52,70	63,11
	8,06	17,98	24,08	18,57
	7,94	2,28	7,05	5,29
10	8,57	1,56	2,50	2,08
	8,45	13,22	11,93	12,90
	8,28	61,86	55,12	61,87
	8,08	17,87	20,99	18,74
	7,97	5,50	4,71	4,41
11	8,59	1,43	1,19	
	8,45	12,25	11,42	9,85
	8,28	58,83	59,88	64,13
	8,08	18,18	22,06	17,46
	7,97	9,61	5,45	6,97
12	8,56	1,64	1,39	0,94
	8,39	15,30	13,07	15,71
	8,21	63,76	59,71	62,92
	8,02	16,72	20,51	16,60
	7,97	2,58	4,21	3,85

Resultados del bloque F

En este bloque de formulaciones, los valores de pH eran ligeramente menores que el valor objetivo de pH 5,2 (tabla F-1). Además, el pH cambia en aproximadamente 0,1 unidades para la mayoría de las formulaciones cuando se mide en t1. Estas diferencias se consideraron al construir modelos matemáticos de los datos, como se discute a continuación.

La adición de EDTA parece que mejora la estabilidad para la peor formulación (Formulación 1). Estaba menos claro en general si aumenta la estabilidad, basándose en los datos de la SEC (Tabla F-2). Las formulaciones que contienen concentraciones altas de Arg o Gly funcionaron todas bastante bien tras el almacenamiento (tabla F-2).

Las purezas iniciales por RP HPLC eran globalmente más bajas de lo esperado para estas formulaciones (tabla F-3). Tras el almacenamiento en t1 y t2, hay algunas pequeñas diferencias, mostrando las formulaciones basadas en Gly y Arg la mayor estabilidad. Basándose en los datos de RP HPLC, el EDTA no parece que sea un estabilizante significativo (tabla F-3). Del mismo modo, el efecto de la Met parece que es mínimo en la estabilidad medida por RP HPLC o SEC, con la excepción del contenido de monómero para la concentración de Met más alta (tabla F-2, Formulación 7).

El análisis por CE-SDS indica que se produce muy poca degradación tras el almacenamiento (normalmente, menos de 1% de aumento en "Otros") (tabla F-4). Sin embargo, hay algunas formulaciones que empiezan con contenidos de "Otros" más altos (formulaciones 4 a 7, por ejemplo). Todas estas son formulaciones que usan una alta concentración de manitol (240 mM). Lo mismo parece ser cierto para las formulaciones que contienen manitol 120 mM.

En cuanto al análisis por cIEF, hay poco cambio en las intensidades relativas del pico principal, al menos de manera sistemática que permita discernir las tendencias de estabilidad (tabla F-5). En general, los cambios son más pequeños en t2 que en t1.

Estudios de formulaciones del bloque G

Los estudios de formulaciones del bloque G examinaban una variedad de formulaciones con combinaciones de Gly y Arg como estabilizantes primarios (Tabla XXXIV). Además, se evaluaron otros dos tensioactivos (Pluronic F-68 y polisorbato 20, PS 20) además de PS 80. Finalmente, se evaluó un intervalo de concentraciones de PS 80.

Tabla G
Diseño del estudio del bloque G

Forma Nº	API	citrato	fosfato	succinato	HIS	Gly	Arg	manitol	NaCl	F68	PS20	PS80
1	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	0	0	65	100	0	0	0,1
2	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	0	0	65	100	0	0,1	0
3	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	0	0	65	100	0,1	0	0
4	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	10	120	120	0	0	0	0	0,1
5	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	10	120	120	0	0	0	0	0,05
6	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	10	120	120	0	0	0	0	0,01
7	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	10	120	120	0	0	0	0,05	0
8	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	10	120	120	0	0,1	0	0	0
9	Biosimilar de Adalimumab	0	0	10	0	120	120	0	0	0	0,05	0
10	Biosimilar de Adalimumab	0	0	20	0	150	100	0	0	0,05	0	0
11	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	20	150	100	0	0	0	0,01	0
12	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	20	120	120	0	0	0,01	0	0

Tabla G-1

pH medido para las formulaciones del bloque G en t0, t1 (una semana, 40°C) y t2 (dos semanas, 40°C)

Forma Nº	citrato	fosfato	succinato	His	Gly	Arg	mannitol	NaCl	F68	PS20	PS84	t0	t1	t2
1	8	18	0	0	0	65	100	0	0	0	0,1	5,19	5,38	5,25
2	8	18	0	0	0	65	100	0	0,1	0	0	5,23	5,28	5,24
3	8	18	0	0	0	65	100	0,1	0	0	0	5,22	5,26	5,20
4	0	0	0	10	120	0	0	0	0	0	0,1	5,20	5,33	5,29
5	0	0	0	10	120	0	0	0	0	0	0,05	5,23	5,34	5,29
6	0	0	0	10	120	0	0	0	0	0	0,01	5,19	5,40	5,27
7	0	0	0	10	120	0	0	0	0,05	0	0	5,23	5,39	5,42
8	0	0	0	10	120	0	0	0,1	0	0	0	5,19	5,38	5,41
9	0	0	10	0	120	0	0	0	0	0	0,05	5,19	5,27	5,24
10	0	0	20	0	150	100	0	0	0	0,05	0	5,23	5,28	5,24
11	0	0	0	20	150	100	0	0	0	0	0,01	5,23	5,33	5,27
12	0	0	0	20	120	0	0	0	0,01	0	0	5,22	5,29	5,29

Tabla G-2

Contenido de monómero por SEC para formulaciones en el bloque G en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma N°	citrato	fosfato	succinato	His	Gly	Arg	manitol	NaCl	F68	PS20	PS80	t0	t1	t2
1	8	18	0	0	0	0	65	100	0	0	0	0,1	99,17	97,45
2	8	18	0	0	0	0	65	100	0	0	0	0	99,11	97,78
3	8	18	0	0	0	0	65	100	0,1	0	0	0	98,99	97,74
4	0	0	0	10	120	120	0	0	0	0	0	0,1	99,12	98,67
5	0	0	0	10	120	120	0	0	0	0	0	0,05	99,05	98,57
6	0	0	0	10	120	120	0	0	0	0	0	0,01	99,05	98,70
7	0	0	0	120	120	120	0	0	0	0,05	0	0,04	98,63	98,50
8	0	0	0	10	120	120	0	0	0,1	0	0	0	99,11	98,64
9	0	0	0	10	120	120	0	0	0	0	0,05	0,05	99,12	98,56
10	0	0	20	0	150	100	0	0	0	0,05	0	0,05	99,10	98,49
11	0	0	0	20	150	100	0	0	0	0	0,01	0,01	99,07	98,76
12	0	0	0	20	120	120	0	0	0	0,01	0	0	99,11	98,48

Tabla G-3

Porcentaje de pureza por RP HPLC para formulaciones en el bloque G en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma Nº	cítrato	fosfato	succinato	HIS	Gly	Arg	manitol	NaCl	F68	PS20	PS80	t0	t1	t2
1	8	18	0	0	0	0	65	100	0	0	0,1	99,74	99,66	98,93
2	8	18	0	0	0	0	65	100	0	0,1	0	99,59	99,66	98,97
3	8	18	0	0	0	0	65	100	0,1	0	0	99,58	99,60	99,22
4	0	0	10	120	120	0	0	0	0	0	0,1	99,62	99,62	98,99
5	0	0	10	120	120	0	0	0	0	0	0,05	99,70	99,61	99,01
6	0	0	10	120	120	0	0	0	0	0	0,01	99,60	99,66	99,00
7	0	0	10	120	120	0	0	0	0	0,05	0	99,71	99,65	98,99
8	0	0	10	120	120	0	0,1	0	0	0	0	99,70	99,61	99,03
9	0	10	0	120	120	0	0	0	0	0	0,05	99,71	99,60	99,03
10	0	20	0	150	100	0	0	0	0	0,05	0	99,72	99,60	99,02
11	0	0	20	150	100	0	0	0	0	0	0,01	99,72	99,61	99,05
12	0	0	20	120	120	0	0	0,01	0	0	0	99,61	99,04	

Tabla G-4

Porcentaje de bandas para la cadena ligera (LC), cadena pesada (HC), HC no glicosilada, y otras especies para las formulaciones en el bloque G en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma Nº	Tiempo	LC	HC	ngHC	Otros
1	t0	28,55	70,77	0,50	0,17
	t1	29,71	69,42	0,57	0,30
	t2	30,32	68,80	0,53	0,35
2	t0	37,14	62,38	0,49	0,00
	t1	30,31	69,38	0,28	0,03
	t2	31,60	67,87	0,53	0,00
3	t0	28,95	70,40	0,65	0,00
	t1	28,17	70,26	0,58	0,99
	t2	27,32	71,52	0,56	0,59
4	t0	29,56	69,02	0,65	0,77
	t1	32,19	66,09	0,53	1,19
	t2	31,58	66,03	0,57	1,81
5	t0	36,54	62,48	0,56	0,42
	t1	28,77	69,28	0,62	1,33
	t2	23,76	74,49	0,60	1,16
6	t0	29,60	68,61	0,58	1,21
	t1	30,37	67,42	0,59	1,61
	t2	32,27	66,08	0,59	1,06
7	t0	31,90	65,50	0,63	1,97
	t1	31,26	66,66	0,56	1,51
	t2	31,37	66,64	0,67	1,31
8	t0	31,04	67,38	0,54	1,04
	t1	30,34	67,99	0,62	1,05
	t2	30,21	67,63	0,68	1,48
9	t0	33,12	65,34	0,61	0,94
	t1	34,01	63,97	0,56	1,46
	t2	34,47	63,77	0,57	1,19
10	t0	36,78	61,61	0,54	1,07
	t1	39,25	58,66	0,53	1,56
	t2	32,83	65,42	0,55	1,21
11	t0	36,37	61,97	0,54	1,11
	t1				
	t2	34,97	63,14	0,54	1,36
12	t0	34,26	64,16	0,52	1,05
	t1				
	t2	34,90	63,35	0,56	1,19

Tabla G-5

Porcentaje de las bandas principales observadas en el perfil de cIEF de formulaciones en el bloque G en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

ES 2 784 861 T3

Forma Nº	pH	t0	t1	t2
1	8,53	1,24		1,21
	8,36	14,30	12,69	13,67
	8,24	64,03	53,50	60,30
	8,14			
	8,01	15,77	9,32	19,12
	7,86	3,73	3,35	4,48
	8,52	1,06	1,37	0,88
	8,35	13,10	13,30	12,53
	8,16	66,28	59,68	57,99
2	7,97	17,14	19,60	21,55
	7,83	2,42	4,78	4,92
	8,51	0,65	0,65	1,03
	8,34	13,31	14,00	15,31
	8,16	65,13	59,04	60,70
	8,14			
	7,98	17,26	18,90	17,56
	7,82	2,89	5,68	4,16
	8,36	1,87	2,43	1,00
	8,19	7,74	10,89	11,69
4	7,99	61,91	54,27	59,10
	7,82	20,94	22,72	19,81
	7,66	6,35	7,98	6,92
	8,44	1,79	0,95	0,71
	8,26	13,33	12,85	10,43
	8,06	61,67	59,94	60,12
	7,88	17,49	21,08	20,82
	7,69	4,02	4,50	6,50
6	8,36	1,71	4,76	
	8,21	12,37	12,93	10,95
	8,04	62,53	54,16	56,48
	7,87	19,24	26,08	17,97
	7,64	4,15	2,07	6,50
	8,54	0,77	1,19	0,79
	8,34	7,15	12,32	13,15
	8,17	54,73	42,64	60,58
	8,02	22,18	29,90	17,28
	7,83	7,12	11,47	4,77
7	7,69	1,41	2,48	2,11

ES 2 784 861 T3

Forma Nº	pH	t0	t1	t2
8	8,55		1,04	2,11
	8,39	7,28	10,69	14,82
	8,23	64,01	57,42	55,68
	8,05	20,81	23,86	23,76
	7,96	6,79	5,37	5,74
9	8,54			
	8,48	10,99	7,91	
	8,31	53,85	61,43	
	8,17	31,58	23,83	
	7,99		8,82	
10	7,85	3,58	3,27	
	8,50	0,95	2,16	
	8,36	9,10	10,65	15,79
	8,18	59,02	55,35	58,56
	8,02	23,76	24,79	25,66
11	7,87	5,63	7,05	
	8,58		2,08	1,68
	8,40	9,74	10,05	9,67
	8,21	62,70	56,96	57,36
	8,05	21,39	24,14	25,18
12	7,99	5,24	6,77	6,11
	8,54	1,67		
	8,37	15,99		
	8,22	63,18		
	8,02	15,41		
	7,82	3,75		

Tabla G-6

Diseño del estudio del bloque G para F/T y estudios de agitación

Forma Nº	API	citrato	fosfato	succinato	HIS	Gly	Arg	manitol	NaCl	F68	PS20	PS80
1	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	0	65	100	0	0	0,1	0
2	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	0	65	100	0	0,1	0	0
3	Biosimilar de Adalimumab	8	18	0	0	0	65	100	0,1	0	0	0
4	Biosimilar de Adalimumab	0	0	10	120	0	0	0	0	0	0,1	0
5	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	10	120	0	0	0	0	0,05	0
6	Biosimilar de Adalimumab	0	0	0	10	120	0	0	0	0	0,01	0
7	Biosimilar de Adalimumab	0	0	10	120	0	0	0	0	0,05	0	0
8	Biosimilar de Adalimumab	0	0	10	120	0	0	0,1	0	0	0	0
9	Biosimilar de Adalimumab	0	0	10	0	120	0	0	0	0	0,05	0
10	Biosimilar de Adalimumab	0	0	20	0	150	100	0	0	0,05	0	0
11	Biosimilar de Adalimumab	0	0	20	150	100	0	0	0	0,01	0,01	0
12	Biosimilar de Adalimumab	0	0	20	120	0	0	0	0	0,01	0,01	0

Tabla G-7

Contenido de monómero por SEC para formulaciones seleccionadas en el bloque G que no se trataron (Q, quiescentes), sometidas a 5 ciclos de F/T o sometidas a agitación durante 24 horas

Forma Nº	citrato	fosfato	succinato	HIS	Gly	Arg	manitol	NaCl	F68	PS20	PS80	Q	F/T	agit.
1	8	18	0	0	0	0	65	100	0	0	0,1	99,15	99,03	99,14
4	0	0	0	0	10	120	0	0	0	0	0,1	99,21	99,11	99,18
8	0	0	0	0	10	120	0	0	0,1	0	0	99,18	99,14	99,17
11	0	0	0	0	20	150	100	0	0	0	0,01	99,16	99,09	99,13
12	0	0	0	0	20	120	120	0	0	0	0,01	0	0	99,10

Tabla G-7

Porcentaje de pureza por RP HPLC para formulaciones seleccionadas en el bloque G que no se trataron (Q, quiescientes), sometidas a 5 ciclos de F/T o sometidas a agitación durante 24 horas

Forma Nº	citrato	fosfato	succinato	HIS	Gly	Arg	manitol	NaCl	F68	PS20	PS80	Q	F/T	agit.
1	8	18	0	0	0	0	65	100	0	0	0,1	99,60	99,72	99,76
4	0	0	0	0	10	120	120	0	0	0	0,1	99,56	99,70	99,59
8	0	0	0	0	10	120	120	0	0,1	0	0	99,58	99,57	99,73
11	0	0	0	20	150	100	0	0	0	0	0,01	99,72	99,59	99,65
12	0	0	0	20	120	120	0	0	0	0,01	0	99,75	99,56	

Resultados del bloque G

Todos los valores de pH estaban cerca de los valores objetivo (tabla G-1), con cambios relativamente pequeños ocurridos tras el almacenamiento. Parece que hay cierta preferencia en términos de polisorbatos frente a F-68 en términos de estabilidad, medido por SEC (tabla G-2). Sin embargo, las diferencias son relativamente pequeñas. Parece

- 5 que las formulaciones de succinato (Formulaciones 9 y 10) iban razonablemente bien en cuanto al contenido de monómero retenido.

Los datos de RP HPLC están todos muy cerca, lo que hace que cualquier determinación de diferencias de estabilidad sea prácticamente imposible (tabla G-3). Estos datos solo serán interpretables cuando se examinen en el contexto más amplio de todos los bloques de estudios de cribado.

- 10 Los resultados de CE-SDS sugieren que PS 20 es el mejor estabilizante en una concentración de 0,1% para la formulación de Humira® (Formulaciones 1 a 3) (tabla G-4). De lo contrario, las diferencias parecen ser demasiado pequeñas y variables para sacar cualquier conclusión general.

15 Como se ha visto antes, los resultados para los datos de cIEF son suficientemente variables como para dificultar la interpretación (tabla G-5). Parece que los cambios son más pequeños en las formulaciones de Gly/Arg que para las formulaciones que usan otros estabilizantes, como el manitol. No obstante, en general, la estabilidad por cIEF parece que es bastante buena para muchas de las formulaciones en este estudio.

Estudios del bloque G (F/T y agitación).

20 Para una formulación líquida, es importante evaluar la sensibilidad a la tensión interfacial. Se seleccionaron dos tipos de estudios de tensión. El primero es agitación a 150 rpm en un agitador orbital durante 24 horas a 2-8°C. El segundo es cinco ciclos sucesivos de congelación y descongelación (F/T), donde este ciclo debería generar cantidades crecientes de proteína dañada, si la proteína es sensible al daño interfacial. Se seleccionaron cuatro formulaciones del bloque G para la evaluación, y se resaltan en texto en azul en negrita en la tabla G-6.

25 Tras ciclos repetidos de F/T, hay una disminución muy pequeña en el contenido de monómero para todas las formulaciones ensayadas (tabla G-7). Por lo tanto, parece que hay poca sensibilidad interfacial por esta tensión y que la presencia de PS 80 no es crítica para la protección. En cuanto a las muestras agitadas, las pérdidas son incluso menores. Las tendencias en los datos de RP HPLC son esencialmente las mismas (tabla G-7). Hay pocas pérdidas, si es que hay alguna, en la pureza tras la exposición a la tensión interfacial.

Estudios de formulaciones del bloque H

30 Las formulaciones del bloque H se centraban en tres aspectos de la formulación de adalimumab: (1) concentraciones de proteínas más altas, (2) formulaciones sin tampones presentes (aparte de la proteína) y (3) el uso de varias combinaciones de tampones además de citrato-fosfato (Véase la tabla H).

Tabla H

Diseño del estudio del bloque H

Forma Nº	API ***	protein 100	cítrato 8	fosfato 18	succinato 0	HIS 0	ACETATO 0	Gly 0	Arg 0	manitol 65	NaCl 100	PS80 0,1
1	***	100	8	18	0	0	0	0	0	65	100	0,1
2	***	100	0	0	0	10	0	120	120	0	0	0,1
3	***	50	0	0	0	0	0	0	0	65	100	0,1
4	***	50	0	0	0	0	0	120	120	0	0	0,1
5	***	50	0	0	0	0	0	120	120	0	0	0
6	***	50	0	0	0	10	10	0	0	65	100	0,1
7	***	50	0	0	10	10	0	0	0	65	100	0,1
8	***	50	0	10	0	10	0	0	0	65	100	0,1
9	***	50	0	0	10	0	10	0	0	65	100	0,1
10	***	50	10	0	10	0	0	0	0	65	100	0,1
11	***	50	10	0	0	10	0	0	0	65	100	0,1
12	***	50	0	0	10	10	0	120	100	0	0	0,1

** indica adalimumab biosimilar patentado

Tabla H-1

pH medido para las formulaciones del bloque H en t0, t1 (una semana, 40°C) y t2 (dos semanas, 40°C)

Forma N°	proteína	Citrato	Fosfato	Succinato	Histidina	acetato	Gly	Arg	Manitol	NaCl	PS80	t0	t1	t2
1	100	8	18	0	0	0	0	0	65	100	0.1	5.19	5.30	5.29
2	100	0	0	10	0	120	120	0	0	0	0.1	5.20	5.19	5.15
3	50	0	0	0	0	0	0	0	65	100	0.1	5.21	5.23	5.21
4	50	0	0	0	0	0	120	120	0	0	0.1	5.21	5.41	5.46
5	50	0	0	0	0	0	120	120	0	0	0	5.21	5.30	5.39
6	50	0	0	10	10	0	0	0	65	100	0.1	5.20	5.28	5.28
7	50	0	0	10	0	0	0	0	65	100	0.1	5.21	5.24	5.24
8	50	0	10	0	10	0	0	0	65	100	0.1	5.20	5.17	5.16
9	50	0	0	10	0	10	0	0	65	100	0.1	5.21	5.24	5.29
10	50	10	0	10	0	0	0	0	65	100	0.1	5.20	5.24	5.26
11	50	10	0	0	10	0	0	0	65	100	0.1	5.21	5.24	5.26
12	50	0	0	10	10	0	120	100	0	0	0.1	5.21	5.26	5.29

Tabla H-2

Contenido de monómero por SEC para formulaciones en el bloque H en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma N°	proteína	Citrato	Fosfato	Succinato	Histidina	acetato	Gly	Arg	manitol	NaCl	PS80	t0	t1	t2
1	100	8	18	0	0	0	0	0	65	100	0,1	99,25	98,36	98,42
2	100	0	0	0	10	0	120	120	0	0	0,1	99,19	98,88	98,47
3	50	0	0	0	0	0	0	0	65	100	0,1	99,06	98,81	98,74
4	50	0	0	0	0	0	120	120	0	0	0,1	99,19	99,06	98,99
5	50	0	0	0	0	0	120	120	0	0	0	99,26	99,03	98,96
6	50	0	0	0	10	10	0	0	65	100	0,1	99,26	98,92	98,86
7	50	0	0	10	10	0	0	0	65	100	0,1	99,14	98,98	98,93
8	50	0	10	0	10	0	0	0	65	100	0,1	99,11	98,93	98,66
9	50	0	0	10	0	10	0	0	65	100	0,1	99,16	98,79	98,63
10	50	10	0	10	0	0	0	0	65	100	0,1	99,10	98,79	98,49
11	50	10	0	0	10	0	0	0	65	100	0,1	99,21	98,93	98,18
12	50	0	0	10	10	0	120	100	0	0	0,1	99,30	99,22	98,65

Tabla H-3

Porcentaje de pureza por RP HPLC para formulaciones en el bloque F en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma Nº	proteína	citrato	fosfato	succinato	histidina	acetato	Gly	Arg	manitol	NaCl	PS80	t0	t1	t2
1	100	8	18	0	0	0	0	0	65	100	0,1	99,36	99,64	99,64
2	100	0	0	0	10	0	120	120	0	0	0,1	99,37	99,68	99,74
3	50	0	0	0	0	0	0	0	65	100	0,1	99,45	99,47	99,70
4	50	0	0	0	0	0	120	120	0	0	0,1	99,50	99,69	99,59
5	50	0	0	0	0	0	120	120	0	0	0	99,47	99,71	99,56
6	50	0	0	0	10	10	0	0	65	100	0,1	99,48	99,56	99,72
7	50	0	0	10	10	0	0	0	65	100	0,1	99,43	99,45	99,72
8	50	0	10	0	10	0	0	0	65	100	0,1	99,43	99,51	99,72
9	50	0	0	10	0	10	0	0	65	100	0,1	99,47	99,55	99,72
10	50	10	0	10	0	0	0	0	65	100	0,1	99,48	99,53	99,67
11	50	10	0	0	10	0	0	0	65	100	0,1	99,45	99,69	99,60
12	50	0	0	10	10	0	120	100	0	0	0,1	99,44	99,54	99,72

Tabla H

Tabla H-4

Porcentaje de bandas para la cadena ligera (LC), cadena pesada (HC), HC no glicosilada, y otras especies para las formulaciones en el bloque H en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

Forma Nº	Tiempo	LC	HC	ngHC	Otros
1	t0	32,87	65,48	0,54	1,11
	t1	28,08	70,09	0,58	1,25
	t2	52,57	47,43	0,00	0,00
2	t0	36,20	62,40	0,55	0,86
	t1	29,64	68,68	0,57	1,11
	t2	43,09	55,23	0,57	1,10
3	t0	34,70	63,55	0,57	1,18
	t1	28,24	69,72	0,61	1,57
	t2	34,25	63,97	0,67	1,11
4	t0	41,04	57,61	0,51	0,84
	t1	27,58	70,65	0,62	1,15
	t2	34,14	64,01	0,60	1,26
5	t0	37,64	60,77	0,50	1,09
	t1	28,07	70,02	0,61	1,30
	t2	37,67	60,76	0,55	1,02
6	t0	31,64	66,46	0,55	1,34
	t1	27,67	70,19	0,50	1,64
	t2	34,07	63,49	0,62	1,81
7	t0	30,38	69,10	0,53	0,00
	t1	27,14	70,55	0,62	1,69
	t2	46,41	51,21	0,00	2,38
8	t0	28,46	71,19	0,35	0,00
	t1	30,05	68,71	0,55	0,69
	t2	34,14	63,97	0,63	1,25
9	t0	27,74	70,63	0,60	1,03
	t1	27,48	70,48	0,61	1,43
	t2	36,56	61,59	0,49	1,36
10	t0				
	t1	27,69	70,46	0,60	1,24
	t2				
11	t0	27,64	70,83	0,57	1,13
	t1	31,85	66,08	0,61	1,46
	t2	38,58	59,26	0,52	1,64
12	t0	29,48	68,55	0,58	1,40
	t1	29,53	68,68	0,58	1,40
	t2	30,64	68,20	0,70	0,46

Tabla H-5

Porcentaje de las bandas principales observadas en el perfil de cIEF de formulaciones en el bloque H en t0, t1 (una semana a 40°C) y t2 (dos semanas a 25°C)

ES 2 784 861 T3

Forma Nº	pH	t0	t1	t2
1	8,55	1,20	1,17	1,21
	8,39	9,57	5,57	8,23
	8,23	46,84	38,18	39,78
	7,99	13,67	12,64	11,62
	7,81	6,93	4,61	3,70
2	8,43	1,17	1,06	1,38
	8,26	8,97	8,15	8,38
	8,09	45,46	40,27	39,95
	7,87	13,37	16,45	6,77
	7,72	5,47	5,39	9,55
	7,56	1,64	1,52	3,33
3	8,36	0,80	0,74	0,61
	8,16	6,02	6,03	7,30
	7,98	35,60	35,58	37,24
	7,83	11,75	14,10	13,15
	7,64	2,17	4,78	2,00
	7,51	1,23	1,81	
4	8,40	0,82	0,74	0,30
	8,22	7,87	7,38	6,29
	8,04	42,46	34,42	35,89
	7,89	14,44	13,71	11,34
	7,71	3,18	3,31	2,69
	7,56	0,98	0,95	
5	8,42	0,82		1,02
	8,25	7,22		5,09
	8,07	34,68		28,99
	7,91	2,67		3,63
	7,86	10,63		7,83
	7,72	2,52		2,05
6	8,42	1,17	1,28	1,22
	8,23	9,88	8,56	7,90
	8,09	45,26	40,45	40,80
	7,94	13,23	16,50	13,28
7	8,59	1,79	1,45	1,90
	8,45	11,74	11,32	11,51
	8,28	59,90	61,63	56,22
	8,05	20,34	19,49	22,98
	7,92	6,24	6,11	7,39
8	8,58	1,59	2,94	1,38
	8,44	11,86	12,83	12,12
	8,26	61,08	60,20	63,05
	8,05	20,21	24,03	23,45
	7,88	5,25		6,55
9	8,61	1,22	1,42	1,21
	8,48	12,47	12,36	11,00
	8,33	56,64	54,59	55,34
	8,10	23,37	23,81	25,31
	7,94	6,30	7,83	

Resultados del bloque H

La estabilidad del pH de estas formulaciones era aceptable (<0,1 unidades), excepto para las formulaciones 4 y 5. Estas son las formulaciones sin tampón que usan Gly y Arg como estabilizantes (tabla H-1). También había un ligero aumento en el pH para la formulación 1 (la formulación de Humira® en una concentración de proteína de 100 mg/ml).

- 5 La estabilidad de las formulaciones del bloque H se controló usando SEC y RP HPLC. Hay poca pérdida en contenido de monómero, y la Formulación 1 parece ser la menos estable por SEC (tabla H-2). Con 100 mg/ml de API biosimilar de adalimumab, la formulación tamponada con histidina que contiene Gly y Arg parece que es bastante estable. En general, parece que la mejor combinación de tampones es His-succinato (Formulaciones 7 y 12). Las formulaciones sin tampón con Gly y Arg también muestran estabilidad aceptable (tabla H-2). Los datos de RP HPLC indican que las
10 formulaciones sin tampón (4 y 5) pueden no funcionar tan bien como se muestra por SEC (tabla H-3), con disminuciones medibles en pureza, pero se cree que son satisfactorias para obtener una formulación que tenga estabilidad a largo plazo.

- 15 Los datos de CE-SDS detectan el menor cambio en la Formulación 12, que es una formulación de His-succinato (tabla H-4). El mayor cambio en t1 ocurre con la Formulación 7, que también es una formulación de His-succinato, pero que usa manitol y NaCl como modificadores de la tonicidad.

Modelización por PLS

Método de PLS

Los datos para las formulaciones de adalimumab en los Bloques A a H se analizaron juntos usando un método quimiométrico denominado mínimos cuadrados parciales (PLS).

- 20 Se han publicado descripciones detalladas de la modelización por PLS. Véase, por ejemplo, Katz, M.H. *Multivariate Analysis: A Practice Guide for Clinicians*. Cambridge University Press, New York, pág. 158-162 (1999); Stahle, L., Wold, K., Multivariate data analysis and experimental design in biomedical research. *Prog. Med. Chem.* 1988, 25: 291-338; Wold S. PLS-regression: a basic tool of chemometrics. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 2001, 58: 109-130; y Martens, H.; Martens, M. *Multivariate Analysis of Quality: An Introduction*, Wiley and Sons, Chichester, UK (2001).
- 25 Para cualquier matriz grande de valores, donde hay un número razonable de muestras (que forman juntas la llamada matriz X), se pueden construir modelos matemáticos que expliquen la mayor cantidad de varianza en la(s) variable(s) dependiente(s) de interés (la matriz Y). La mejor descripción individual de la relación entre la variación en la matriz X y el punto final (la matriz Y) se llama el primer componente principal, PC1. El siguiente componente importante (en términos de describir la varianza en la matriz Y) se llama el segundo componente principal, PC2, y así sucesivamente.
30 Muy a menudo, solo se requieren uno o dos PC para explicar la mayor parte de la varianza en la matriz Y. Cada uno de estos PC contiene alguna contribución de cada una de las variables en la matriz X. Si una variable dentro de la matriz X contribuye en gran medida a la construcción de un PC determinado, entonces se clasifica como significativo. De hecho, se pueden calcular los coeficientes de regresión para cada variable en la matriz X para un modelo dado, donde un modelo es la combinación de un cierto número de PC con el fin de proporcionar una descripción adecuada
35 de la matriz Y. En resumen, PLS toma información de la matriz X, calcula el número deseado de PC y construye un modelo adecuado. El modelo que incluye todas las muestras se denomina un modelo de calibración [1,2]. El coeficiente de determinación global (r^2) indica la calidad del modelo. Todos los cálculos de PLS se realizaron usando el software Unscrambler® (CAMO, Corvallis, OR). Un análisis de PLS hecho con una sola variable en la matriz Y se denomina análisis PLS1. La construcción de un modelo que se ajuste a múltiples variables en la matriz Y se llama análisis PLS2.
40 Se realizó una validación cruzada completa en todos los modelos de calibración usando técnicas estándar. Brevemente, se saca una muestra cada vez, el conjunto de datos se recalibra y se construye un nuevo modelo. Este procedimiento se repite hasta que todas las muestras de calibración se sacan una vez y se cuantifican como un modelo de validación. Por lo tanto, el primer conjunto, que contiene todas las muestras, se denomina conjunto de *calibración* y el de después de la validación cruzada, conjunto de *validación*. El algoritmo jack-knife (Véase, Martens et al) se usó para determinar la significación estadística de cualquier factor usado en la construcción de los modelos de PLS descritos antes.
45

Modelización por PLS de formulaciones de adalimumab

(Bloques B, C y D)

(Véase las figuras 3 a 12)

- 50 Nota: Los gráficos de superficie PLS representados en figuras 3 a 12 se basan en los datos obtenidos de los Bloques B, C y D. Lo siguiente es una discusión de los hallazgos reflejados en los gráficos de superficie PLS que se muestran en figuras 3 a 12.

Modelo 1 de PLS - Figura 3.

La figura 3 contiene una representación del contenido de monómero en t1 (modelo 1) en función de las concentraciones de citrato y fosfato. El pH se ha fijado en 5,2. El modelo indicaba que el fosfato y el citrato por sí mismos eran desestabilizantes débiles (no con significación estadística), junto con el tartrato y maleato. En comparación, el succinato, que es estructuralmente similar al citrato, tartrato y maleato, era un estabilizante débil. El único tampón que se encontró que era un estabilizante significativo era la histidina. Ninguno de estos hallazgos se podría haber predicho basándose en la bibliografía o el examen de la estructura química de cada tampón. El modelo también indicaba que cuando el tampón de citrato y fosfato se usan juntos, la formulación es menos estable. Si solo se usa un único tampón, en especial fosfato, la estabilidad mejora. Esto es sorprendente ya que el fosfato tiene poca o ninguna capacidad de tampón a pH 5,2, mientras que el tampón de citrato sí. No se podría haber predicho ninguno de estos comportamientos basándose en lo que se sabía en la técnica.

Modelo 2 de PLS - Figura 4.

La figura 4 contiene una representación del contenido de monómero en t2 (modelo 2). Asimismo, se construyó un modelo usando el contenido de monómero por SEC en t2 como punto final. Este modelo también demostraba que la estabilidad es la más baja cuando se usan citrato y fosfato juntos. La estabilidad más baja se mostró cuando el citrato está por encima de 10 mM y el fosfato está entre 5 y 15 mM. La estabilidad mejora cuando la concentración de citrato disminuye y/o la concentración de fosfato disminuye o aumenta. Estos hallazgos sugieren que se prefiere una composición de tampón único. Se observa la misma tendencia en la estabilización del tampón que con el Modelo 1 de PLS, siendo el citrato y fosfato estabilizantes débiles (no estadísticamente significativos), mientras que la histidina es un estabilizante fuerte (estadísticamente significativo).

Modelo 1 de PLS - Figura 5.

La figura 5 es un modelo de PLS 1 que muestra el efecto de la histidina y la glicina en la estabilidad de las formulaciones. Contiene una representación del contenido de monómero en t1 (modelo 1). Este modelo indicaba que la combinación de histidina y glicina daba muy buenos resultados de estabilidad. Se determinó que tanto la histidina (His) como la glicina (Gly) eran estabilizantes. La menor estabilidad en la superficie de respuesta (mostrada en azul) es cuando hay la concentración más baja de His y Gly. El efecto de la His en la estabilidad es mayor, proporcionando con His 20 mM que proporciona una estabilización comparable a la Gly 120 mM (obsérvense las esquinas opuestas del gráfico). El modelo indica que habrá un beneficio adicional para la estabilidad usando ambos excipientes, con la mayor estabilidad cuando la concentración de His es 20 mM y la concentración de Gly es 120 mM.

Modelo 1 de PLS - Figura 6.

La figura 6 es un modelo 1 de PLS que muestra el efecto de la arginina y el sorbitol en la estabilidad de las formulaciones. Contiene una representación del contenido de monómero en t1 (modelo 1). Este modelo indicaba que la arginina era un buen estabilizante, mientras que el sorbitol era un estabilizante malo. Del mismo modo, la arginina (Arg) proporciona un grado de estabilización similar al encontrado para la Gly. La peor estabilidad según indica este modelo es cuando la concentración de Arg es baja y la concentración de sorbitol es baja (el área azul del gráfico). A medida que aumentan las concentraciones de cada excipiente, aumenta el contenido de monómero en t1. El efecto del sorbitol es aproximadamente lineal con la concentración, mientras que el efecto de la Arg parece que aumenta más rápidamente una vez que la concentración supera 60 mM. Aunque se predice que el sorbitol aumenta la estabilidad de adalimumab en términos de contenido de monómero retenido, su capacidad para aumentar la estabilidad es menor que la encontrada para la Gly y Arg (base molar)

Modelo 1 de PLS - Figura 7.

La figura 7 es un modelo 1 de PLS que muestra el efecto del pH y la histidina sobre la estabilidad de las formulaciones. Contiene una representación del contenido de monómero en t1 (modelo 1). Este modelo indicaba que la histidina parece que es el mejor tampón, mientras que el pH debería ser preferiblemente de 5 o más para una mejor estabilidad.

Modelo 2 de PLS - Figura 8.

La figura 8 es un modelo 2 de PLS que muestra el efecto del pH y la histidina en la estabilidad de las formulaciones. Contiene una representación del contenido de monómero en t2 (modelo 2). Este modelo indicaba que la histidina parece que es el mejor tampón, mientras que el pH debería ser preferiblemente de 5 o más para una mejor estabilidad. Los resultados indican que el pH óptimo está cerca de 5,2. De todos los tampones que se examinaron, la histidina proporciona el mayor grado de estabilización. Esta superficie de respuesta ilustra dos puntos importantes. Primero, la estabilidad parece ser máxima cerca de pH 5,2, disminuyendo a un pH más alto y más bajo. Segundo, se muestra que la histidina proporciona un aumento significativo en la estabilidad. Cuando se usa histidina 20 mM, proporciona un aumento notable en la estabilidad en concentraciones de tampón más bajas. De hecho, el efecto parece que es no lineal, produciéndose más estabilización de 10 a 20 mM que de 0 a 10 mM. Además, la pérdida de estabilidad es más

abrupta a un pH más alto que a un pH más bajo.

Modelo 2 de PLS - Figura 9.

La figura 9 es un modelo 2 de PLS que muestra el efecto de la trehalosa y PS80 en la estabilidad de las formulaciones. Contiene una representación del contenido de monómero en t2. Este modelo indicaba que la trehalosa parece que es un estabilizante débil, mientras que PS80 mejora la estabilidad térmica. La superficie de respuesta mostrada en la figura 9 indica que PS 80 es un potente estabilizante para proteger adalimumab contra el estrés térmico, proporcionando una concentración de 0,1% la máxima estabilidad. La concentración de PS 80 no ha variado más que a 0 y 0,1%. En comparación, este modelo muestra que el efecto estabilizante de la trehalosa es bastante pequeño, ciertamente menor que lo que se observaba con sorbitol.

10 Modelo 2 de PLS - Figura 10.

La figura 10 es un modelo 2 de PLS que muestra el efecto del manitol y PS80 en la estabilidad de las formulaciones. Contiene una representación del contenido de monómero en t2 (modelo 2). Este modelo indicaba que el manitol parece que es un desestabilizante, mientras que PS80 mejora la estabilidad térmica. El modelo de PLS que usa el contenido de monómero por SEC en t2 permite examinar los efectos relativos de cualquiera de los factores incluidos en el modelo. A medida que aumenta la concentración de manitol, disminuye la estabilidad general. En comparación, el impacto de PS80 en la estabilidad es bastante pequeño.

Modelo 1 de PLS - Figura 11.

La figura 11 es un modelo 1 de PLS que muestra el efecto del manitol y el NaCl sobre la estabilidad de las formulaciones. Contiene una representación del contenido de monómero en t1 (modelo 1). Este modelo indicaba que el manitol y el NaCl parece que son desestabilizantes. La estabilidad, indicada por el contenido de monómero en t1, es la más baja cuando la concentración de manitol está en cualquier punto por debajo de 150 mM. Asimismo, la adición de NaCl también disminuye la estabilidad del adalimumab.

Modelo 1 de PLS -Figura 12.

La figura 12 es un modelo 1 de PLS que muestra el efecto del EDTA y la metionina en la estabilidad de las formulaciones. Contiene una representación del contenido de monómero en t1. En el caso de EDTA, la estabilidad disminuye ligeramente a medida que aumenta la concentración de este aditivo. En contraste, la adición de Met parece que mejora la estabilidad.

Modelización de PLS de formulaciones de adalimumab para los bloques B a G

(Véanse las figuras 13 a 28)

30 El primer modelo de PLS ("Modelo A de PLS)

El primer modelo PLS (Modelo A de PLS) usaba la diferencia en el contenido de monómero en t1 como punto final. El modelo usaba tres PC y tenía un coeficiente de correlación para el conjunto de calibración de 0,83 y un valor r de 0,67 para el conjunto de validación. Era un modelo cuadrático que incluía términos de interacción pH-tampón y tampón-tampón.

35

Tabla J

Coeficientes del "modelo A" de PLS	
Factor	valor r
pH t0	0,041
proteína	-0,025
citrato	+0,123
fos	+0,267
succinato	-0,089
histidina	-0,174
acetato	-0,053
glicina	-0,190
arginina	-0,128
sorbitol	-0,003
trehalosa	+0,020
manitol	-0,104
NaCl	+0,250
F68	+0,018

Coeficientes del "modelo A" de PLS	
Factor	valor <i>r</i>
PS 20	+0,021
PS 80	-0,152
EDTA	+0,112
Met	-0,062

Nota: Los coeficientes de correlación globales para cada factor lineal se incluyen en el primer modelo de PLS (Modelo A de PLS) usando la diferencia en el contenido de monómero por SEC en t1 como criterio de valoración. Los factores que se consideran estadísticamente significativos se destacan en texto en negrita.

La calidad del modelo es aceptable, considerando los coeficientes de correlación de los conjuntos de calibración y validación. Los coeficientes de correlación globales para los diversos factores incluidos en el modelo se resumen en la Tabla J. Obsérvese que los términos cuadráticos y de interacción no se dan aquí. Puesto que el criterio de valoración es la diferencia en el contenido de monómero, se desea minimizar este valor. Por lo tanto, los estabilizantes presentan coeficientes de correlación negativos, mientras que los desestabilizantes tienen valores *r* positivos. De los estabilizantes, la His, Gly, Arg y PS 80 son los más potentes, aunque el manitol y el succinato también tienen un efecto estabilizante (tabla J). A la vez, hay algunos desestabilizantes significativos, como NaCl, citrato y fosfato. Tenga en cuenta que estos modelos son una combinación de todos los datos de estabilidad recogidos en los distintos bloques de formulaciones, de A a H, y las formulaciones individuales pueden variar del modelo. Aunque la tabla de coeficientes de correlación es útil para medir los efectos de varios factores, no captura los efectos no lineales y de interacción, por lo que es útil ver las superficies de respuesta para examinar los efectos de varios parámetros con mayor detalle, como se muestra en las superficies de respuesta que se reproducen en las figuras 13 a 28.

Discusión del Modelo A de PLS - Figura 13 y 14.

La patente Krause '583 describe el sistema de tampón de citrato-fosfato como parte integral de la estabilidad del producto. Los estudios de los autores de la invención muestran que este no es el caso. La peor estabilidad se produciría cuando estos dos tampones se usaran en combinación y el efecto empeoraría a medida que aumentaran las concentraciones de tampón, según este modelo (Figura 13[1]). La superficie de respuesta indica que el fosfato y el citrato son igualmente desestabilizantes, al contrario de algunas observaciones anteriores, pero la naturaleza cuantitativa de estas superficies debe considerarse con cuidado ya que incluyen datos de todas las formulaciones de los Bloques B a H.

El efecto del pH y la His se muestra en Figura 14. Muestra que la His es desestabilizante a pH bajo, donde está claramente fuera de la capacidad de tamponamiento de la His. De nuevo, este resultado es una función de todas las observaciones de pH en este estudio, no solo las que implican His (aunque esto podría hacerse). De acuerdo con esta superficie de respuesta, el pH óptimo puede estar más cerca de 5,4 que de 5,2, aunque la superficie es relativamente plana a lo largo de esta región, lo que indica una superficie de respuesta poco profunda de pH 5 a 5,4 (Figura 14).

Discusión del Modelo A de PLS - Figura 15

La superficie de respuesta para la Gly y Arg se muestra en Figura 15. Los estudios muestran repetidamente que estos dos aminoácidos pueden ser estabilizantes potentes de adalimumab. Obsérvese que la diferencia mínima en el contenido de monómero (es decir, la parte azul de la superficie) se alcanza con Arg 100 mM, pero con Gly 200 mM, lo que sugiere que la Arg puede ser el mejor estabilizante para adalimumab a pH 5,2.

Discusión del Modelo A de PLS - Figura 16

La superficie de respuesta final mostrada para el modelo A de PLS es para el efecto del NaCl y PS 80 (Figura 16). Muestra que la estabilidad de adalimumab disminuye con la adición de NaCl, en especial por encima de 100 mM. Mientras tanto, PS 20 proporciona una estabilidad significativa cuando se usa por encima del 0,04%.

El segundo modelo de PLS (modelo B de PLS)

El segundo modelo PLS (Modelo B de PLS) usaba el contenido de monómero en t1 y en t2 como criterios de valoración. El modelo usaba cuatro PC y tenía un coeficiente de correlación para el conjunto de calibración de 0,82 y un valor *r* de 0,67 para el conjunto de validación. Era un modelo cuadrático que incluía términos de interacción pH-tampón y tampón-tampón. En términos de calidad del modelo, este es comparable al primer modelo A de PLS descrito antes.

Tabla K (L)

Coeficientes de correlación del "modelo B" de PLS

Factor	valor r
pH	-0,086
proteína	+0,030
citrato	-0,079
fos	-0,157
succinato	+0,060
histidina	+0,185
acetato	+0,063
glicina	+0,126
arginina	+0,150
sorbitol	+0,025
trehalosa	+0,006
manitol	+0,014
NaCl	-0,215
F68	-0,044
PS 20	-0,028
PS 80	+0,227
EDTA	-0,097
Met	+0,096

Los criterios de valoración para el modelo B de PLS son los contenidos totales de monómero tanto en t1 como en t2. Por lo tanto, se deseará maximizar estos valores. Esto significa que los estabilizantes con coeficientes de correlación positivos y los desestabilizantes presentarán valores r negativos (tabla K). Al igual que con el modelo anterior, el citrato, fosfato y NaCl son desestabilizantes significativos. Por otro lado, la His, Gly Arg y PS 20 son potentes estabilizantes. En este modelo, la trehalosa, sorbitol y manitol tienen muy poco efecto. Las principales diferencias son que el pH ahora es un factor significativo y que el EDTA es un desestabilizante significativo, mientras que parece que la Met es también un estabilizante.

Discusión del Modelo B de PLS - Figura 17

Este modelo sugiere que la adición de citrato tiene poco efecto en la estabilidad si no hay fosfato (véase el borde posterior de la superficie de respuesta de la figura 5). Por otro lado, el fosfato añadido disminuye el contenido de monómero (véase el borde de la derecha) y la combinación es todavía más desestabilizante (Figura 5). Por lo tanto, la combinación de tampones de citrato-fosfato no es efectiva para estabilizar adalimumab, al contrario de lo que enseña la patente '583. El efecto desestabilizante del fosfato es aproximadamente tres veces mayor que para el citrato según este modelo.

Discusión del Modelo B de PLS - Figura 18

El uso de His a pH bajo tiene poco efecto o efectos perjudiciales (Figura 18[6]). Sin embargo, cuando se usa a pH 5,2 o superior, la His proporciona un aumento significativo en la estabilidad (medido por el contenido de monómero por SEC).

Discusión del Modelo B de PLS - Figura 19

La superficie de respuesta para la Gly y Arg se muestra en la Figura 19. Incluir ambos estabilizantes en concentraciones altas sería beneficioso para la estabilidad, pero poco práctico por razones de tonicidad. Parece que la Arg es el estabilizante más potente en este modelo en comparación con la Gly, donde una concentración de Arg de 75 mM tiene el mismo efecto que la Gly ~120 mM. El modelo indica que uno solo funcionaría bien o que una combinación también sería efectiva.

Discusión del Modelo B de PLS - Figura 20

El modelo B de PLS muestra un efecto modesto del manitol en la estabilidad, mientras que el PS 80 es un estabilizante efectivo por encima de concentraciones cercanas a 0,05% (Figura 20). Por lo tanto, se podría concluir de estos datos que una formulación estable podría estar compuesta de manitol 240 mM y PS 80 al 0,1% a pH 5,2.

Discusión del Modelo B de PLS - Figura 21

A lo largo del proyecto, parece que el NaCl es un desestabilizante de adalimumab, en especial cuando la concentración

alcanza los 100 mM o más, como se muestra en esta superficie de respuesta (Figura 21). Aunque solo se ensayaron algunas formulaciones que incluían EDTA, parece que este excipiente es desestabilizante, a menos que la concentración fuera ~0,1%. También se observó que el efecto de la Met era favorable con respecto a la estabilidad, pero no demostró ser un efecto significativo, probablemente porque se evaluaron relativamente pocos ejemplos.

5 Discusión del Modelo B de PLS - Figura 22

La superficie de respuesta final del modelo B de PLS que hay que considerar es el efecto del succinato y la His (Figura 22). El modelo incluía todas las interacciones de tampón-tampón relevantes. Esta superficie muestra que el succinato tiene poco efecto o incluso efectos perjudiciales por sí solo (véase el borde frontal del gráfico). Sin embargo, en conjunto con la His demuestra que aumenta la estabilidad general (p. ej., obsérvese el borde posterior de la superficie).

10 Por lo tanto, parece que un sistema de tampón de His-succinato es el más favorable de todas las combinaciones de tampones ensayadas hasta la fecha.

El tercer modelo de PLS (modelo C de PLS)

15 El tercer modelo C de PLS usaba la diferencia en porcentaje de pureza por RP HPLC en t1 como criterio de valoración. El modelo usaba dos PC y tenía un coeficiente de correlación para el conjunto de calibración de 0,86 y un valor r de 0,67 para el conjunto de validación. Era un modelo cuadrático que incluía términos de interacción pH-tampón y tampón-tampón. En términos de calidad del modelo, esto es muy similar al modelo anterior.

Tabla L

Coeficientes de correlación del "modelo C" de PLS

Factor	valor r
pH	-0,115
proteína	-0,139
citrato	+0,014
fosfato	+0,084
succinato	-0,051
histidina	-0,075
acetato	+0,159
glicina	-0,096
arginina	-0,045
sorbitol	+0,029
trehalosa	+0,020
manitol	-0,060
NaCl	+0,068
F68	-0,047
PS 20	-0,067
PS 80	-0,028
EDTA	+0,099
Met	-0,015

20 El modelo C de PLS demuestra que la RP HPLC indica la estabilidad, aunque la sensibilidad puede ser menor que para SEC. El modelo encuentra que tanto el fosfato como el citrato son desestabilizantes, siendo el efecto del fosfato estadísticamente significativo (Tabla LI). Del mismo modo, el acetato es un desestabilizante fuerte como lo es el EDTA. Se muestra que tanto la Gly como la Arg son estabilizantes, pero los efectos no se consideran estadísticamente significativos. Se encontró que solo la His era un estabilizante significativo (junto con la concentración de proteína).

25 Discusión del Modelo C de PLS - Figura 23

La superficie de respuesta para el citrato y fosfato a pH 5,2 se muestra en Figura 23[11]. Ambos tampones son desestabilizantes (sigue los bordes frontal e izquierdo del gráfico). Por encima de concentraciones de ~10 mM, la combinación se vuelve bastante desestabilizante. En general, se predice que el fosfato es más desestabilizante según este modelo (Figura 11).

30

Discusión del Modelo C de PLS - Figura 24

Como se ha visto en modelos anteriores, la estabilidad del adalimumab disminuye a medida que el pH se reduce a menos de 5,0 (Figura 12). En este modelo, el efecto estabilizante de la His se observa en todos los valores de pH,

pero es más pronunciado cuando el pH es más bajo.

Discusión del Modelo C de PLS - Figura 25

Los efectos de la Gly y Arg se ven en la figura 25. Ambos excipientes disminuyen la pérdida de pureza a medida que aumenta la concentración y se predice que serán más o menos equipotentes, según las pendientes a lo largo de los bordes de la superficie de respuesta. De lo contrario, parece que se necesita menos Arg (75 mM) para lograr una pérdida de pureza óptima (la región azul del gráfico) que para la Gly (~200 mM).

Discusión del Modelo C de PLS - Figura 26

El efecto del manitol y PS 80 se ve en la superficie de respuesta en la figura 26[14]. Está claro que la estabilidad química mejora mucho al añadir PS 80, en especial en concentraciones superiores a 0,04%. Mientras tanto, el manitol también es estabilizante, pero incluso el manitol 240 mM tiene menos efecto que una pequeña cantidad de tensioactivo.

Discusión del Modelo C de PLS - Figura 27

Aunque se cree que el manitol es un estabilizante en la formulación de Humira®, el NaCl es claramente un desestabilizante, tanto en este modelo (véase la figura 27[15]) como en modelos de PLS previos. El efecto es sustancial cuando la concentración de NaCl supera 75 mM o similar.

Discusión del Modelo C de PLS - Figura 28

La superficie de respuesta final del modelo C de PLS se ve en la figura 28[16] que describe los efectos del pH y la concentración de proteínas. Como se ha visto antes, la estabilidad es la mejor cuando el pH está por encima de 4,8 o 5,0. En cuanto al efecto de proteína, este modelo predice que la estabilidad, basada en RP HPLC, es mejor a concentraciones de proteína más altas. Se observó una tendencia similar, aunque bastante débil, para los datos de SEC (contenido de monómero en t1 y t2). Por lo tanto, puede ser posible lograr perfiles de estabilidad similares en concentraciones de 100 mg/ml como se podría obtener con 50 mg/ml.

Resumen de los hallazgos para los bloques A a H

Los estudios de formulaciones en los Bloques A a H evaluaban las formulaciones de adalimumab almacenadas a temperatura elevada y mantenidas durante una semana a 40°C o durante dos semanas a 25°C. La estabilidad se controló usando SEC, RP HPLC, cIEF y CE-SDS.

El pH óptimo parece que es $5,2 \pm 0,2$. De todas las composiciones tampón ensayadas, la combinación de citrato-fosfato es inferior a casi cualquier otro sistema de tampón evaluado, por lo tanto, un aspecto importante de la presente invención es evitar este sistema de tampón combinado por completo. El mejor tampón individual parece que es la His, mientras que un tampón de His-succinato también ofrece muy buena estabilidad. Incluso los sistemas sin tampones, que dependen de la capacidad de la proteína para tamponar la formulación, parece que tienen perfiles de estabilidad aceptables en condiciones de estrés acelerado.

De todos los estabilizantes/modificadores de tonicidad evaluados, tanto la Arg como la Gly producen una muy buena estabilización de adalimumab. Ambos funcionan mejor que el manitol. El manitol parece que es un estabilizante, sin embargo, se ha descubierto que, si se usa, debe ser en las concentraciones más altas posibles, pero en cualquier caso superiores a aproximadamente 150 mM, y lo más preferiblemente a o superiores a aproximadamente 200 mM. En comparación, el NaCl es claramente un desestabilizante, en especial cuando las concentraciones superan 75-100 mM; por lo tanto, el NaCl, si está presente, se debe controlar a niveles inferiores a aproximadamente 75 mM. Otros polioles, tales como el sorbitol y la trehalosa, parece que funcionan tan bien como el manitol y, por lo tanto, pueden sustituir al manitol si se desea.

Sorprendentemente, el polisorbato 80 (PS 80) proporciona una protección significativa contra el estrés térmico. Aunque no se conoce el mecanismo de estabilización, parece que otros tensioactivos ensayados (PS 20 y F-68) no parecen que sean tan eficaces como el PS 80. Por lo tanto, la selección de PS80 frente a PS 20 es una característica preferida de la presente descripción. Las formulaciones de acuerdo con la presente descripción contienen preferiblemente contienen al menos 0,04% (p/v) de PS 80.

Basándose en los hallazgos en los estudios de formulaciones de los bloques A a H, las siguientes son formulaciones de adalimumab particularmente preferidas de acuerdo con la presente descripción.

Tabla M

Formulaciones seleccionadas

Forma N°	pH	His (mM)	succinato (mM)	Gly (mM)	Arg (mM)	manitol (mM)	NaCl (mM)	PS 80 (% en peso)
A	5,2	30	0	240	0	0	0	0,1
B	5,2	30	0	240	0	0	0	0,02
C	5,2	30	0	0	0	240	0	0,1
D	5,2	30	15	0	0	220	0	0,1
E	5,2	30	0	90	0	150	0	0,1
F	5,2	30	0	240	0	0	0	0
G	5,2	20	0	0	0	240	0	0
H	5,4	30	0	240	0	0	0	0,02
I	5,2	30	0	120	80	0	0	0,1
J	5,2	30	15	90	80	0	0	0,1
K	5,2	30	0	0	0	240	0	0,1
L	5,2	30	0	0	50	160	0	0,1
M	5,2	30	0	90	100	0	0	0,1
N	5,2	20	0	120	90	0	0	0,1
O	5,4	30	0	120	80	0	0	0,1
P	5,2	30	0	120	0	0	50	0,01
Q	5,2	30	0	0	0	240	0	0,02

Componentes adicionales de las composiciones farmacéuticas proporcionadas

- 5 Las formulaciones de la descripción también pueden incluir otros tampones (salvo que se excluyan específicamente en la descripción de los ejemplos específicos de la descripción), modificadores de la tonicidad, excipientes, vehículos farmacéuticamente aceptables y otros ingredientes inactivos usados habitualmente en las composiciones farmacéuticas.
- 10 Un modificador de la tonicidad es una molécula que contribuye a la osmolalidad de una disolución. La osmolalidad de una composición farmacéutica se ajusta preferiblemente para maximizar la estabilidad del ingrediente activo y/o minimizar la incomodidad para el paciente tras la administración. En general, se prefiere que una composición farmacéutica sea isotónica con el suero, es decir, que tenga la misma osmolalidad o similar, lo que se consigue mediante la adición de un modificador de tonicidad.
- 15 En una realización preferida, la osmolalidad de las formulaciones proporcionadas es de aproximadamente 180 a aproximadamente 420 mOsM. Sin embargo, debe entenderse que la osmolalidad puede ser mayor o menor según lo requieran condiciones específicas.
- 20 Los ejemplos de modificadores de la tonicidad adecuados para modificar la osmolalidad incluyen, pero no se limitan a aminoácidos (sin incluir arginina) (p. ej., cisteína, histidina y glicina), sales (p. ej., cloruro de sodio o cloruro de potasio) y/o azúcares/polioles (p. ej. sacarosa, sorbitol, maltosa y lactosa).
- Los modificadores de la tonicidad adecuados pueden estar presentes en las composiciones de la descripción a menos que se excluyan específicamente en la descripción de los ejemplos específicos de la descripción.
- 25 También se pueden añadir excipientes, también denominados aditivos químicos, cosolutos o codisolventes, que estabilizan el polipéptido mientras están en disolución (también en formas secas o congeladas) a una composición farmacéutica. Los excipientes son bien conocidos en la técnica y se fabrican por métodos conocidos y están disponibles en proveedores comerciales.
- 30 Los ejemplos de excipientes adecuados incluyen, pero no se limitan a azúcares/polioles tales como: sacarosa, lactosa, glicerol, xilitol, sorbitol, manitol, maltosa, inositol, trehalosa, glucosa; polímeros tales como: albúmina de suero (albúmina de suero bovino (BSA), SA humana o HA recombinante), dextrano, PVA, hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), polietilenimina, gelatina, polivinilpirrolidona (PVP), hidroxietilcelulosa (HEC); disolventes no acuosos tales como: alcoholes polihidráticos, (p. ej., PEG, etilenglicol y glicerol) dimetilsulfóxido (DMSO) y dimetilformamida (DMF); aminoácidos tales como: prolina, L-serina, ácido glutámico de sodio, alanina, glicina, hidrocloruro de lisina, sarcosina y ácido gamma-aminobutírico; tensioactivos tales como: Tween®-80 (polisorbato 80), Tween®-20 (polisorbato 20), SDS, polisorbatos, poloxámeros; y excipientes diversos tales como: fosfato de potasio, acetato de sodio, sulfato de amonio, sulfato de magnesio, sulfato de sodio, N-óxido de trietilamina, betaina, CHAPS, monolaurato, 2-O-beta-
- 35

manoglicerato, o cualquier combinación de los anteriores.

Pueden estar presentes excipientes adecuados en las composiciones de la invención a menos que se excluyan específicamente en la descripción de las realizaciones específicas de la invención.

La concentración de uno o más excipientes en una formulación de la descripción es/está preferiblemente entre 5 aproximadamente 0,001 a 5 por ciento en peso, más preferiblemente aproximadamente 0,1 a 2 por ciento en peso.

Composiciones para usar en métodos de tratamiento

En otro ejemplo, la descripción proporciona una composición para usar en un método de tratamiento de un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de las composiciones farmacéuticas de la invención a un mamífero, en donde el mamífero tiene una enfermedad o trastorno que se puede tratar de forma beneficiosa con 10 adalimumab.

En un ejemplo preferido, el mamífero es un ser humano.

Las enfermedades o trastornos que se pueden tratar con las composiciones proporcionadas incluyen, pero no se limitan a artritis reumatoide, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Wegener (granulomatosis), enfermedad de Crohn (o enfermedad inflamatoria intestinal), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), 15 hepatitis C, endometriosis, asma, caquexia, psoriasis y dermatitis atópica. Las enfermedades o trastornos adicionales que se pueden tratar con las composiciones de la presente invención incluyen las descritas en las patentes de EE.UU. Nº 6.090.382 y 8.216.583.

Las composiciones farmacéuticas proporcionadas se pueden administrar a un sujeto que necesita tratamiento por inyección sistémica, tal como por inyección intravenosa; o por inyección o aplicación en el sitio relevante, tal como por 20 inyección directa, o aplicación directa al sitio cuando el sitio está expuesto en cirugía; o por aplicación tópica.

En una realización, la invención proporciona una composición para usar en un método de tratamiento y/o prevención de la artritis reumatoide, que comprende administrar a un mamífero que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de una de las composiciones de adalimumab proporcionadas.

25 La cantidad terapéuticamente eficaz del adalimumab en las composiciones proporcionadas dependerá de la afección que se va a tratar, la gravedad de la afección, la terapia previa y el historial clínico del paciente y la respuesta al agente terapéutico. La dosis adecuada se puede ajustar de acuerdo con el criterio del médico que asiste, de modo que se puede administrar al paciente una vez o a lo largo de una serie de administraciones.

En una realización, la cantidad eficaz de adalimumab por dosis para adulto es de aproximadamente 1-500 mg/m², o de aproximadamente 1-200 mg/m², o de aproximadamente 1-40 mg/m² o aproximadamente 5-25 mg/m².

30 Alternativamente, se puede administrar una dosis fija, cuya cantidad puede variar de 2-500 mg/dosis, 2-100 mg/dosis o de aproximadamente 10-80 mg/dosis.

Si la dosis se va a administrar más de una vez por semana, un intervalo de dosis de ejemplo es el mismo que el de los intervalos de dosis descritos anteriormente o inferior y preferiblemente se administra dos o más veces por semana en un intervalo de dosis de 25-100 mg/dosis.

35 En otra realización, una dosis aceptable para administración por inyección contiene 80-100 mg/dosis, o alternativamente, contiene 80 mg por dosis.

La dosis se puede administrar semanalmente, quincenalmente o separada por varias semanas (por ejemplo, de 2 a 8).

En una realización, adalimumab se administra en 40 mg mediante una única inyección subcutánea (SC).

40 En algunos casos, se obtendrá una mejora en la afección de un paciente administrando una dosis de hasta aproximadamente 100 mg de la composición farmacéutica de una a tres veces por semana a lo largo de un período de al menos tres semanas. El tratamiento durante períodos más largos puede ser necesario para inducir el grado deseado de mejoría. Para afecciones crónicas incurables, el régimen se puede continuar indefinidamente. Para pacientes pediátricos (edades de 4-17 años), un régimen adecuado puede implicar la administración de una dosis de 0,4 mg/kg a 5 mg/kg de adalimumab, una o más veces por semana.

En otra realización, las formulaciones farmacéuticas de la invención se pueden preparar en una formulación en masa, y como tal, los componentes de la composición farmacéutica se ajustan para que sean más altos de lo que se requeriría para la administración y se diluyen adecuadamente antes de la administración.

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar como un solo tratamiento terapéutico o en combinación con

terapias adicionales según sea necesario. Por lo tanto, en una realización, las composiciones proporcionadas para usar en métodos de tratamiento y/o prevención se usan en combinación con la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente activo. El otro agente activo se puede administrar antes, durante o después de administrar las composiciones farmacéuticas de la presente invención. Otro agente activo se puede administrar como parte de las composiciones proporcionadas, o alternativamente, como una formulación separada.

La administración de las composiciones farmacéuticas proporcionadas se puede lograr de varias maneras, que incluyen la administración parenteral, oral, bucal, nasal, rectal, intraperitoneal, intradérmica, transdérmica, subcutánea, intravenosa, intraarterial, intracardiaca, intraventricular, intracraneal, intratraqueal, administración intratecal, inyección intramuscular, inyección intravítreo y aplicación tópica.

10 Las composiciones farmacéuticas de esta invención son particularmente útiles para la administración parenteral, es decir, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intracerebrospinal, intraarticular, intrasinovial y/o intratecal. La administración parenteral puede ser por inyección de bolo o infusión continua. Las composiciones farmacéuticas para inyección pueden presentarse en forma farmacéutica unitaria, p. ej., en ampollas o en envases multidosis, con un conservante añadido. Además, se han desarrollado una serie de enfoques recientes de suministro de fármacos y las composiciones farmacéuticas de la presente invención son adecuadas para la administración usando estos nuevos métodos, por ejemplo, Inject-ease®, Genject®, inyectores como GenPen® y dispositivos sin aguja tales como MediJector® y BioJector®. La presente composición farmacéutica también se puede adaptar para métodos de administración aún por descubrir. Véase también Langer, 1990, *Science*, 249: 1527-1533.

20 Las composiciones farmacéuticas proporcionadas también se pueden formular como una preparación de depósito. Dichas formulaciones de acción prolongada se pueden administrar por implantación (por ejemplo, por vía subcutánea o intramuscular) o por inyección intramuscular. Por lo tanto, por ejemplo, las formulaciones se pueden modificar con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados bastante solubles, por ejemplo, como una sal bastante soluble.

25 Las composiciones farmacéuticas se pueden presentar, si se desea, en un vial, envase o dispositivo dispensador que puede contener una o más formas farmacéuticas unitarias que contienen el principio activo. En un ejemplo, el dispositivo dispensador puede comprender una jeringa que tiene una dosis única de la formulación líquida lista para inyección. La jeringa puede ir acompañada de instrucciones para la administración.

30 En otro ejemplo, la presente invención se dirige a un kit o recipiente, que contiene una composición farmacéutica acuosa de la invención. La concentración del polipéptido en la composición farmacéutica acuosa puede variar en un amplio intervalo, pero generalmente está dentro del intervalo de aproximadamente 0,05 a aproximadamente 20,000 microgramos por mililitro ($\mu\text{g}/\text{ml}$) de formulación acuosa. El kit también puede ir acompañado de instrucciones de uso.

Además de las formulaciones a las que se hace referencia en los estudios de formulación de los Bloques A a H, se proporcionan los siguientes ejemplos adicionales como ejemplos adicionales de la invención:

Ejemplo 1

35 Formulación de adalimumab estabilizada (tampón único) que contiene poliol; sin tensioactivo

Se puede preparar una composición farmacéutica acuosa estable que contiene adalimumab, usando un único tampón, y sustancialmente exenta de un tensioactivo, como sigue:

40 Se puede pesar cada componente sólido de la formulación en la cantidad requerida para un volumen dado de tampón de formulación. Despues, estos componentes se pueden combinar en un vaso de precipitados o recipiente capaz de transportar y medir el volumen dado de tampón de formulación. Se puede añadir al vaso de precipitados un volumen de agua desionizada igual a aproximadamente $\frac{3}{4}$ del tampón de formulación objetivo dado, y los componentes se pueden solubilizar mediante el uso de una barra agitadora magnética. El pH del tampón se puede ajustar al pH de la formulación objetivo usando hidróxido de sodio 1 molar y/o cloruro de hidrógeno 1 molar. El volumen final del tampón de formulación se puede elevar al volumen objetivo por la adición de agua desionizada. Despues, la solución se puede mezclar con una barra agitadora magnética despues de la adición final de agua. La disolución de adalimumab se puede colocar en una caja de material de diálisis (tal como la Unidad de diálisis Slide-A-Lyzer MINI de Thermo Scientific con MWCO de 10.000), que despues se puede poner en contacto con el tampón de formulación deseado durante 12 horas a 4°C. La relación de volumen de tampón de formulación a volumen de disolución de proteína no debe ser inferior a 1000:1. La caja de diálisis y la disolución de proteína que contiene se pueden colocar en un segundo volumen igual de tampón de formulación durante 12 horas adicionales a 4°C.

50 Después la disolución resultante de adalimumab se puede retirar de la caja del material de diálisis, y la concentración de adalimumab se puede determinar usando espectroscopía ultravioleta. Despues, la concentración de adalimumab se puede ajustar al nivel deseado usando centrifugación (tal como concentradores centrífugos Amicon Ultra con MWCO de 10.000) y/o dilución con tampón de formulación.

Una composición de muestra de la descripción se representa en la Tabla 1 a continuación:

Tabla 1

Ingrediente	concentración
Adalimumab (principio activo)	50 mg/ml
Manitol (ingrediente inactivo)	4%
Citrato (pH 5,2) (tampón único)	15 mM

La composición descrita en la tabla 1 no contiene una combinación de tampón de citrato y fosfato. Tampoco requiere la presencia de un tensioactivo.

5 Ejemplo 2

Formulación de adalimumab estabilizada (tampón único) sin poliol o tensioactivo

Ingrediente	concentración
Adalimumab (principio activo)	50 mg/ml
Citrato (pH 5,2)	15 mM
Glicina (ingrediente inactivo)	100 mM

Ejemplo 3

10 Formulación de adalimumab estabilizada (tampón único) que contiene poliol sin tensioactivo

Ingrediente	concentración
Adalimumab (principio activo)	50 mg/ml
Manitol (ingrediente inactivo)	4%
Citrato (pH 5,2)	15 mM

Las composiciones de los ejemplos 2 y 3 tienen estabilidad a largo plazo y no contienen una combinación de tampón de citrato y fosfato y no requieren la presencia de un tensioactivo.

Ejemplo 4

15 Formulación de adalimumab estabilizada (tampón único) que contiene tensioactivo sin poliol

4A

Ingrediente	concentración
Adalimumab (principio activo)	50 mg/ml
(Sin ingrediente de poliol)	---
Tampón de histidina (pH 5,2) (tampón único)	20 mM
Glicina (estabilizante)	50 mM
Arginina (estabilizante)	130 mM
Polisorbato 80	0,1 (% en peso) (p/v)

4B

Ingrediente	concentración
Adalimumab (principio activo)	50 mg/ml
(Sin ingrediente de poliol)	---
Tampón de histidina (pH 5,2) (tampón único)	20 mM
Glicina (estabilizante)	120 mM
Arginina (estabilizante)	100 mM
Polisorbato 80	0,1 (% en peso) (p/v)

P4C

Ingrediente	concentración
Adalimumab (principio activo)	50 mg/ml
(Sin ingrediente de poliol)	---
Tampón de histidina (pH 5,2) (tampón único)	10 mM
Glicina (estabilizante)	50 mM
Arginina (estabilizante)	130 mM
Polisorbato 80	0,1 (% en peso) (p/v)

4D

Ingrediente	concentración
Adalimumab (principio activo)	50 mg/ml
(Sin ingrediente de poliol)	---
Tampón de succinato (pH 5,2) (tampón único)	20 mM
Glicina (estabilizante)	50 mM
Arginina (estabilizante)	130 mM
Polisorbato 80	0,1 (% en peso) (p/v)

5

4E

Ingrediente	concentración
Adalimumab (principio activo)	50 mg/ml
(Sin ingrediente de poliol)	---
Tampón de succinato (pH 5,2) (tampón único)	20 mM
Glicina (estabilizante)	120 mM
Arginina (estabilizante)	100 mM
Polisorbato 80	0,1 (% en peso) (p/v)

4F

Ingrediente	concentración
Adalimumab (principio activo)	50 mg/ml
(Sin ingrediente de poliol)	---
Tampón de succinato (pH 5,2) (tampón único)	10 mM
Glicina (estabilizante)	50 mM
Arginina (estabilizante)	130 mM
Polisorbato 80	0,1 (% en peso) (p/v)

10

Las composiciones descritas en los ejemplos 4(a) a 4(f) anteriores proporcionarán estabilidad sin necesidad de poliol y sin necesidad de un sistema de tampones combinados. En la medida en que la presente invención ha descubierto que la combinación de tampones de citrato/fosfato requerida en la patente de EE.UU. 8.216.583 no se requiere para la estabilización de las formulaciones de adalimumab de acuerdo con la presente invención, los expertos en la técnica pueden apreciar, en la práctica de los ejemplos 4(a) a 4(f), que se pueden usar tampones adicionales en combinación con los tampones de histidina y succinato descritos en la presente memoria (p. ej., tampones de acetato, citrato, maleato, tartrato y fosfato); siempre que la formulación no use una combinación de tampones de citrato y fosfato.

15

EJEMPLO 5

Formulación de adalimumab estabilizado (tampón único) que contiene tensioactivo; y poliol

20

5A

Ingrediente	Concentración
Adalimumab (principio activo)	50 mg/ml
Sorbitol	65 mM
Tampón de histidina (pH 5,2) (tampón único)	20 mM
Arginina (estabilizante)	130 mM
Polisorbato 80	0,1 (% en peso) (p/v)

5B

Ingrediente	Concentración
Adalimumab (principio activo)	50 mg/ml
Sorbitol	65 mM
Tampón de succinato (pH 5,2) (tampón único)	20 mM
Arginina (estabilizante)	130 mM
Polisorbato 80	0,1 (% en peso) (p/v)

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica acuosa que consiste en:

(A)

- (i) adalimumab 50 mg/ml,
- 5 (ii) tampón de histidina 10 mM,
- (iii) glicina 120 mM,
- (iv) arginina 120 mM, y
- (v) polisorbato 80 al 0,1% en peso;

(B)

- 10 (i) adalimumab 50 mg/ml,
- (ii) tampón de histidina 10 mM,
- (iii) glicina 120 mM,
- (iv) arginina 120 mM, y
- (v) polisorbato 80 al 0,05% en peso;

(C)

- (i) adalimumab 50 mg/ml,
- (ii) tampón de histidina 10 mM,
- (iii) glicina 120 mM,
- (iv) arginina 120 mM, y
- 20 (v) polisorbato 80 al 0,01% en peso;

(D)

- (i) adalimumab 50 mg/ml,
- (ii) tampón de histidina 10 mM,
- (iii) glicina 120 mM,
- 25 (iv) arginina 120 mM, y
- (v) polisorbato 20 al 0,05% en peso;

(E)

- (i) adalimumab 50 mg/ml,
- (ii) tampón de histidina 10 mM,
- 30 (iii) glicina 120 mM,
- (iv) arginina 120 mM, y
- (v) pluronic F-68 al 0,1% en peso;

(F)

- (i) adalimumab 50 mg/ml,
- 35 (ii) tampón de histidina 20 mM,

- (iii) glicina 150 mM,
- (iv) arginina 100 mM, y
- (v) polisorbato 80 al 0,01% en peso; o

(G)

- 5 (i) adalimumab 50 mg/ml,
 - (ii) tampón de histidina 20 mM,
 - (iii) glicina 120 mM,
 - (iv) arginina 120 mM, y
 - (v) polisorbato 20 al 0,01% en peso;
- 10 en donde cada uno de (A)-(G) tiene un pH de 5,2.

2. Una composición para usar en un método de tratamiento de una afección inflamatoria en un sujeto, en donde el método comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición farmacéutica de la reivindicación 1.

15

FIGURA 1

LB-140 En pH 5,2 (t2 40 C)

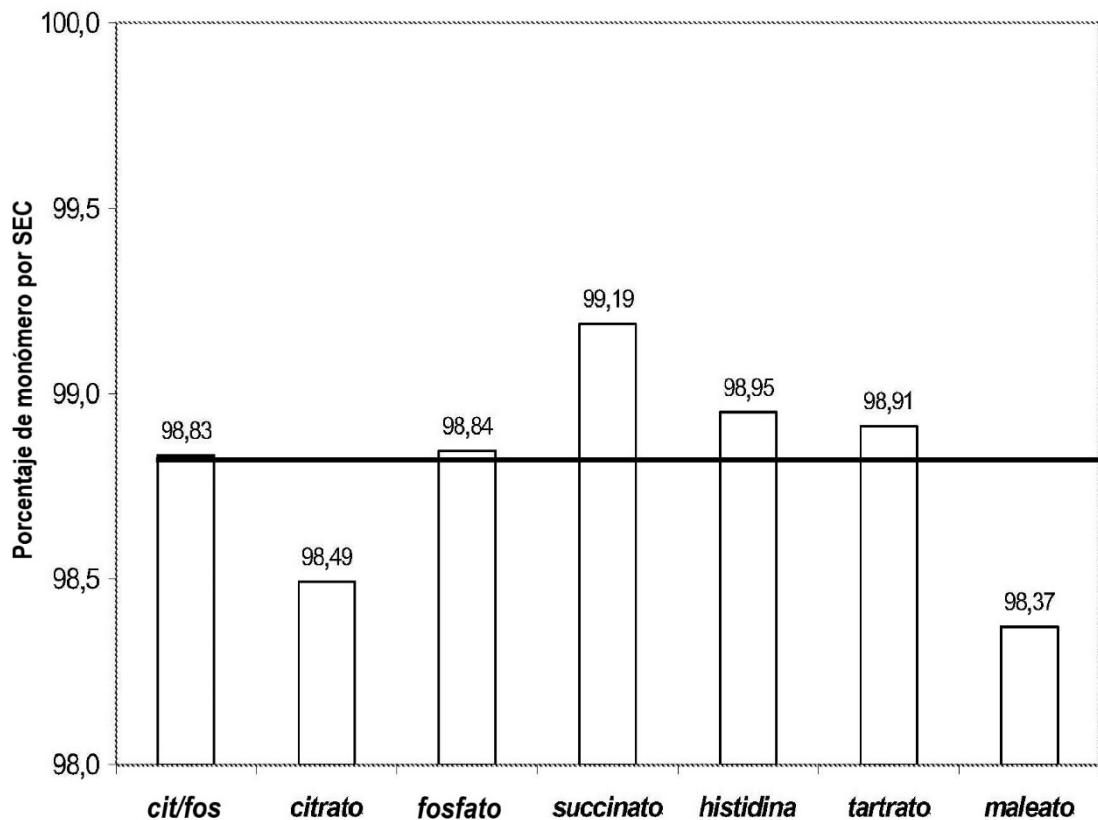


FIGURA 2

LB-140 En pH 5,2 (t2 40 C)

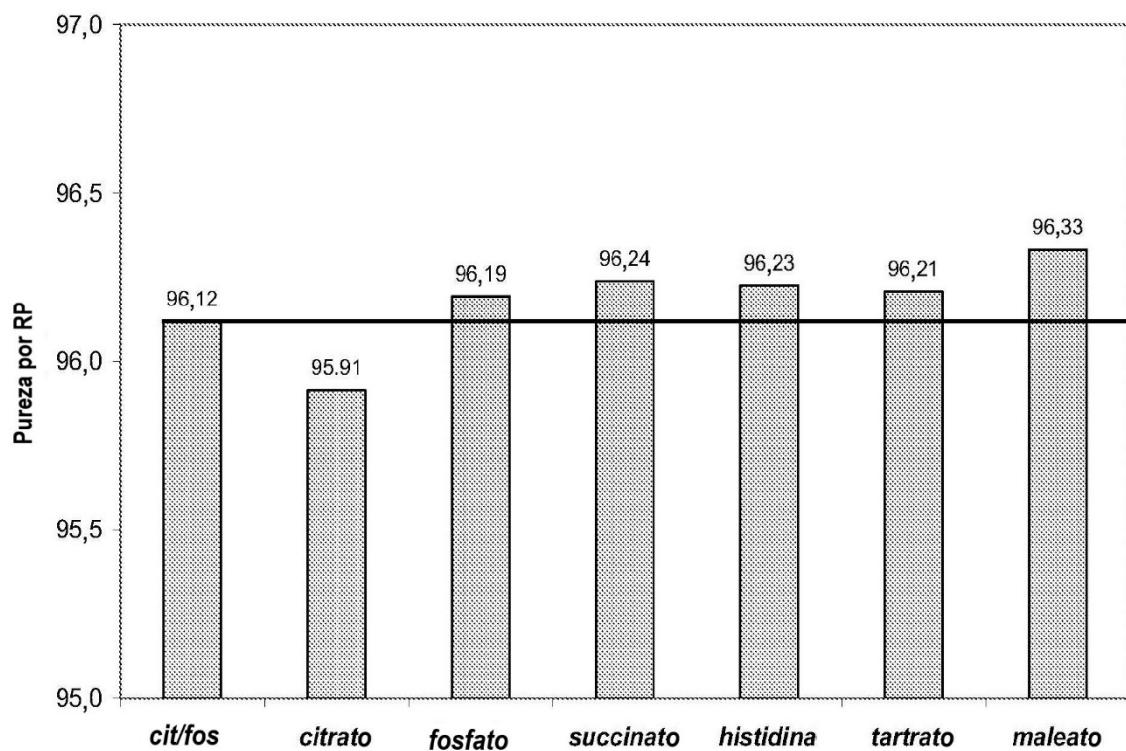
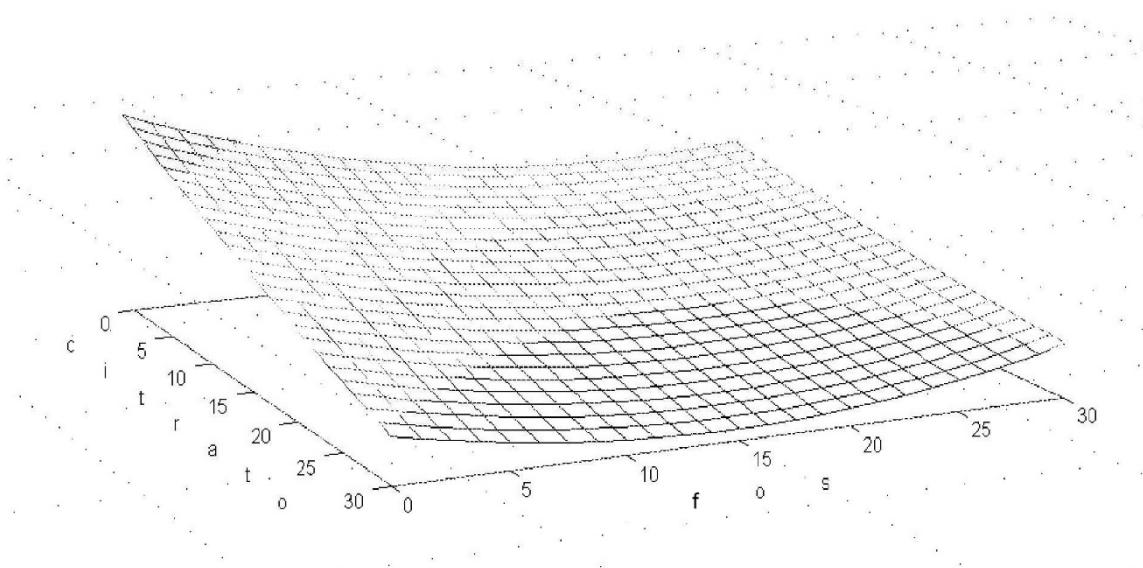
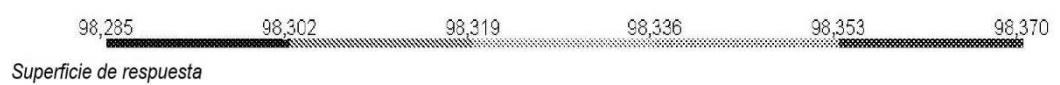


FIGURA 3

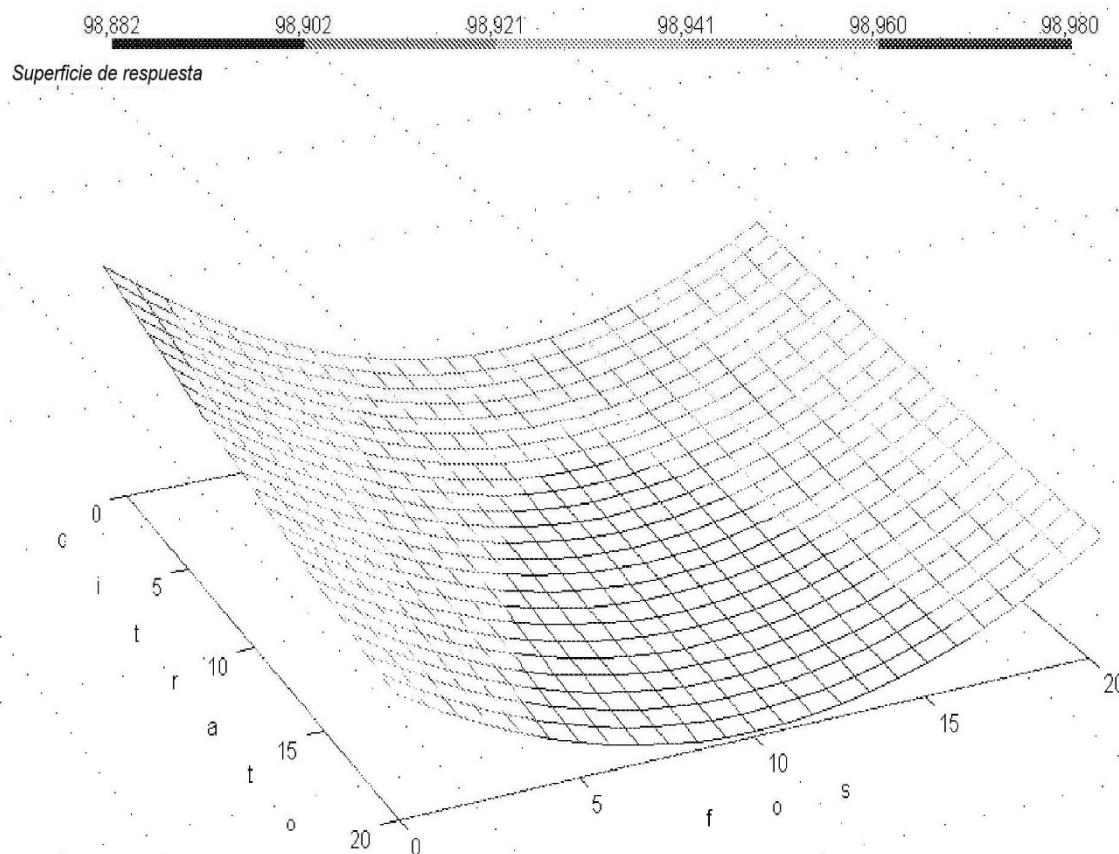
Efecto de citrato/fosfato (PLS Modelo 1)



RESULT8, PC: 1, Y-var: t1 SEC, (X-var = valor): pH t0 = 5,2000, succinato = 0,0000, histidina = 0,0000, tartrato = 0,0000, maleato = 0,0000, acetato

FIGURA 4

Efecto de citrato/fosfato (PLS Modelo 2)



LB-140 Bloques B..., PC: 1, Y-var: t2 SEC, (X-var = valor) pH t0 = 5,2000, succinato = 0,0000, histidina = 0,0000, acetato = 0,0000, glicina = 0,0000

FIGURA 5

Efecto de HIS/GLY (PLS Modelo 1)

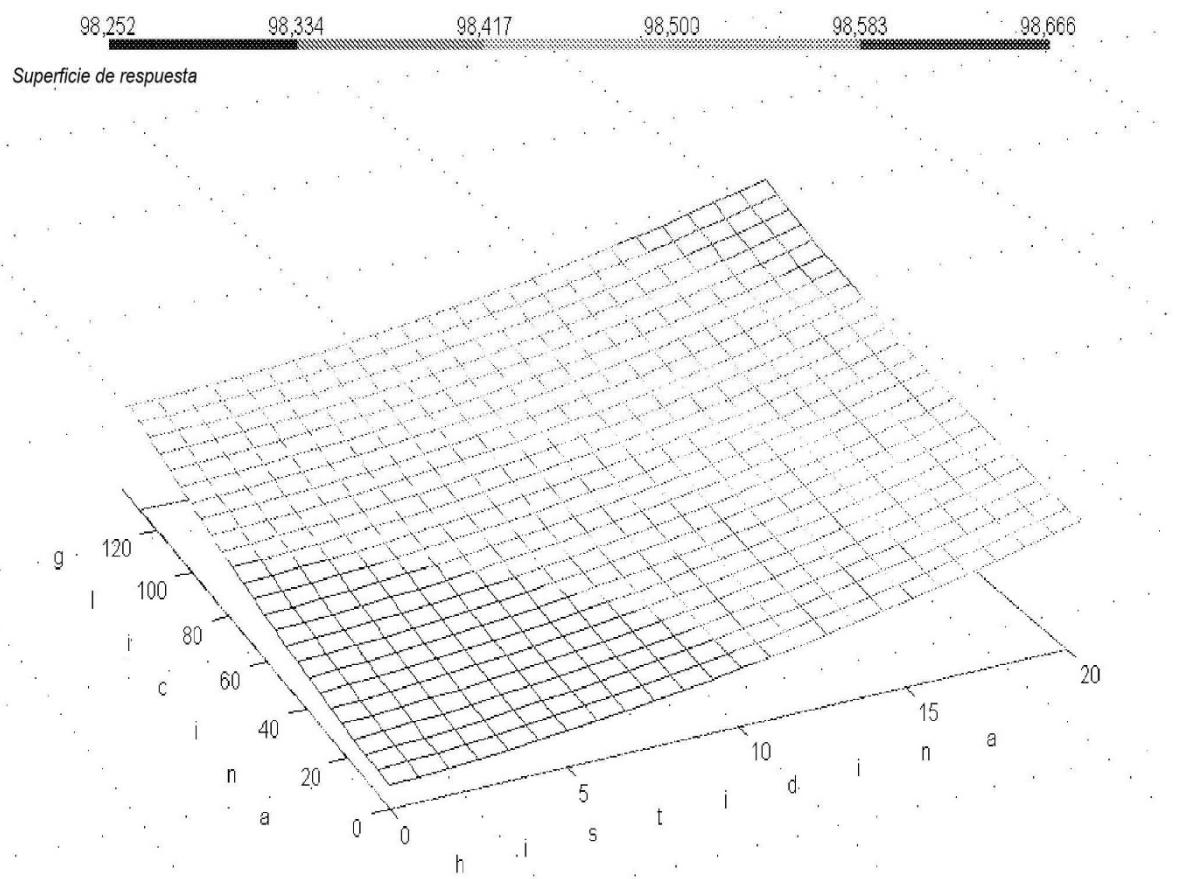
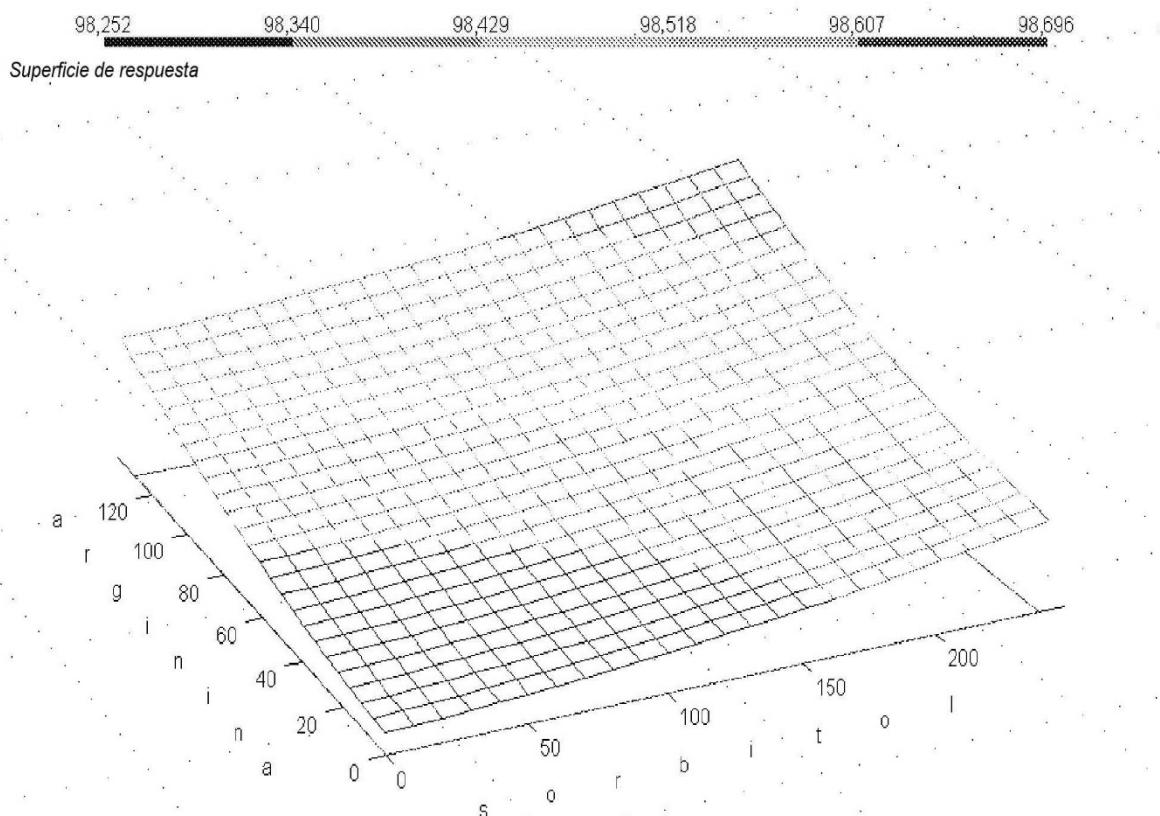
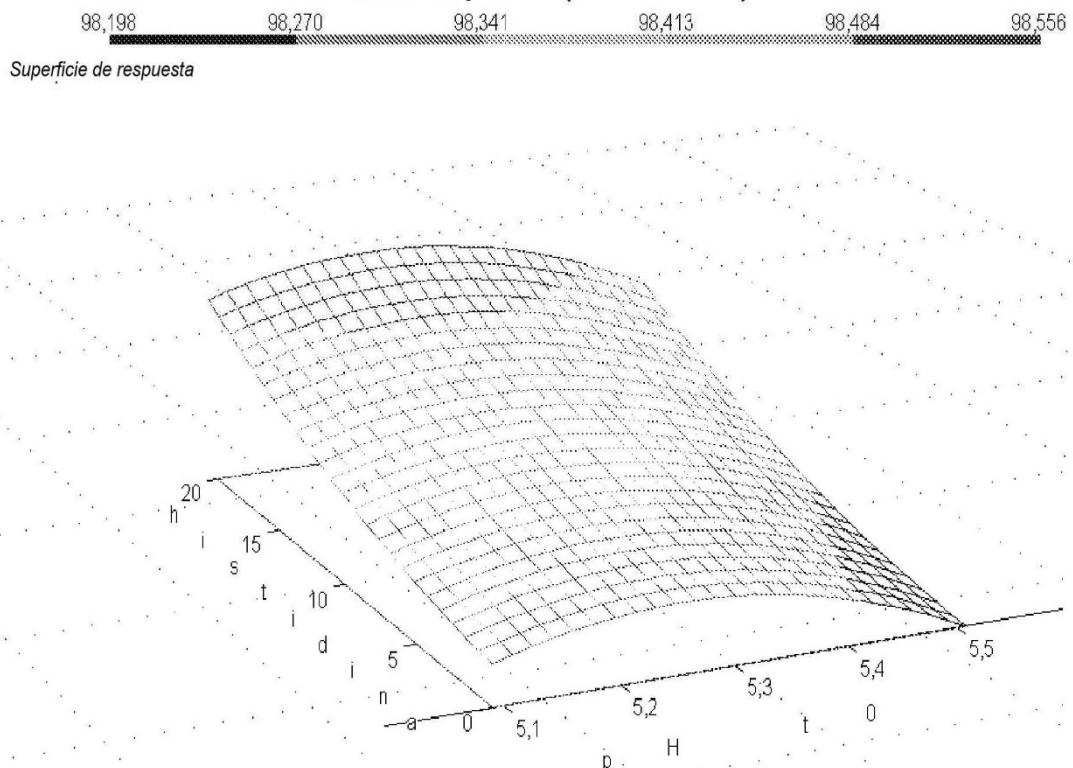


FIGURA 6

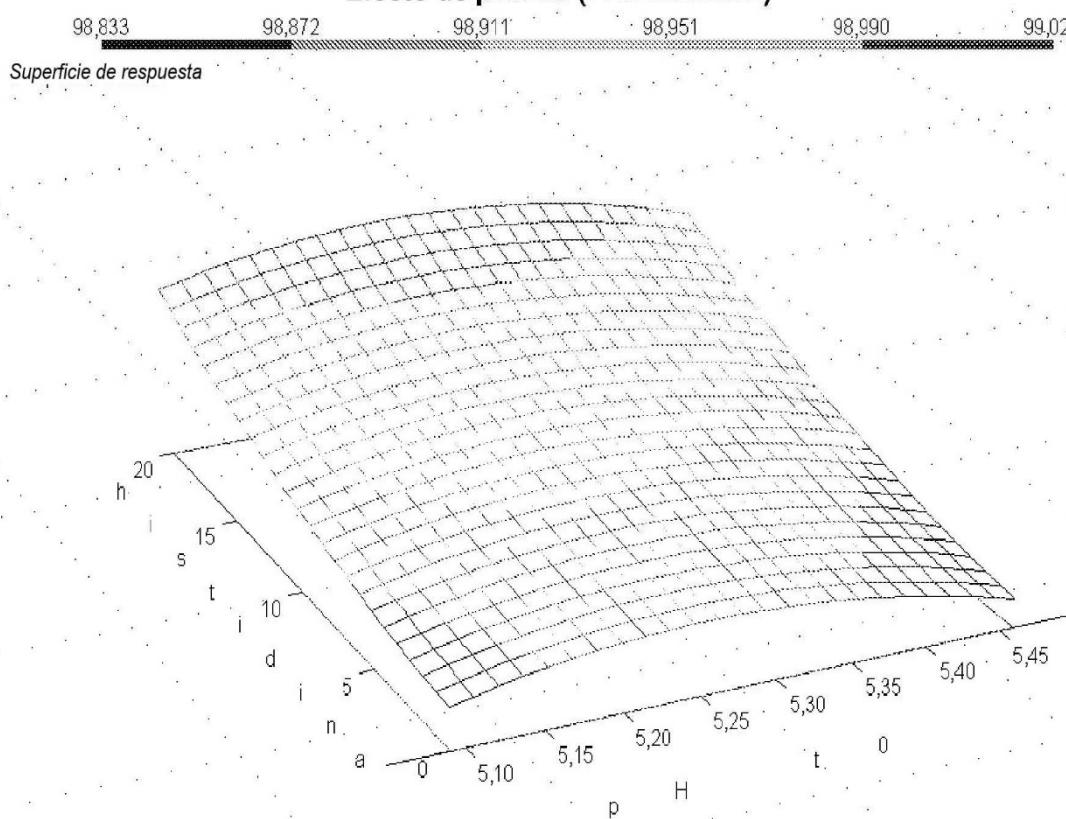
Efecto de Arg/sorbitol (PLS Modelo 1)



LB-140 SEC t1 M..., PC: 1, Y-var: t1 SEC, (X-var = valor): pH t0 = 5,2000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, histidina = 0,0000, t

FIGURA 7**Efecto de pH/His (PLS Modelo 1)**

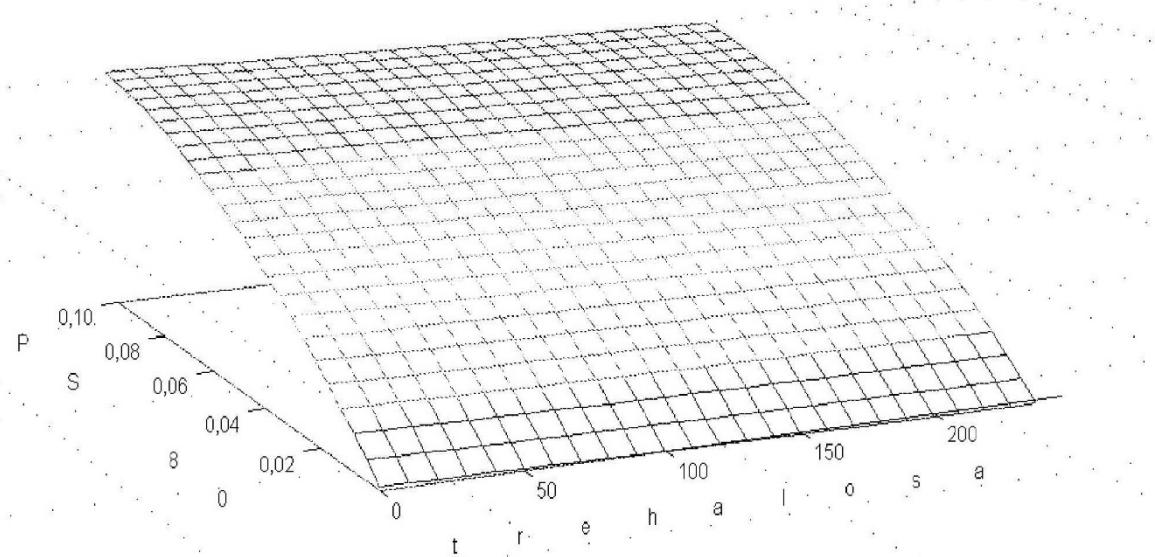
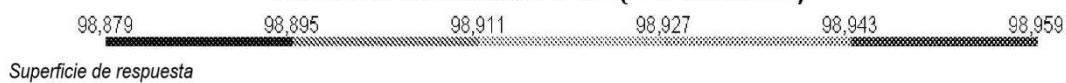
LB-140Bloques BC..., PC: 1, Y-var: t1 SEC, (X-var = valor): citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, tartrato = 0,0000, maleato = 0,0000,

FIGURA 8**Efecto de pH/His (PLS Modelo 2)**

LB-140 SEC t2 M... PC: 1, Y-var: t2 SEC, (X-var = valor): citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, glicina = 0,0000, arginina = 0,0000,

FIGURA 9

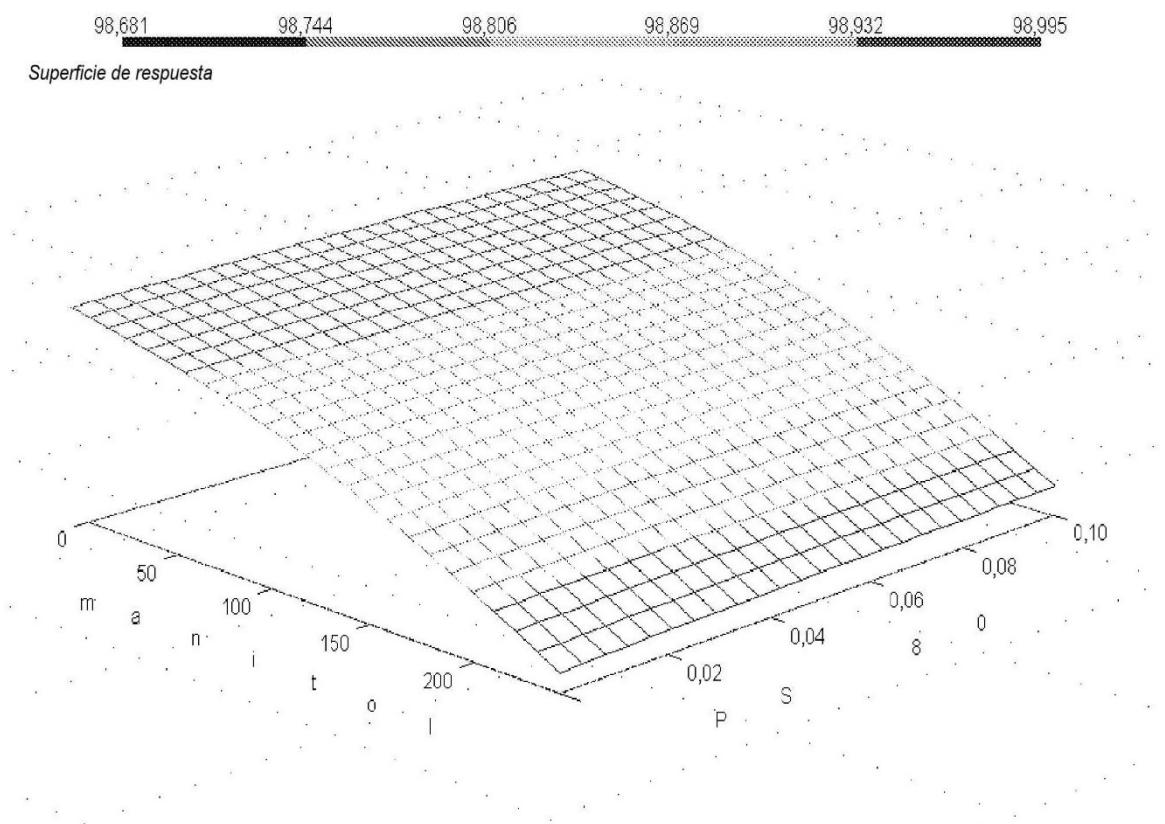
Efecto de trehalosa/PS 80 (PLS Modelo 2)



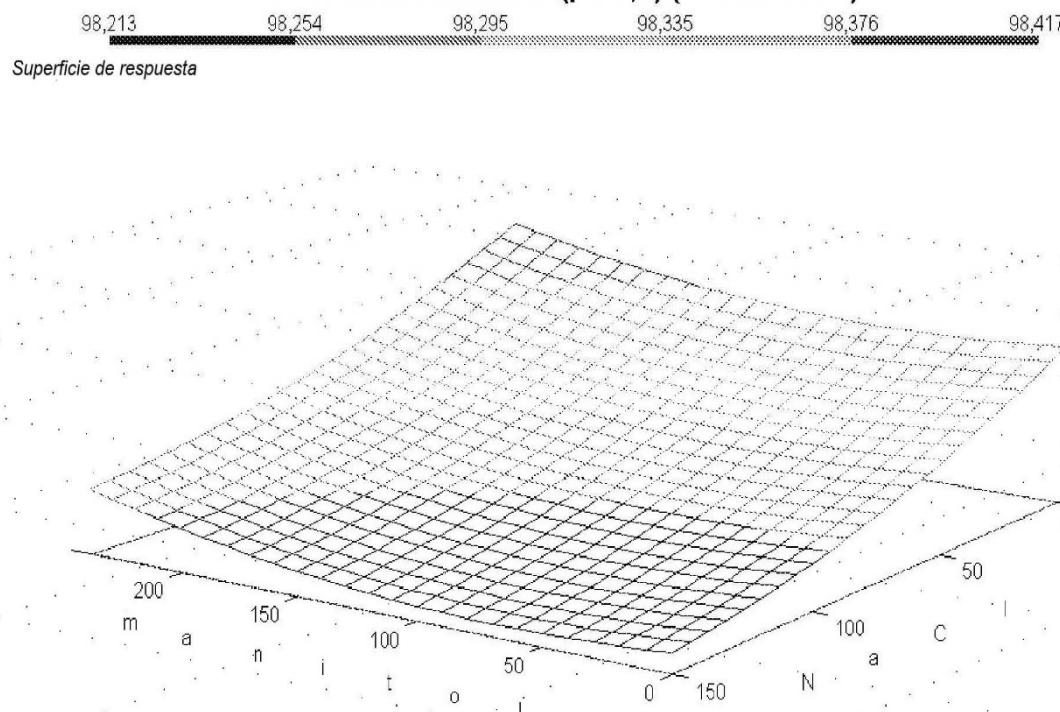
LB-140 SEC t2 M... PC: 1, Y-var: t2 SEC, (X-var = valor): pH t0 = 5,2000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, histidina = 0,0000, g

FIGURA 10

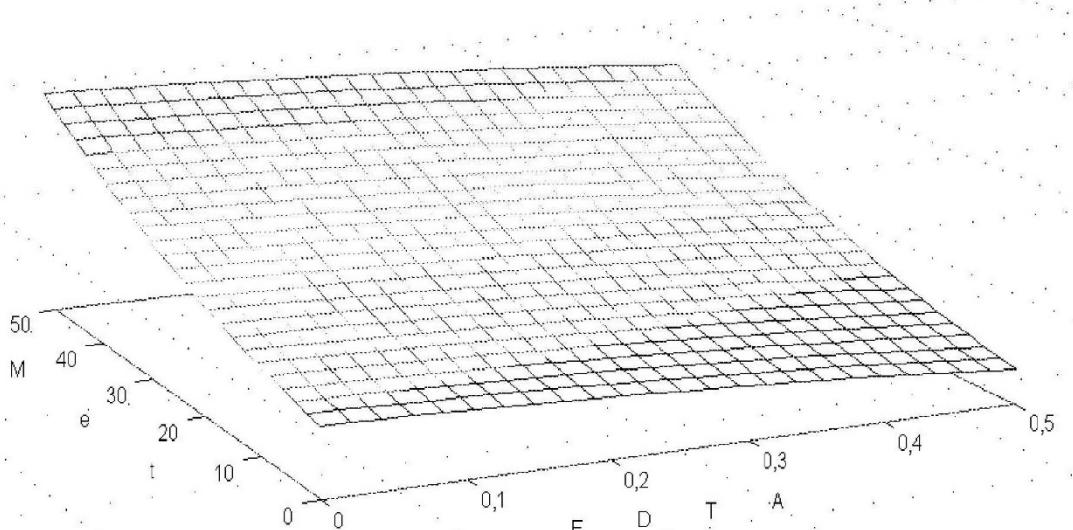
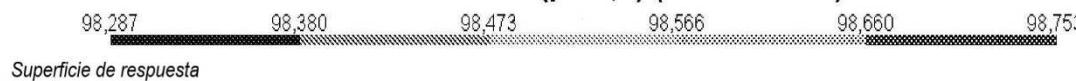
Efecto de manitol/PS80 (pH 5,2) (PLS Modelo 2)



LB-140Bloques B..., PC: 1, Y-var: t2 SEC, (X-var = valor): pH t0 = 5,2000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, histidina = 0,0000, ac

FIGURA 11**Efecto de manitol/NaCl (pH 5,2) (PLS Modelo 1)**

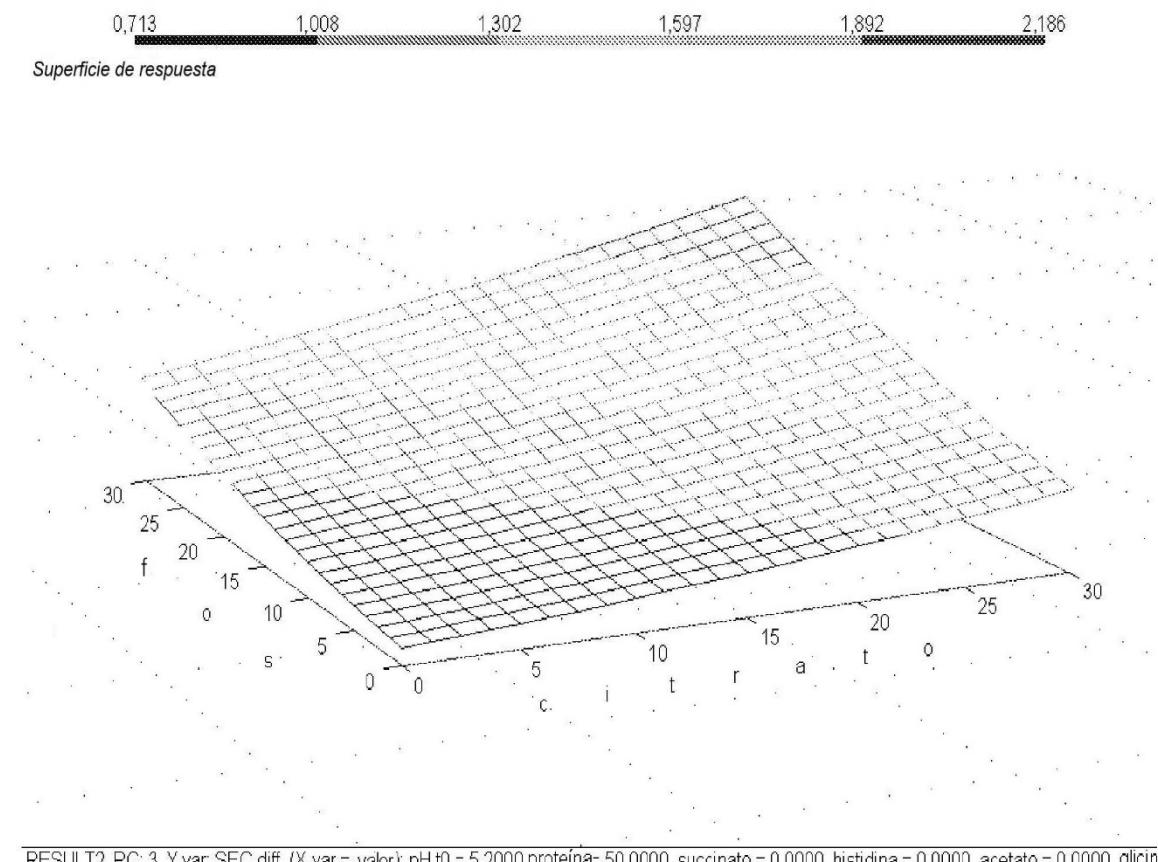
RESULT8, PC: 1, Y-var: t1 SEC, (X-var = valor): pH t0 = 5,2000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, histidina = 0,0000, tartrato = 0

FIGURA 12**Efecto de EDTA/Met (pH 5,2) (PLS Modelo 1)**

RESULT8, PC: 1, Y-var: t1 SEC, (X-var = valor): pH t0 = 5,2000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, histidina = 0,0000, tartrato = 0

FIGURA 13

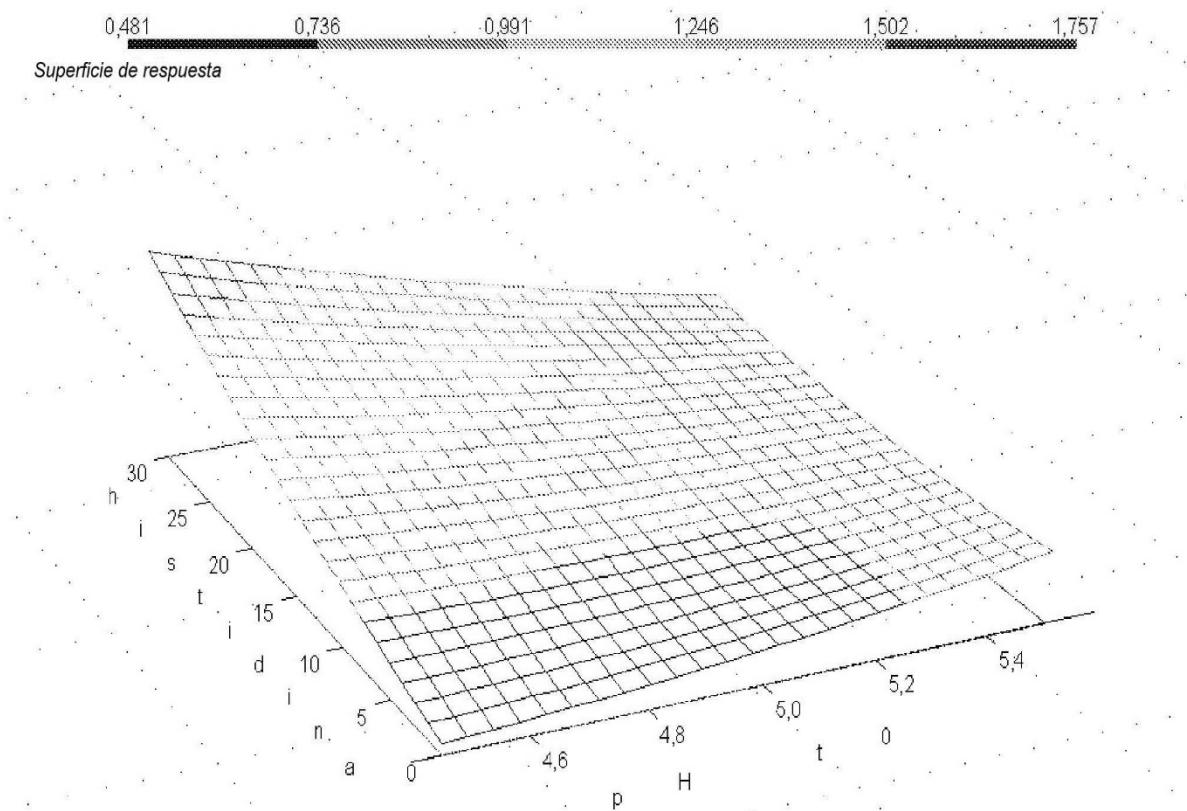
Efecto del citrato y fosfato según el modelo A de PLS usando la diferencia en el contenido de monómero en t1 como criterio de valoración. El pH se fija en 5,2 y la proteína en 50 mg/ml.



RESULT2, PC: 3, Y-var: SEC diff, (X-var = valor): pH t0 = 5,2000, proteína= 50,0000, succinato = 0,0000, histidina = 0,0000, acetato = 0,0000, glicina

FIGURA 14

Efecto del pH e His según el modelo A de PLS usando la diferencia en el contenido de monómero en t1 como criterio de valoración. La concentración de proteína se fija en 50 mg/ml



RESULT2, PC: 3, Y-var: SEC diff, (X-var = valor); proteína = 50,0000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, acetato = 0,0000, glicina

FIGURA 15

Efecto de la Gly y Arg según el modelo A de PLS usando la diferencia en el contenido de monómero en t1 como criterio de valoración. El pH se fija en 5,2 y la concentración de proteína en 50 mg.ml

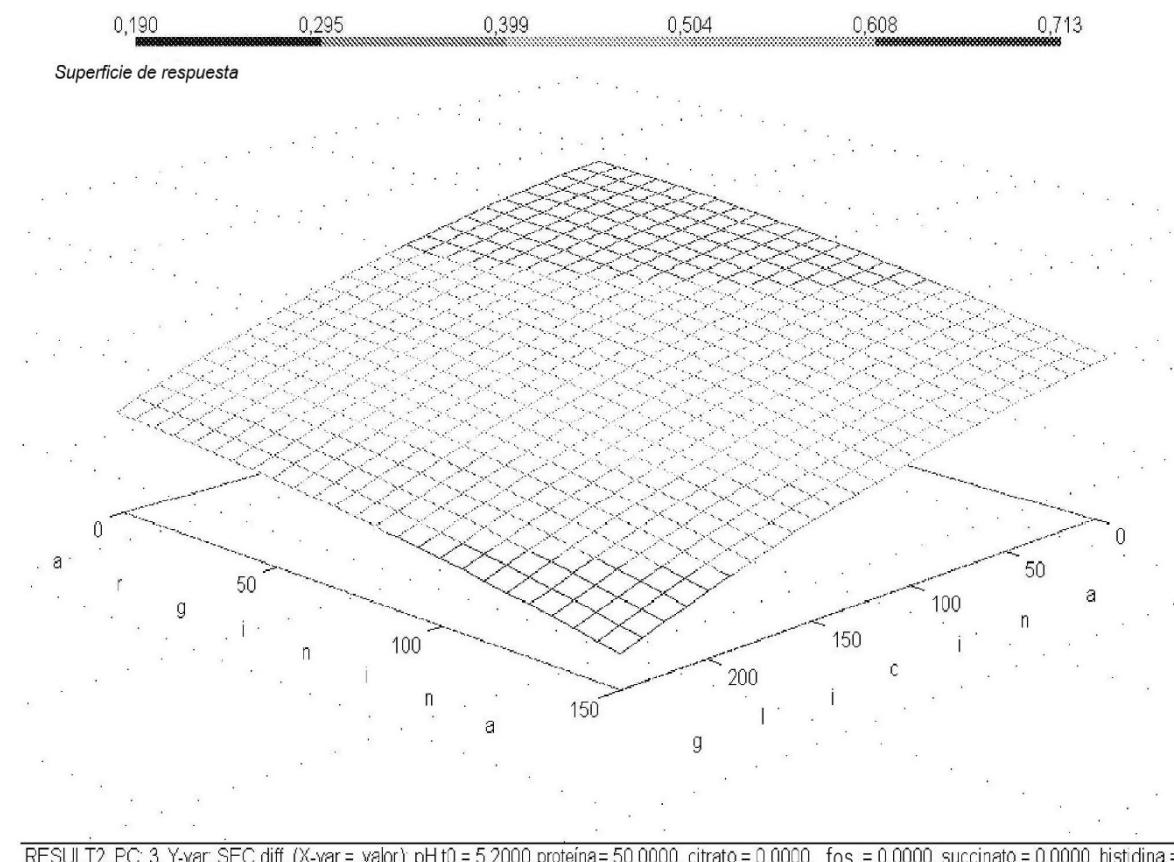
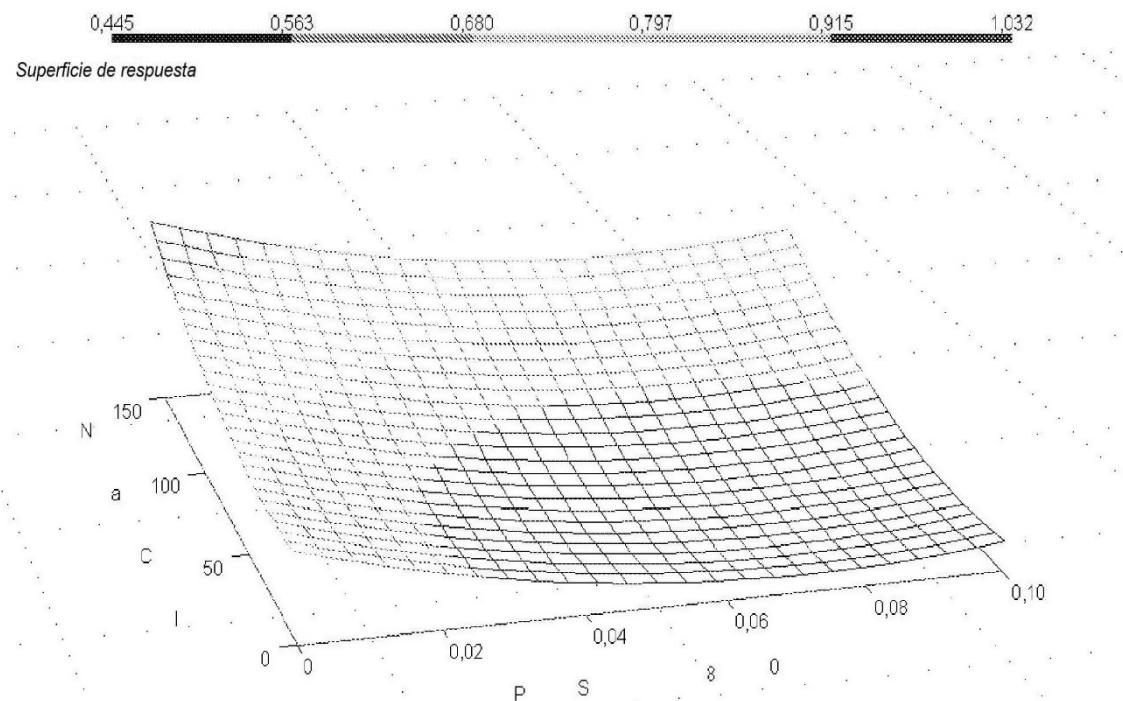


FIGURA 16

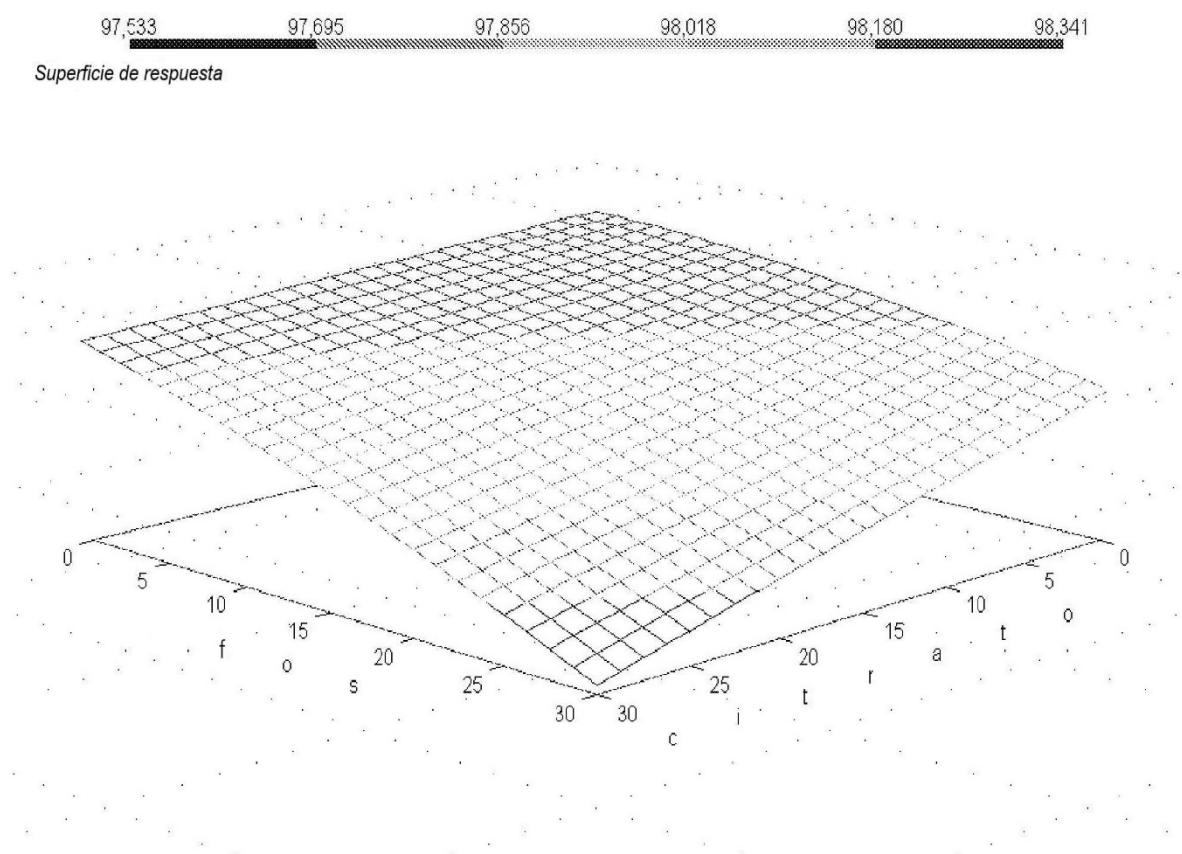
Efecto del NaCl y polisorbato 80 (PS 80) según el modelo A de PLS usando la diferencia en el contenido de monómero en t1 como criterio de valoración. El pH se fija en 5,2 y la concentración de proteína se fija en 50 mg/ml.



RESULT2, PC: 3, Y-var: SEC diff, (X-var = valor): pH t0 = 5,2000, proteína= 50,0000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, histidina =

FIGURA 17

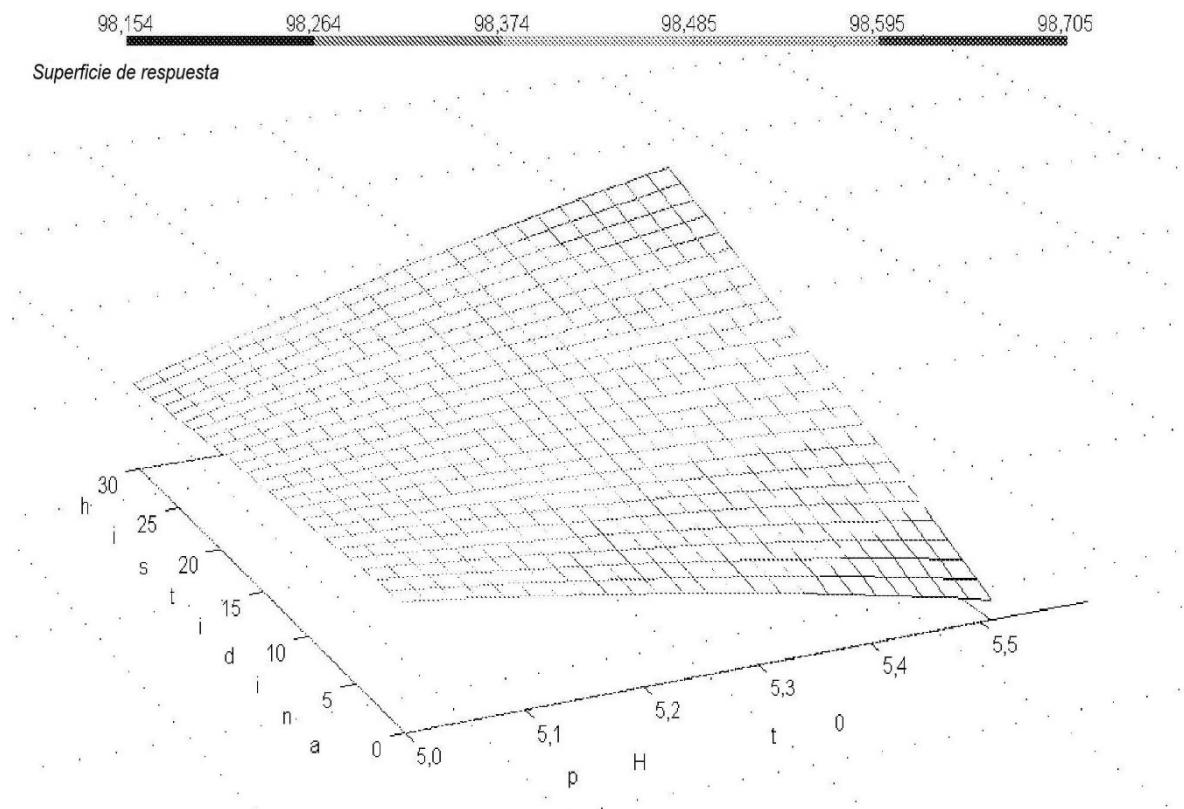
Efecto del citrato y fosfato según el modelo B de PLS usando los contenidos de monómero en t1 y t2 como criterios de valoración. El pH se fija en 5,2 y la concentración de proteína se fija en 50 mg/ml.



LB-140 PLS2 SEC..., PC: 4, Y-var: t1 SEC, (X-var = valor); pH t0 = 5,2000, proteína = 50,0000, succinato = 0,0000, histidina = 0,0000, acetato = 0,0000

FIGURA 18

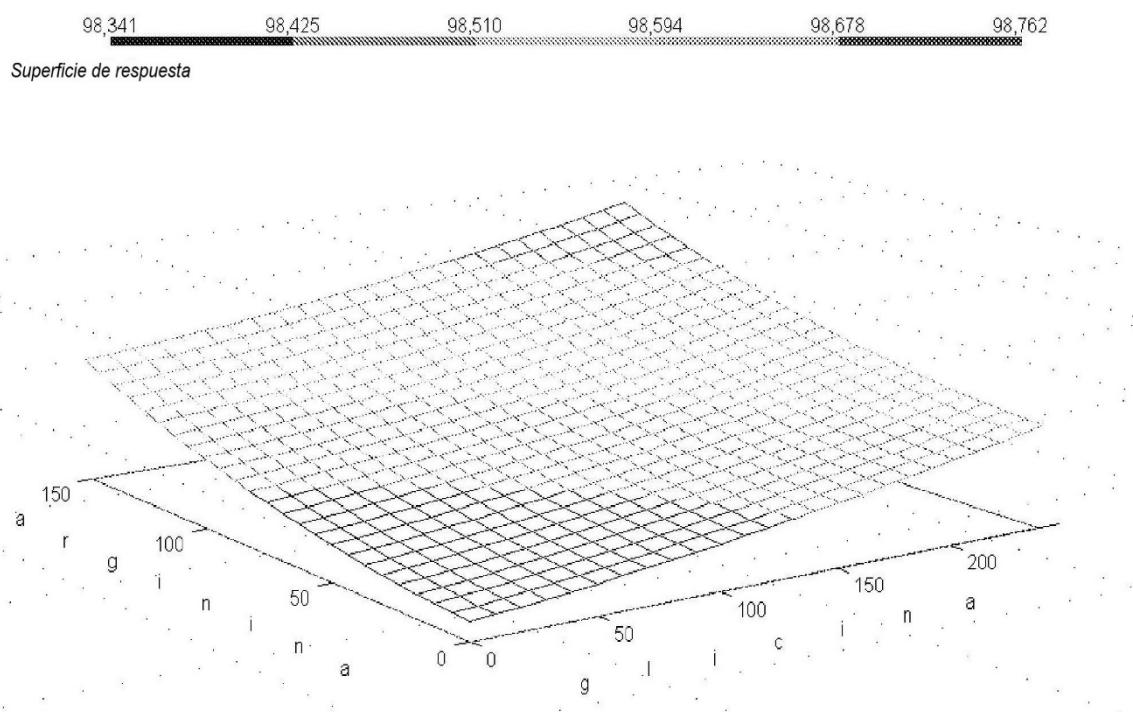
Efecto del pH y la His según el modelo B de PLS usando los contenidos de monómero en t1 y t2 como criterios de valoración. La concentración de proteína se establece en 50 mg.ml



LB-140 PLS2 SEC..., PC: 4, Y-var: t1 SEC, (X-var = valor); proteína = 50,0000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, acetato = 0,000

FIGURA 19

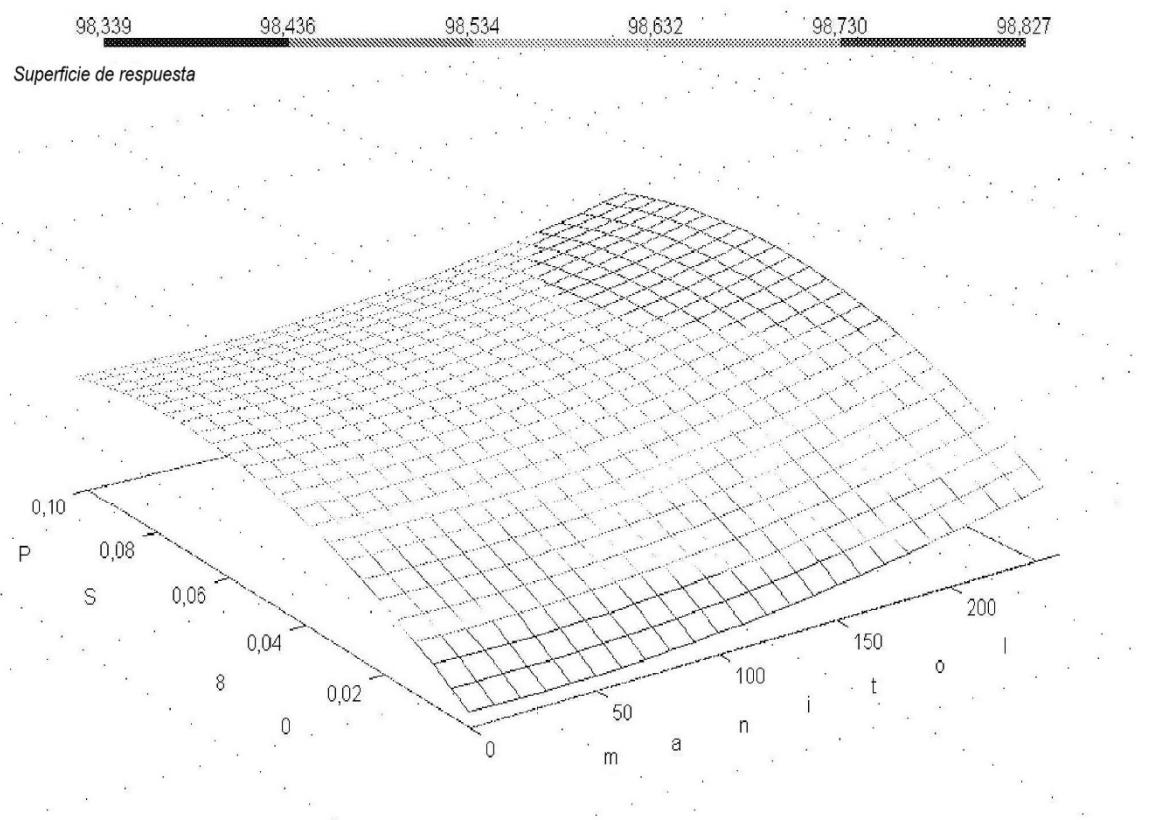
Efecto de la Arg y Gly según el modelo B de PLS usando los contenidos de monómero en t1 y t2 como criterios de valoración. El pH se fija en 5,2 y la concentración de proteína se establece en 50 mg/ml



LB-140 PLS2 SEC..., PC: 4, Y-var: t1 SEC, (X-var = valor); pH t0 = 5,2000, proteína= 50,0000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000,

FIGURA 20

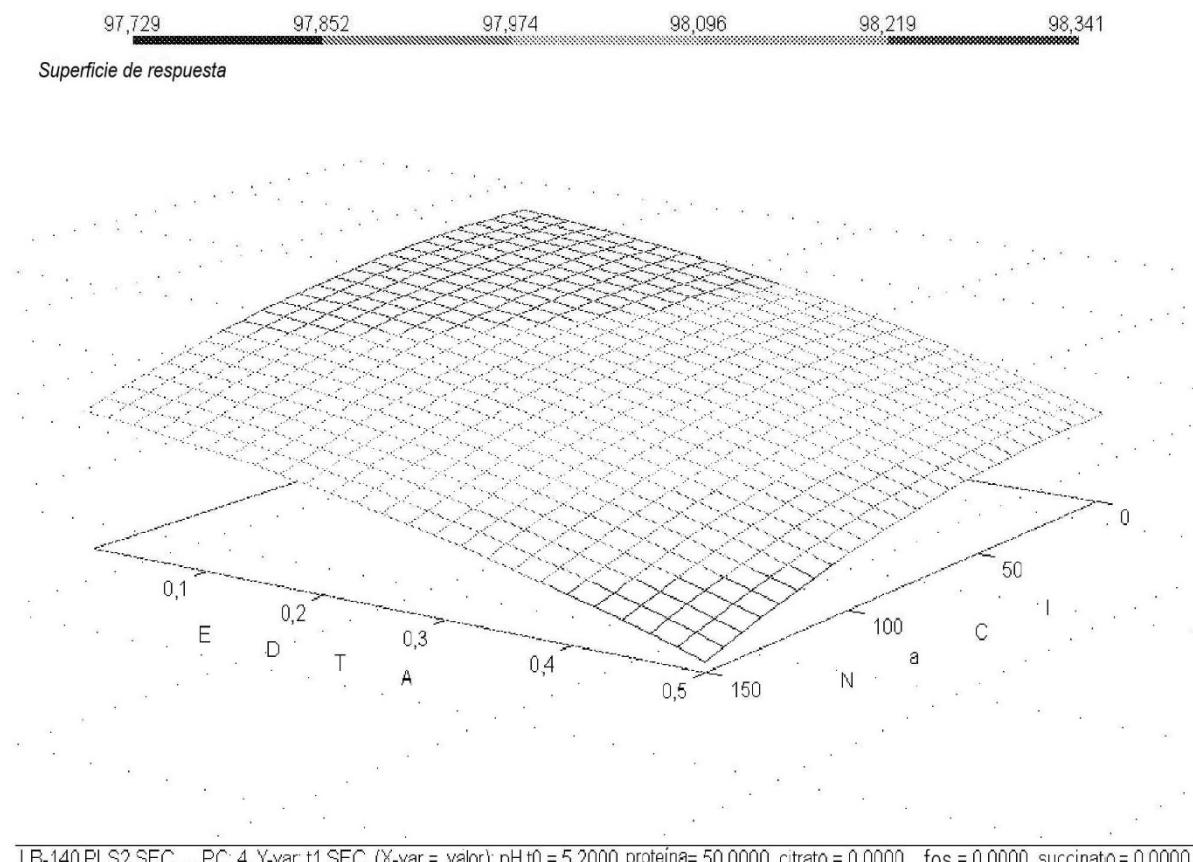
Efecto del PS 80 y manitol según el modelo B de PLS usando los contenidos de monómero en t1 y t2 como criterios de valoración. El pH se fija en 5,2 y la concentración de proteína en 50 mg/ml.



LB-140 PLS2 SEC..., PC: 4, Y-var: t1 SEC, (X-var = valor): pH t0 = 5,2000, proteína= 50,0000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000,

FIGURA 21

Efecto del EDTA y NaCl según el modelo B de PLS usando los contenidos de monómero en t1 y t2 como criterios de valoración. El pH se fija en 5,2 y la concentración de proteína se establece en 50 mg/ml.



LB-140 PLS2 SEC..., PC: 4, Y-var: t1 SEC, (X-var = valor); pH t0 = 5,2000, proteína= 50,0000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000,

FIGURA 22

Efecto del succinato e His según el modelo B de PLS usando los contenidos de monómero en t1 y t2 como criterios de valoración. El pH se fija en 5,2 y la concentración de proteína se establece en 50 mg/ml.

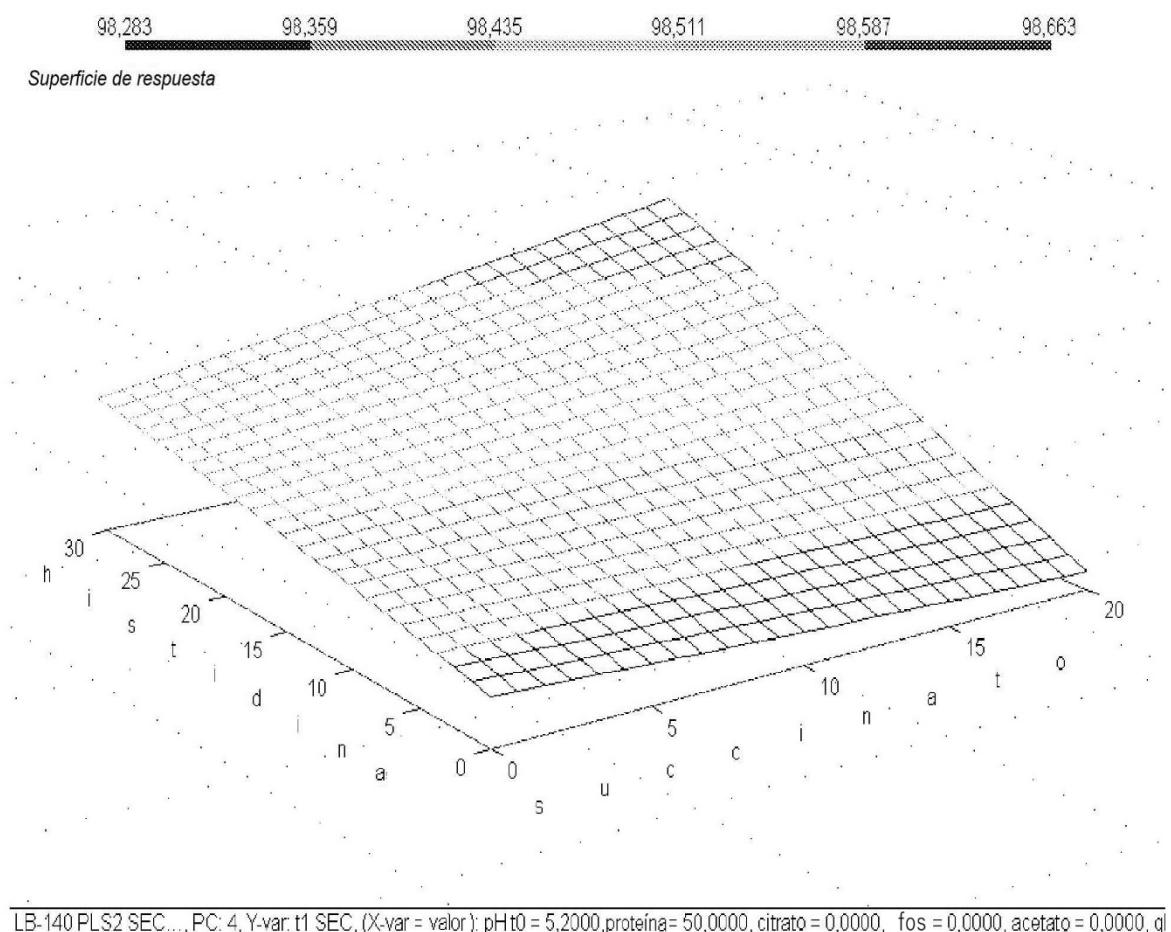
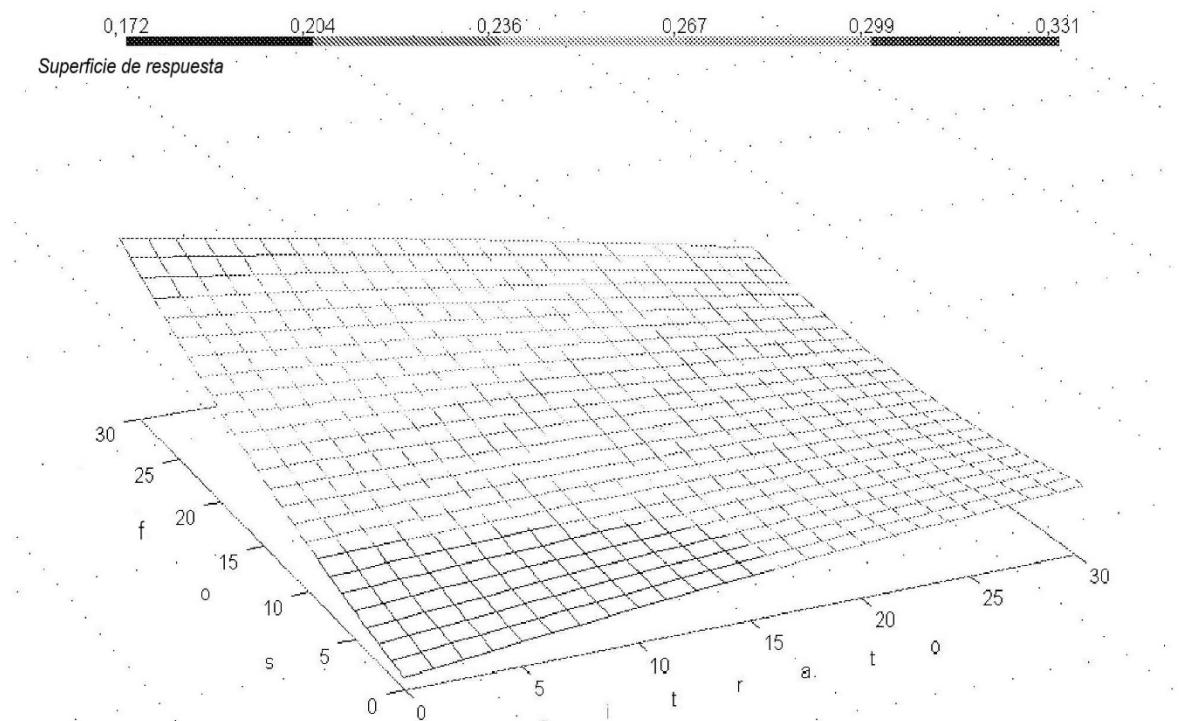


Figura 23

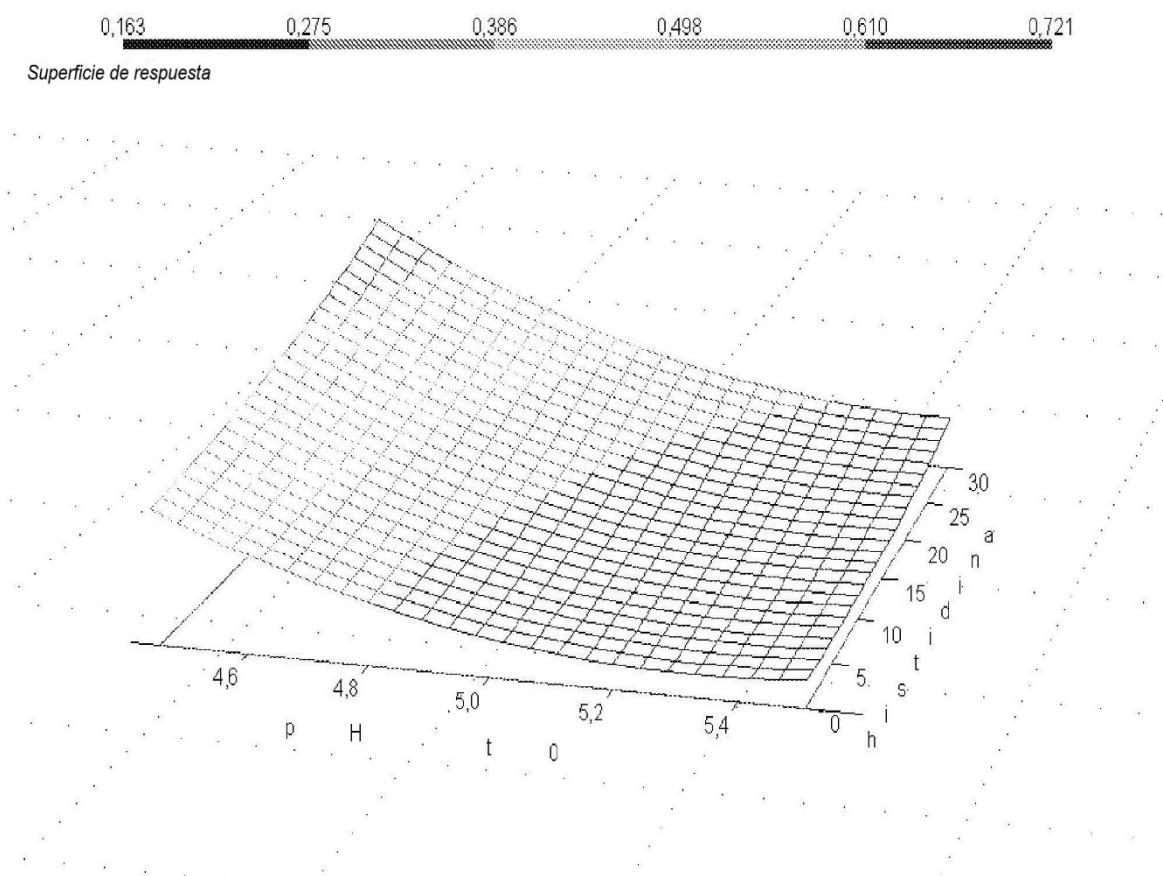
Efecto del fosfato y citrato según el modelo C de PLS usando la diferencia de pureza en t1 por RP HPLC como criterio de valoración. El pH se fija en 5,2 y la concentración de proteína se establece en 50 mg/ml.



RESULT14, PC: 2, Y-var: t1 RP diff, (X-var = valor); pH t0 = 5,2000,proteína= 50,0000, succinato = 0,0000, histidina = 0,0000, acetato = 0,0000, gll

Figura 24

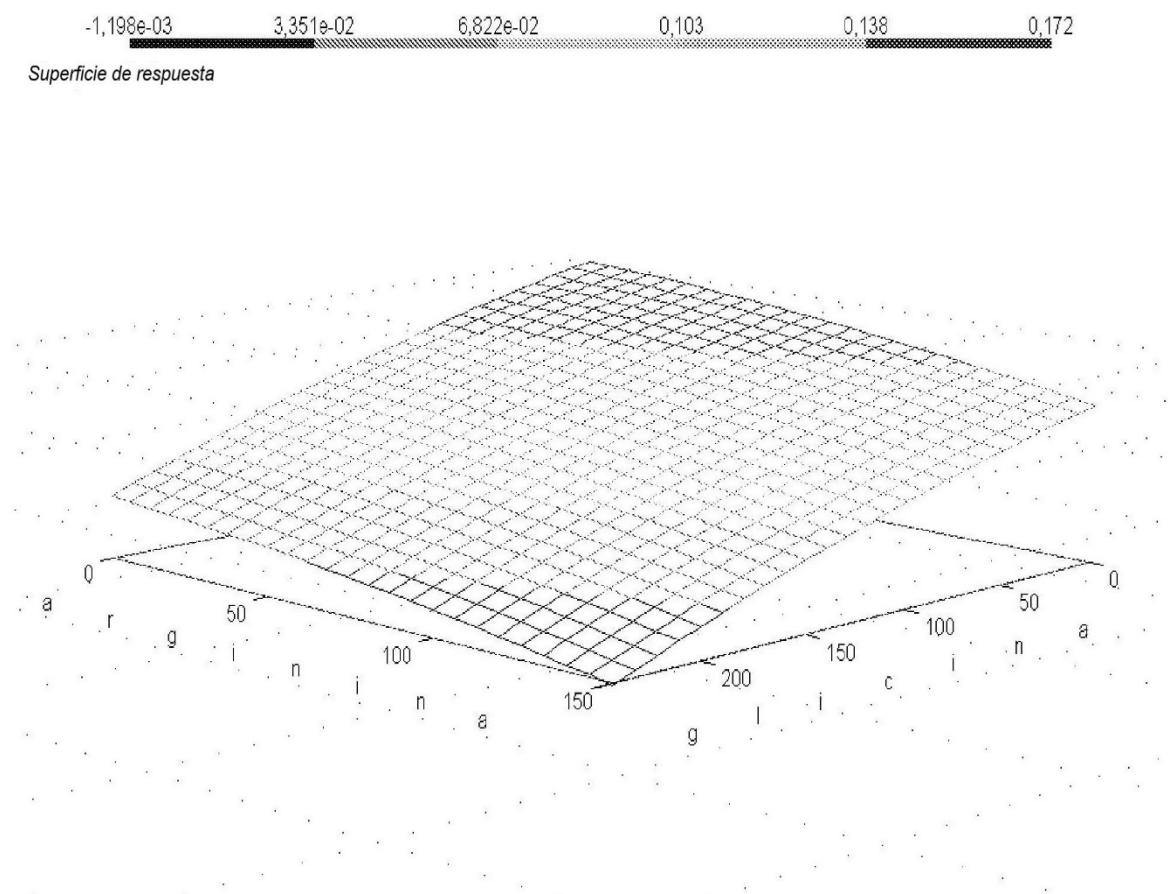
Efecto del pH y la His según el modelo C de PLS usando la diferencia de pureza en t1 por RP HPLC como criterio de valoración. La concentración de proteína se fija en 50 mg/ml.



RESULT14, PC: 2, Y-var: t1 RP diff, (X-var = valor); proteína = 50,0000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, acetato = 0,0000, glicina

Figura 25

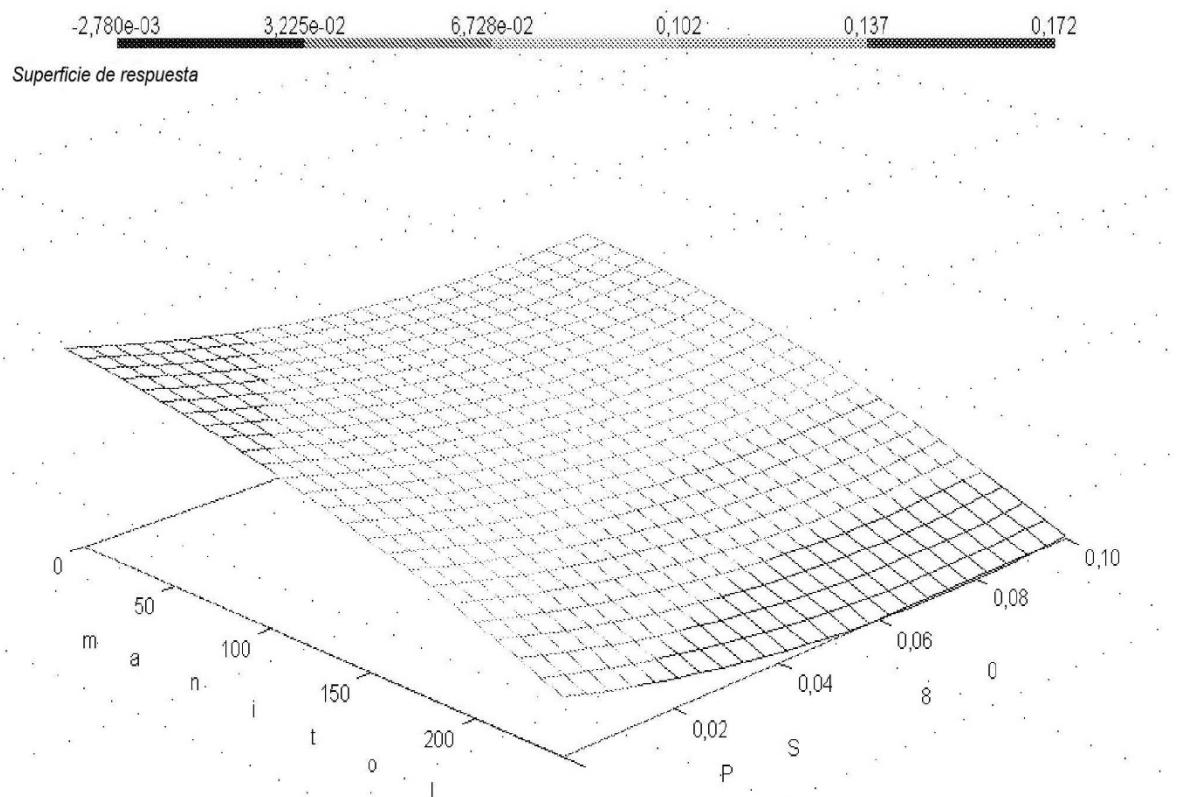
Efecto de la Arg y Gly según el modelo de C PLS usando la diferencia de pureza en t1 por RP HPLC como criterio de valoración. El pH se fija en 5,2 y la concentración de proteína se establece en 50 mg/ml.



RESULT14, PC: 2, Y-var: t1 RP diff, (X-var = valor); pH t0 = 5,2000, proteína= 50,0000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, histidina

FIGURA 26

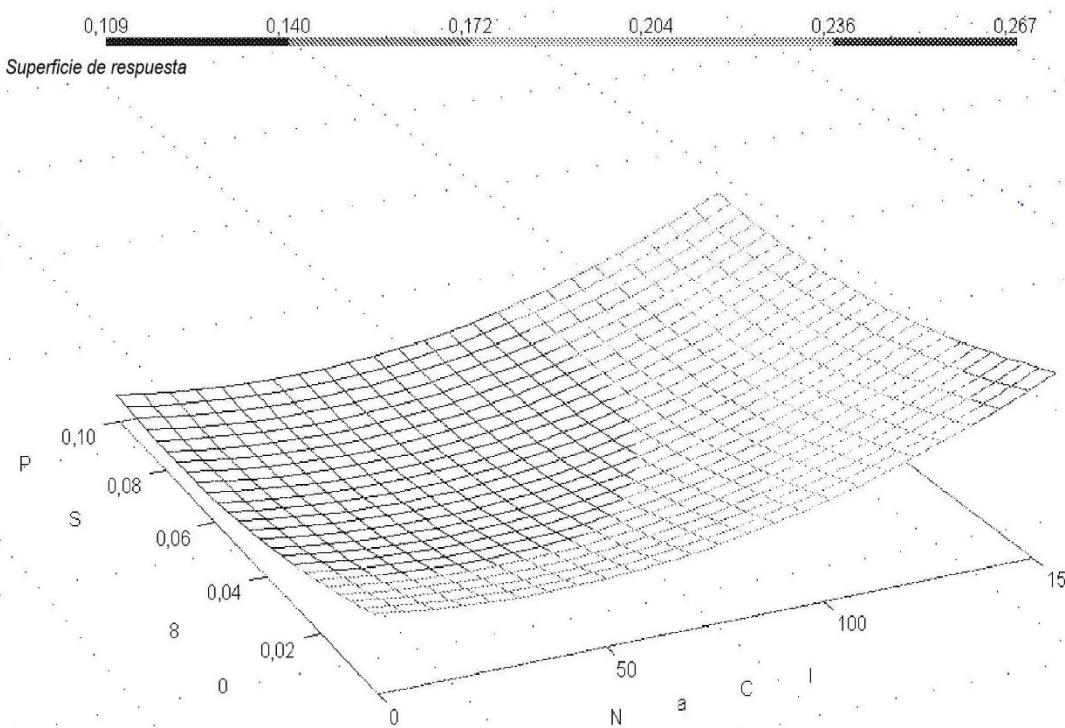
Efecto del manitol y PS 80 según el modelo C de PLS usando la diferencia de pureza en t1 por RP HPLC como criterio de valoración. El pH se fija en 5,2 y la concentración de proteína se establece en 50 mg/ml.



RESULT14, PC: 2, Y-var: t1 RP diff, (X-var = valor); pH t0 = 5,2000,proteína= 50,0000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, histidina

FIGURA 27

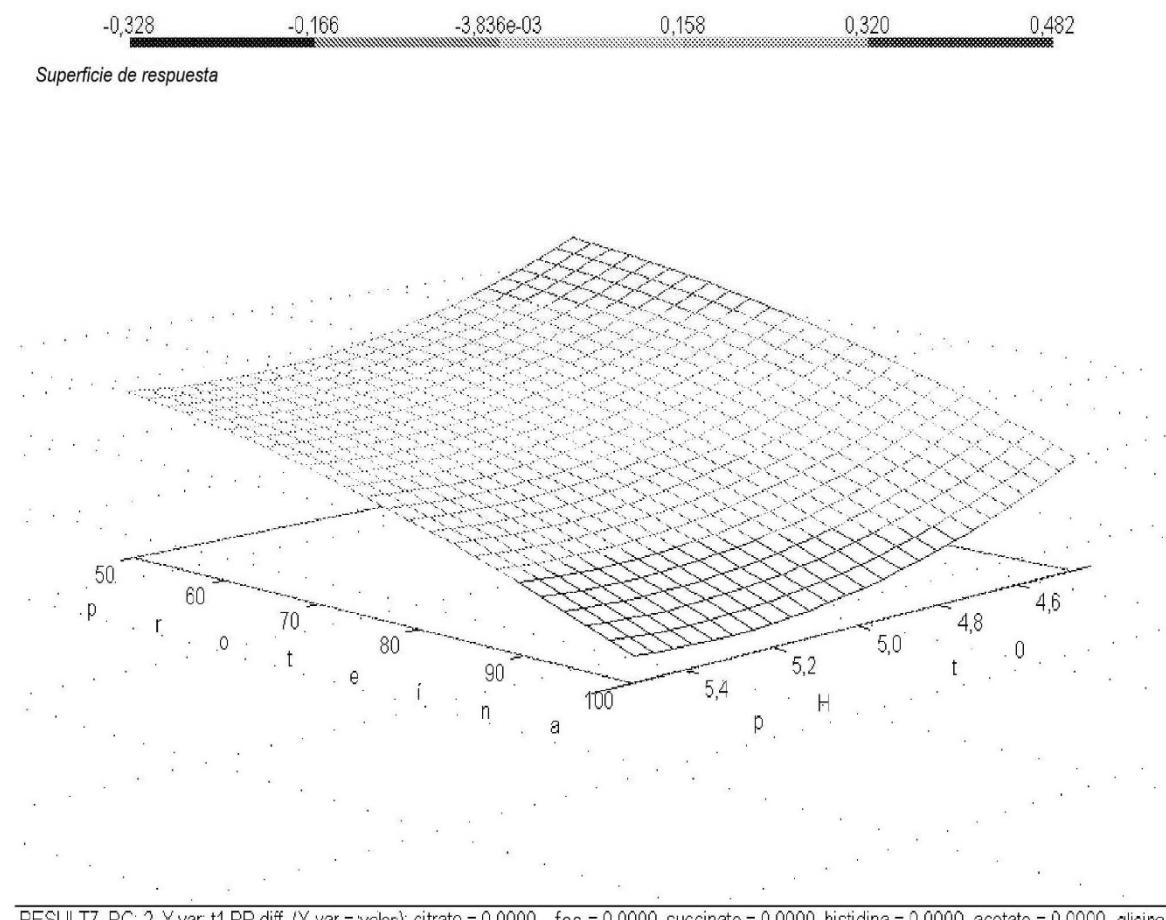
Efecto del PS 80 y NaCl según el modelo C de PLS usando la diferencia de pureza en t1 por RP HPLC como criterio de valoración. El pH se fija en 5,2 y la concentración de proteína se establece en 50 mg/ml.



RESULT14, PC: 2, Y-var: t1 RP diff, (X-var = valor): pH t0 = 5,2000, proteína= 50,0000, citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, histidina

FIGURA 28

Efecto del pH y la concentración de proteína según el modelo C de PLS usando la diferencia de pureza en t1 por RP HPLC como criterio de valoración.



RESULT7, PC: 2, Y-var: t1 RP diff, (X-var = valor): citrato = 0,0000, fos = 0,0000, succinato = 0,0000, histidina = 0,0000, acetato = 0,0000, glicina