

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 986 389**

(51) Int. Cl.:

A61J 1/05 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/10 (2007.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61P 43/00 (2006.01)
A61J 1/06 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.05.2019 PCT/JP2019/020014**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **28.11.2019 WO19225568**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.05.2019 E 19806791 (0)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2024 EP 3797752**

(54) Título: **Formulación liofilizada sellada en un vial de vidrio**

(30) Prioridad:

21.05.2018 JP 2018096902

(73) Titular/es:

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

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

11.11.2024

(72) Inventor/es:

YAMASHITA, SHOGO y
YOSHIZAWA, YUTA

(74) Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 986 389 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulación liofilizada sellada en un vial de vidrio

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una técnica para eliminar el empañamiento de recipientes de vidrio para formulaciones liofilizadas.

10 **Técnica anterior**

Muchas formulaciones farmacéuticas emplean composiciones farmacéuticas en forma líquida. Normalmente, las formulaciones líquidas deben conservarse a temperaturas bajas, y algunos productos farmacéuticos en forma líquida se degradan durante el almacenamiento. Una posibilidad para solucionar estos problemas consiste en liofilar dicha composición farmacéutica. La composición farmacéutica se transporta y se conserva en forma seca, que después se reconstituye antes del uso.

En especial, cuando el principio activo es una proteína, la propia etapa de liofilización puede deteriorar las propiedades de la composición farmacéutica. Para evitar disminuir la actividad de la composición farmacéutica, se suele añadir un tensioactivo a la composición farmacéutica, además de un crioprotector, tal como determinados azúcares.

Una composición líquida que contiene un tensioactivo puede adherirse a una parte de la pared interior del vial que está por encima del nivel del líquido, una vez se ha llenado el vial. Se sabe que si la composición líquida se liofiliza en este estado, los ingredientes de la composición líquida se adhieren a gran parte de la pared interior del vial y se mantienen allí adheridos, lo que le da al vial un aspecto "empañado" (bibliografía de patentes 1). Específicamente, dicha región "empañada" en la superficie interior de un vial de vidrio sugiere que una disolución de fármaco previa a la liofilización ha experimentado fluencia hacia arriba por encima del nivel de llenado, tras lo cual la composición farmacéutica se ha secado tras someter el vial a una etapa de liofilización y, después de esto, ha quedado un residuo blanco sobre la superficie interior del vial. Dicho residuo no solo se considera un defecto evidente, sino que también puede afectar a la inspección visual del vial o a la inspección de la calidad con un instrumento automático. Además, un paciente o un médico puede considerar que el mal aspecto del vial es un problema.

35 ABDUL-FATTAH *et al.* ["Investigating factors leading to fogging of glass vials in lyophilized drug product", EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL AND BIOPHARMACEUTICS, vol. 85, 1 de enero de 2013 (01-01-2013), págs. 314-326] divulgan un estudio que explica que el posible mecanismo de la transferencia de películas a una superficie sólida de vidrio podría ser que, en las formulaciones acuosas, en especial cuando contienen un tensioactivo, una diferencia en la tensión superficial entre dos puntos sobre la superficie de la disolución (es decir, un gradiente de tensión superficial) activa una fuerza impulsora y, como resultado, se observa una comportamiento de fluencia. D1 divulga que no existe una correlación sistemática entre el empañamiento y las propiedades de la formulación. Las superficies hidrófilas, con un ángulo de contacto menor, empeoran el fenómeno del empañamiento. El estudio divulga que los viales de vidrio siliconado no producen empañamiento debido a la hidrofobia de la superficie de vidrio.

45 **Lista de citas**

Bibliografía de patentes

50 Bibliografía de patentes 1: Publicación nacional de la solicitud de patente internacional n.º 2012-520098
Sumario de la invención

Problema técnico

55 Los inventores han estudiado un procedimiento para suprimir el "empañamiento" sobre la superficie interior de un recipiente de vidrio, tal como un vial, causado por la liofilización, después de llenar el recipiente con una disolución de fármaco previa a la liofilización, tras la producción de una formulación liofilizada de una composición farmacéutica que contiene un tensioactivo. En el proceso, los inventores han descubierto que un procedimiento para aplicar silicona a la superficie interior de un recipiente de vidrio descrito en la publicación nacional de la solicitud de patente n.º 2012-520098 es problemático, porque el grado de encogimiento aumenta en la formación de la torta durante la liofilización, se forma un hueco entre la superficie de la pared del recipiente y la torta, y es fácil que la torta se mueva. Si es fácil que la torta se mueva, puede colapsar debido al estrés físico durante el transporte o similares, lo que puede conducir al deterioro de la calidad. Por ejemplo, si el polvo se adhiere a la pared interior del vial debido al colapso de la torta y se deteriora la visibilidad, la inspección de la calidad puede verse afectada. Además, aunque dicho colapso de la torta se considere solo un defecto aparente, un paciente o un médico puede considerar que el mal aspecto del vial es un problema y, por tanto, no es deseable.

Por tanto, la presente invención proporciona una formulación liofilizada en la que se evita el empañamiento de la superficie interior de un recipiente de vidrio y, además, se logra la formación satisfactoria de la torta, un procedimiento de producción de la misma y similares.

- 5 Solución al problema
- Como resultado de estudios exhaustivos, los inventores han descubierto que un tratamiento con azufre o un tratamiento con VIST de la superficie de la pared (superficie interior) de un recipiente de vidrio para una formulación liofilizada suprime la fluencia hacia arriba de una disolución de fármaco sobre la superficie de la pared de un recipiente de vidrio tras la liofilización, evita el "empañamiento" de la superficie de la pared del recipiente de vidrio tras la liofilización, y permite la formación satisfactoria de la torta tras la liofilización. Los inventores han ampliado el estudio y, así, han completado la presente invención.
- 10 Específicamente, la presente invención proporciona los siguientes puntos [1] a [11]:
- [1] Una formulación liofilizada que comprende un agente terapéutico y un tensioactivo sellada en un recipiente de vidrio, en donde una superficie interior del recipiente de vidrio está tratada con azufre o está tratada con VIST, y en donde el agente terapéutico es uno cualquiera de un anticuerpo humanizado contra el receptor de interleucina 6 (IL-6), un anticuerpo humanizado biespecífico contra el factor IX y el factor X, y un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor A de IL-31.
- 15 [2] La formulación de acuerdo con el punto [1], destinada a reconstituirse en un disolvente, de modo que la concentración del agente terapéutico en la disolución reconstituida oscila entre 0,01 y 300 mg/ml.
- [3] La formulación de acuerdo con el punto [1] o [2], en donde el tensioactivo es un tensioactivo no iónico.
- 20 [4] La formulación de acuerdo con el punto [3], en donde el tensioactivo no iónico es un éster de ácido graso de sorbitán polioxietileno o un copolímero de polioxietileno y poloxipropileno.
- [5] La formulación de acuerdo con el punto [3] o [4], que se reconstituye en un disolvente, de modo que la concentración del tensioactivo no iónico en la disolución reconstituida varía del 0,001 % al 1 % (p/v).
- 25 [6] La formulación de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [5], destinada a reconstituirse, de modo que la disolución reconstituida comprende: un agente terapéutico de 0,01 a 300 mg/ml; un agente tamponante de 0 a 100 mM; un tensioactivo del 0,001 % al 1 % (p/v); y un agente estabilizante de 1 a 500 mM y/o un regulador de la tonicidad de 5 a 500 mM.
- [7] La formulación de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [5], en donde una disolución previa a la liofilización comprende: un agente terapéutico de 0,01 a 300 mg/ml; un agente tamponante de 0 a 100 mM; un tensioactivo del 0,001 % al 1 % (p/v); y un agente estabilizante de 1 a 500 mM y/o un regulador de la tonicidad de 5 a 500 mM.
- 30 [8] La formulación de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [7], en donde el recipiente de vidrio es un vial o una jeringuilla precargada.
- [9] Un kit que comprende la formulación de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [8], en donde el kit comprende además un disolvente para la redisolución; o en donde el kit comprende además instrucciones y/o un prospecto para indicar la redisolución en un disolvente.
- 35 [10] Un procedimiento para producir una formulación liofilizada o un procedimiento para evitar o reducir el empañamiento de un recipiente de vidrio para una formulación liofilizada, comprendiendo dicho procedimiento: (a) proporcionar un recipiente de vidrio con una superficie interior tratada con azufre o tratada con VIST; (b) introducir una disolución previa a la liofilización que comprende un agente terapéutico y un tensioactivo en el recipiente de vidrio; en donde el agente terapéutico es uno cualquiera de un anticuerpo humanizado contra el receptor de interleucina 6 (IL-6), un anticuerpo humanizado biespecífico contra el factor IX y el factor X, y un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor A de IL-31; y (c) llevar a cabo la liofilización.
- 40 [11] El uso de un recipiente de vidrio con una superficie interior tratada con azufre o tratada con VIST con el fin de evitar o reducir el empañamiento del vidrio tras la liofilización cuando se produce la formulación liofilizada de acuerdo con uno cualquiera de los puntos [1] a [8].
- Efectos ventajosos de la invención
- 45 De acuerdo con la presente invención, se suprime la fluencia hacia arriba de una disolución de fármaco sobre la superficie de la pared de un recipiente de vidrio tras la liofilización, para evitar el empañamiento de la superficie

interior del recipiente de vidrio tras la liofilización y el colapso de la torta, por lo que se puede proporcionar una formulación liofilizada de alta calidad y con un aspecto excelente.

Breve descripción de los dibujos

- 5 La figura 1 demuestra que no se produce empañamiento tras la liofilización en viales con superficies tratadas con azufre o con VIST.
- 10 La figura 2 demuestra que se suprime el encogimiento de la torta en viales con superficies tratadas con azufre o con VIST.
- 15 La figura 3 muestra las puntuaciones de empañamiento de productos liofilizados que contienen diferentes disoluciones de fármaco sellados en viales no tratados y viales tratados con azufre. Cada nombre de la muestra indica [ID del principio activo farmacéutico (API)]-[concentración]-[tamaño del vial].
- 20 La figura 4 muestra las puntuaciones de empañamiento de productos liofilizados que contienen disoluciones de fármaco de anticuerpo sellados en viales de 10 ml no tratados y diferentes viales de 10 ml con la superficie tratada. Cada nombre de la muestra indica [ID del principio activo farmacéutico (API)]-[concentración]-[tamaño del vial].

20 Descripción de realizaciones

La presente invención proporciona una formulación liofilizada que comprende un agente terapéutico y un tensioactivo sellada en un recipiente de vidrio, en donde una superficie interior del recipiente de vidrio está tratada con azufre o está tratada con VIST, y en donde el agente terapéutico es uno cualquiera de un anticuerpo humanizado contra el receptor de interleucina 6 (IL-6), un anticuerpo humanizado biespecífico contra el factor IX y el factor X, y un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor A de IL-31.

En la formulación liofilizada de la presente invención, se suprime el empañamiento de la superficie interior de un recipiente de vidrio al suprimir la fluencia hacia arriba de una disolución de fármaco sobre la superficie de la pared de un recipiente de vidrio tras la liofilización, y se logra la formación satisfactoria de la torta.

En la presente invención, el término "empañamiento" de la superficie interior de un recipiente de vidrio se refiere a un estado en el que un residuo de una composición farmacéutica en una disolución de fármaco se adhiere a un nivel por encima de la parte superior del punto de contacto de la torta de la formulación liofilizada sobre la pared interior del recipiente de vidrio. La adhesión de un residuo se suele confirmar de modo visual. Se considera que el empañamiento de la superficie interior de un recipiente de vidrio se produce debido a que la composición farmacéutica en forma líquida introducida en el recipiente de vidrio experimenta fluencia hacia arriba por la pared interior y, a continuación, se somete a liofilización en ese estado. La expresión "se suprime el empañamiento" significa que la puntuación de empañamiento disminuye, en comparación con un caso en el que se emplea un recipiente de vidrio antes de ser sometido a un tratamiento con azufre o a un tratamiento con VIST. La puntuación de empañamiento se calcula multiplicando las puntuaciones de evaluación de dos parámetros (elementos de evaluación), a saber, la superficie de empañamiento (Superficie) por la altura de empañamiento (Altura).

45 Puntuación de empañamiento = Puntuación de la superficie de empañamiento (1) × Puntuación de la altura de empañamiento (2)

(1) La superficie de empañamiento (Superficie) se refiere a la superficie de una parte a la que se adhiere un residuo de una composición farmacéutica en una disolución de fármaco, sobre la superficie de la pared, desde la parte superior del punto de contacto de una torta liofilizada en un recipiente de vidrio hasta un extremo superior (normalmente un tapón de goma para un vial), donde el residuo de la composición farmacéutica en la disolución de fármaco puede adherirse. La superficie de empañamiento (%) se calcula empleando la superficie de la zona de pared desde la parte superior del punto de contacto de una torta liofilizada hasta un extremo superior, donde el residuo de la composición farmacéutica en la disolución de fármaco puede adherirse, siendo aquella del 100 %. A continuación, se registra la puntuación de evaluación de acuerdo con los siguientes criterios:

- 55 (a) La puntuación de evaluación de una superficie de empañamiento es "0" cuando la superficie de empañamiento (%) es del 0 %.
- 60 (b) La puntuación de evaluación de una superficie de empañamiento es "1" cuando la superficie de empañamiento (%) es superior al 0 % y 5 % o inferior.
- (c) La puntuación de evaluación de una superficie de empañamiento es "2" cuando la superficie de empañamiento (%) es superior al 5 % y 25 % o inferior.
- 65 (d) La puntuación de evaluación de una superficie de empañamiento es "3" cuando la superficie de empañamiento (%) es superior al 25 % y 50 % o inferior.

- (e) La puntuación de evaluación de una superficie de empañamiento es "4" cuando la superficie de empañamiento (%) es superior al 50 % y 75 % o inferior.
- 5 5 (f) La puntuación de evaluación de una superficie de empañamiento es "5" cuando la superficie de empañamiento (%) es superior al 75 % y 100 % o inferior.
- (2) La altura de empañamiento (Altura) se refiere a la altura (distancia) desde la parte superior del punto de contacto de una torta liofilizada en la superficie interior del recipiente de vidrio hasta el punto más elevado (longitud mayor) al que se ha adherido un residuo de la composición farmacéutica en la disolución de fármaco. La altura de empañamiento (%) se calcula empleando la altura, desde la parte superior del punto de contacto de una torta liofilizada hasta un extremo superior (normalmente un tapón de goma para un vial), donde el residuo de la composición farmacéutica en la disolución de fármaco puede adherirse, siendo aquella del 100 %. A continuación, se registra la puntuación de evaluación de acuerdo con los siguientes criterios:
- 10 15 (a) La puntuación de evaluación de una altura de empañamiento es "0" cuando no se observa empañamiento.
- (b) La puntuación de evaluación de una altura de empañamiento es "1" cuando la altura de empañamiento (%) es superior al 0 % y 5 % o inferior.
- 20 25 (c) La puntuación de evaluación de una altura de empañamiento es "2" cuando la altura de empañamiento (%) es superior al 5 % y 25 % o inferior.
- (d) La puntuación de evaluación de una altura de empañamiento es "3" cuando la altura de empañamiento (%) es superior al 25 % y 50 % o inferior.
- (e) La puntuación de evaluación de una altura de empañamiento es "4" cuando la altura de empañamiento (%) es superior al 50 % y 75 % o inferior.
- 30 35 (f) La puntuación de evaluación de una altura de empañamiento es "5" cuando la altura de empañamiento (%) es superior al 75 % y 100 % o inferior.
- Además, cuando la puntuación de empañamiento es "inferior a 2", puede determinarse que no se observa empañamiento. En una realización, la formulación liofilizada de la presente invención puede tener una puntuación de empañamiento inferior a 2, inferior a 1,5, inferior a 1, inferior a 0,5, o 0.
- 40 En la presente invención, el recipiente de vidrio no presenta limitaciones concretas, siempre que esté fabricado con un material y tenga una forma adecuada para introducir una composición farmacéutica en forma líquida y poder ser sometido a liofilización. Algunos ejemplos del material del recipiente de vidrio incluyen vidrio de borosilicato o vidrio sódico-cálcico y se prefiere el vidrio de borosilicato. Más en concreto, algunos ejemplos del mismo incluyen, entre otros, los materiales en conformidad con la Farmacopea Japonesa (Ensayos de la farmacopea, Ensayos para recipientes y materiales para envases, Ensayo para recipientes de vidrio para inyecciones (3) Ensayo de álcalis solubles (i) procedimiento 1), la Farmacopea Europea (3.2.1 RECIPIENTES DE VIDRIO DE USO FARMACÉUTICO) y la Farmacopea de EE. UU. (660. RECIPIENTES). Además, algunos ejemplos de la forma del recipiente de vidrio incluyen vials, jeringuillas precargadas y cartuchos. La jeringuilla precargada puede ser una jeringuilla precargada de doble cámara para facilitar la disolución de la formulación liofilizada. La forma del cartucho no presenta limitaciones concretas. Algunos ejemplos del mismo incluyen una única cámara y una cámara doble. Resulta más deseable si tiene una forma adecuada para la autoinyección.
- 45 50 55 En la presente invención, la expresión "tratamiento con azufre" suele referirse a un tratamiento químico con el fin de suprimir la elución de los componentes alcalinos desde el vidrio, por el cual un ingrediente eluible sobre la superficie del vidrio se hace reaccionar con un compuesto de azufre, tal como una disolución acuosa de sulfato de amonio, a alta temperatura, para eliminar el ingrediente en forma de ingrediente hidrosoluble. Por ejemplo, se añade una disolución acuosa de sulfato de amonio a un recipiente y, a continuación, se calienta de 550 °C a 650 °C para que la superficie interior del recipiente de vidrio pueda someterse a un tratamiento con azufre.
- El recipiente de vidrio tratado con azufre en la presente invención puede adquirirse en el mercado, y algunos ejemplos del mismo incluyen los suministrados por Murase Glass Co., Ltd., Shiotani Glass Co., Ltd. y similares.
- 60 65 En la presente invención, la expresión "tratamiento con VIST" se refiere a un tratamiento de reducción de la elución de álcalis de un recipiente de vidrio desarrollado por Daiwa Special Glass Co., Ltd., que se lleva a cabo lavando la superficie interior de un recipiente de vidrio con agua, una disolución acuosa de un ácido, una disolución acuosa de un tensioactivo o una disolución acuosa de un ácido supplementado con un tensioactivo. Algunos ejemplos del ácido que pueden emplearse en este caso incluyen ácidos orgánicos, tales como ácido fórmico, ácido acético, ácido oxálico, ácido ftálico y ácido cítrico, y ácidos inorgánicos, tales como ácido clorhídrico, ácido sulfúrico y ácido nítrico, empleándose preferentemente el ácido cítrico. El tensioactivo no presenta limitaciones concretas y, por ejemplo,

puede utilizarse un tensioactivo no iónico. El tratamiento con VIST puede llevarse a cabo mediante un procedimiento conocido, en cuyo caso se puede consultar el documento WO2009/116300.

5 El recipiente de vidrio tratado con VIST en la presente invención puede ser un recipiente disponible en el mercado, por ejemplo, un recipiente de vidrio tratado con VIST suministrado por Daiwa Special Glass Co., Ltd.

Como tratamiento para modificar una superficie de vidrio, se conoce la siliconación, en la que se aplica dimetilsilicona a un recipiente de vidrio y este se cuece a alta temperatura. Sin embargo, en un recipiente de vidrio siliconado, tiende a producirse el encogimiento de la torta de la formulación liofilizada, la torta puede moverse dentro 10 del recipiente de vidrio y tiende a ser aplastada durante el transporte o similar. En cambio, en un recipiente de vidrio tratado con azufre o con VIST, este problema no sucede porque apenas hay encogimiento de la torta de la formulación liofilizada. En concreto, un recipiente de vidrio tratado con azufre tiene un gran efecto de supresión del encogimiento de la torta. Por tanto, en un aspecto preferido de la presente invención, puede emplearse un recipiente de vidrio con una superficie interior tratada con azufre. Además, el tratamiento con azufre de un recipiente de vidrio 15 tiene la ventaja de que puede llevarse a cabo a un coste menor que la siliconización.

En el presente documento, el término "torta" se refiere a una torta que se liofiliza después de llenar el recipiente de vidrio con una disolución previa a la liofilización.

20 En el presente documento, la expresión "se produce el encogimiento de la torta" significa que la torta está en un estado en que no está fijada a la superficie interior de un recipiente de vidrio. Este estado puede confirmarse con facilidad observando visualmente si la torta se ha movido o no en el recipiente de vidrio cuando éste se mueve (por ejemplo, el recipiente de vidrio se invierte).

25 En la presente invención, el tratamiento de la superficie de un recipiente de vidrio puede aplicarse a toda la superficie interior o a una parte de la misma. En un aspecto preferido, puede emplearse un recipiente de vidrio con toda la superficie interior tratada. En un aspecto de la presente invención, puede emplearse un recipiente de vidrio en el que el tratamiento de la superficie se aplica a una región de la superficie interior del recipiente por encima de la parte superior del punto de contacto de la torta después de la liofilización.

30 La formulación liofilizada de la presente invención se produce al liofilizar una composición farmacéutica en forma líquida (específicamente, una disolución previa a la liofilización que comprende un agente terapéutico y un tensioactivo) de acuerdo con un procedimiento que comprende:

35 (a) proporcionar un recipiente de vidrio con una superficie interior tratada con azufre o tratada con VIST;

(b) introducir una disolución previa a la liofilización que comprende un agente terapéutico y un tensioactivo en el recipiente de vidrio, en donde el agente terapéutico es uno cualquiera de un anticuerpo humanizado contra el receptor de interleucina 6 (IL-6), un anticuerpo humanizado biespecífico contra el factor IX y el factor X, y un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor A de IL-31; y

40 (c) llevar a cabo la liofilización.

45 Por consiguiente, un procedimiento para producir una formulación liofilizada, que comprende las anteriores etapas, y un procedimiento para evitar o reducir el empañamiento de un recipiente de vidrio para la formulación liofilizada, que comprende las anteriores etapas, también se incluyen en la presente invención. De acuerdo con dicho procedimiento de la presente invención, se suprime la fluencia hacia arriba de una disolución previa a la liofilización sobre la superficie de la pared de un recipiente de vidrio, evitando o reduciendo de este modo el empañamiento de la superficie interior del recipiente de vidrio tras la liofilización, y permitiendo la formación satisfactoria de la torta tras la 50 liofilización.

La liofilización puede llevarse a cabo en condiciones empleadas en general en el campo farmacéutico. La liofilización se suele llevar a cabo en tres etapas, a saber, congelación, secado primario y secado secundario.

55 En la etapa de congelación, una composición farmacéutica en forma líquida se suele enfriar hasta una temperatura inferior al punto eutéctico. Una disolución previa a la liofilización se suele enfriar y congelar de -10 °C a -80 °C (por ejemplo, de -20 °C a -60 °C) a presión atmosférica.

60 En la etapa de secado primario, la presión disminuye y la temperatura aumenta para sublimar el disolvente. La temperatura puede oscilar entre -40 °C y 50°C (por ejemplo, entre -30 °C y 40 °C). La presión puede oscilar entre 3 Pa y 80 Pa (por ejemplo, de 5 Pa a 60 Pa). La etapa de secado primario se suele llevar a cabo hasta que se elimina aproximadamente el 90 % del disolvente.

65 En la etapa de secado secundario, se elimina una mayor cantidad de disolvente al aumentar la temperatura. La temperatura puede oscilar entre 10 °C y 50 °C (por ejemplo, entre 20 °C y 40 °C). La presión puede oscilar entre 3 Pa y 40 Pa (por ejemplo, de 5 Pa a 30 Pa). Cuando finaliza la etapa de secado secundario, el contenido en

humedad del producto liofilizado suele ser de hasta aproximadamente un 5 %.

Antes de la etapa de congelación, puede incluirse una etapa de preenfriamiento, en la que la temperatura disminuye hasta de 2 °C a 10 °C, por ejemplo.

5 La formulación liofilizada de la presente invención contiene al menos un agente terapéutico. Cualquier agente terapéutico que pueda liofilizarse puede ser apto para la presente invención. Algunos ejemplos del agente terapéutico también incluyen una proteína, un péptido o un ácido nucleico.

10 La concentración del agente terapéutico en una disolución previa a la liofilización depende del tipo de agente terapéutico, su uso y similares. La concentración del agente terapéutico está en el intervalo, por ejemplo, de 0,01 a 300 mg/ml, en el intervalo de 0,01 a 250 mg/ml, y en el intervalo de 0,01 a 200 mg/ml.

15 El problema del empañamiento de un recipiente tras la liofilización tiende a producirse cuando la disolución previa a la liofilización es una disolución con una fuerte acción tensioactiva. Además, el problema del empañamiento de un recipiente tras la liofilización tiende a producirse cuando la disolución previa a la liofilización es una disolución con una alta concentración de una proteína, etc. Así, en un aspecto preferido, la presente invención se aplica a formulaciones de proteínas en disolución, en especial a formulaciones de proteínas en disolución en alta concentración para la inyección subcutánea, etc. Por ejemplo, la formulación liofilizada de la presente invención 20 puede obtenerse introduciendo una formulación de proteínas en disolución en un recipiente de vidrio tratado con azufre o tratado con VIST y, a continuación, llevando a cabo la liofilización.

25 En la presente invención, la formulación de proteínas en disolución es una formulación en disolución que contiene uno cualquiera de un anticuerpo humanizado contra el receptor de interleucina 6 (IL-6), un anticuerpo humanizado biespecífico contra el factor IX y el factor X, y un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor A de IL-31. La concentración de la proteína en la formulación de proteínas en disolución es, por ejemplo, de 0,01 mg/ml o superior, 1 mg/ml o superior, 10 mg/ml o superior, 50 mg/ml o superior, 80 mg/ml o superior, 100 mg/ml o superior, 120 mg/ml o superior, 150 mg/ml o superior, inferior a 300 mg/ml, inferior a 250 mg/ml, o inferior a 200 mg/ml. En un aspecto, la concentración de la proteína en la disolución previa a la liofilización en la presente invención oscila entre 30 0,01 mg/ml y 300 mg/ml, tal como de 1 a 300 mg/ml, de 50 a 300 mg/ml, y similares.

35 En la presente invención, la expresión "formulación en disolución que contiene anticuerpos" se refiere a una formulación con una concentración de anticuerpo de 50 mg/ml o superior, preferentemente de 80 mg/ml o superior, más preferentemente de 100 mg/ml o superior, aún más preferentemente de 120 mg/ml o superior, y todavía más preferentemente de 150 mg/ml o superior.

40 Además, el límite superior de la concentración de anticuerpo en la formulación en disolución que contiene anticuerpos suele ser de 300 mg/ml, preferentemente de 250 mg/ml, y aún más preferentemente de 200 mg/ml desde el punto de vista de la producción. Por tanto, la concentración de anticuerpo de la disolución de anticuerpos oscila preferentemente entre 50 y 300 mg/ml, más preferentemente entre 100 y 300 mg/ml, aún más preferentemente entre 120 y 250 mg/ml, y en especial preferentemente entre 150 y 200 mg/ml.

45 Algunos ejemplos del anticuerpo monoclonal que se va a emplear en la presente divulgación, pero que no forma parte de la invención, incluyen no solo anticuerpos monoclonales derivados de animales, tales como seres humanos, ratones, ratas, hámsteres, conejos, ovejas, camellos y monos, sino también anticuerpos recombinantes modificados de modo artificial, tales como anticuerpos químicos, anticuerpos humanizados y anticuerpos biespecíficos. Otros ejemplos de los mismos incluyen anticuerpos recombinantes preparados modificando artificialmente regiones variables y/o regiones constantes del anticuerpo, etc., para modificar las propiedades físicas de una molécula de anticuerpo (concretamente, la modificación del punto isoeléctrico (pI), la modificación de la afinidad por el receptor de Fc, etc.) a fin de mejorar la retención sanguínea y la farmacocinética.

50 Además, la clase de inmunoglobulina del anticuerpo no presenta limitaciones concretas y puede utilizarse cualquier clase, que incluye IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA, IgD, IgE, IgM, etc. Se prefieren IgG e IgM.

55 Además, algunos ejemplos de anticuerpos en la presente divulgación, pero que no forman parte de la invención, incluyen no solo anticuerpos con regiones constantes y regiones variables (anticuerpos completos), sino también fragmentos de anticuerpos, tales como Fv, Fab, F(ab)₂, y anticuerpos de bajo peso molecular, tales como Fv monocatenarios monovalentes o al menos bivalentes (scFv, sc(Fv)₂), y diacuerpos, incluidos dímeros de scFv, que se obtienen conectando regiones variables del anticuerpo empleando conectores, tales como conectores peptídicos.

60 Sin embargo, se prefieren anticuerpos completos.

65 Los anteriores anticuerpos que se van a utilizar en la presente invención pueden prepararse mediante procedimientos muy conocidos por los expertos en la materia. Se puede preparar básicamente un hibridoma que produzca un anticuerpo monoclonal utilizando una técnica conocida como se indica a continuación. Concretamente, puede prepararse un hibridoma inmuniizando con un antígeno deseado o una célula que expresa un antígeno deseado como antígeno sensibilizante de acuerdo con un procedimiento normal de inmunización, fusionando la

- célula inmunitaria resultante con una célula progenitora conocida por medio de un procedimiento normal de fusión celular y, a continuación, cribando para detectar las células productoras del anticuerpo monoclonal (hibridomas) por medio de un procedimiento normal de cribado. Puede prepararse un hibridoma, por ejemplo, de acuerdo con el procedimiento de Milstein *et al.* (Kohler, G. y Milstein, C., Methods Enzymol. (1981), 73: 3-46). Cuando la inmunogenicidad de un antígeno es baja, puede llevarse a cabo una inmunización por unión con una macromolécula inmunogénica, tal como la albúmina.
- Además, puede utilizarse un anticuerpo recombinante producido clonando un gen de anticuerpo procedente de hibridoma, incorporándolo en un vector adecuado, introduciendo el vector en un hospedador, y utilizando una técnica de recombinación genética (por ejemplo, véase Carl, A.K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Concretamente, se sintetiza ADNc de una región variable (región V) del anticuerpo a partir del ARNm del hibridoma utilizando la transcriptasa inversa. Cuando se obtiene ADN que codifica una región V del anticuerpo de interés, el ADN se liga a un ADN que codifica una región constante (región C) deseada del anticuerpo y, a continuación, el resultado se incorpora en un vector de expresión. Como alternativa, un ADN que codifica una región V del anticuerpo puede incorporarse en un vector de expresión que contenga el ADN de una región C del anticuerpo. Dicho ADN se incorpora en un vector de expresión para la expresión bajo el control de una región de control de la expresión, tal como un potenciador y un promotor. A continuación, pueden transformarse células hospedadoras con este vector de expresión para que expresen el anticuerpo.
- En la presente divulgación, puede emplearse un anticuerpo recombinante modificado artificialmente a fin de reducir la heteroantigenicidad hacia seres humanos, etc., tal como un anticuerpo químérico o un anticuerpo humanizado. Estos anticuerpos modificados pueden producirse utilizando procedimientos conocidos. Un anticuerpo químérico es un anticuerpo compuesto de regiones variables de cadena pesada y de cadena ligera de un mamífero no humano, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, y regiones constantes de cadena pesada y de cadena ligera de un anticuerpo humano, y puede obtenerse ligando un ADN que codifica la región variable del anticuerpo de ratón con un ADN que codifica la región constante del anticuerpo humano, incorporando el resultado en un vector de expresión y, a continuación, introduciendo el vector en un hospedador para la producción.
- Un anticuerpo humanizado también se denomina anticuerpo humano remodelado y se prepara injertando una región determinante de la complementariedad ("complementarity determining region", CDR) de un mamífero no humano, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, en una región determinante de la complementariedad de un anticuerpo humano. Por tanto, también se conocen técnicas de recombinación genética. Concretamente, se obtiene un anticuerpo humanizado sintetizando una secuencia de ADN diseñada para ligar la CDR de un anticuerpo de ratón a la región marco ("framework region", FR) de un anticuerpo humano mediante un procedimiento de PCR, a partir de varios oligonucleótidos preparados para que contengan una parte solapante en el extremo, ligando el ADN obtenido a un ADN que codifica una región constante de un anticuerpo humano, incorporando el resultado en un vector de expresión y, a continuación, introduciendo el vector en un hospedador para la producción del mismo (véase la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 239400, WO96/02576). Como la FR de un anticuerpo humano que va a ser ligada a través de una CDR, se selecciona una en la que la región determinante de la complementariedad forma un sitio de unión al antígeno favorable. Si procede, uno o más aminoácidos en la región marco de una región variable del anticuerpo pueden sustituirse, de modo que la región determinante de la complementariedad de un anticuerpo humano remodelado forme un sitio de unión al antígeno adecuado (Sato, K. *et al.*, Cancer Res. (1993), 53, 851-856).
- Como técnica para sustituir uno o más aminoácidos de un anticuerpo para mejorar la actividad, las propiedades físicas, la farmacocinética, la seguridad, etc., del anticuerpo, también se conocen, por ejemplo, las técnicas descritas a continuación. Algunos ejemplos del anticuerpo que se va a emplear en la presente invención incluyen anticuerpos en los que se han realizado dichas sustituciones de aminoácidos (incluidas delecciones y adiciones).
- Las técnicas para la sustitución de aminoácidos en una región variable de un anticuerpo IgG que se han notificado incluyen la humanización (Tsurushita N., Hinton P.R., Kumar S., Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax, Methods, mayo de 2005, 36(1):69-83), la maduración por afinidad, llevada a cabo mediante la sustitución de aminoácidos en una región determinante de la complementariedad (CDR) para potenciar la actividad de unión (Rajpal A., Beyaz N., Haber L., Cappuccilli G., Yee H., Bhatt R.R., Takeuchi T., Lerner R.A., Crea R., A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 14 de junio de 2005, 102(24):8466-8471) y la mejora de la estabilidad fisicoquímica por sustitución de aminoácidos de la región marco (FR) (Ewert S., Honegger A., Pluckthun A., Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CDR grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering, Methods, octubre de 2004, 34(2): 184-199, artículo). Además, como técnica para llevar a cabo la sustitución de aminoácidos en la región Fc del anticuerpo IgG, se conoce una técnica para potenciar la actividad citotóxica dependiente de anticuerpos ("antibody-dependent cytotoxic activity", actividad ADCC) y la actividad citotóxica dependiente del complemento ("complement-dependent cytotoxic activity", actividad CDC) (Kim S.J., Park Y., Hong H.J., Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies, Mol. Cells, 31 de agosto de 2005, 20(1):17-29, artículo). Además, se ha notificado una técnica para la sustitución de aminoácidos de Fc, no solo para potenciar dichas funciones efectoras, sino también para mejorar la semivida en sangre de anticuerpos (Hinton P.R., Xiong

J.M., Johlfs M.G., Tang M.T., Keller S., Tsurushita N., An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life, J. Immunol., 1 de enero de 2006, 1(176):346-356; Ghetie V., Popov S., Borvak J., Radu C., Matesoi D., Medesan C., Ober R.J., Ward E.S., Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis, Nat. Biotechnol., julio de 1997, 15(7):637-640). Además, también se conocen diversas técnicas de sustitución de aminoácido para regiones constantes a fin de mejorar las propiedades físicas de anticuerpos (documento WO09/41613).

Además, también se conoce un procedimiento para obtener un anticuerpo humano. Por ejemplo, se sensibilizan linfocitos humanos con un antígeno deseado o células que expresan el antígeno deseado *in vitro*, y los linfocitos sensibilizados se fusionan con células de mieloma humano, tal como as U266, de modo que también puede obtenerse un anticuerpo humano deseado con actividad de unión al antígeno (véase la publicación de patente japonesa n.º 1-59878). Además, puede obtenerse un anticuerpo humano deseado inmunizando un animal transgénico que posea todos los repertorios de genes de anticuerpos humanos con un antígeno (documentos WO93/12227, WO92/03918, WO94/02602, WO94/25585, WO96/34096, WO96/33735). Además, también se conoce una técnica para obtener un anticuerpo humano mediante inmunoadsorción empleando un banco de anticuerpos humanos. Por ejemplo, una región variable de un anticuerpo humano se expresa en forma de anticuerpo monocatenario (scFv) sobre la superficie de un fago por medio del procedimiento de presentación en fagos, y puede seleccionarse un fago que se une a un antígeno. Al analizar el gen del fago seleccionado, puede determinarse la secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo humano que se une al antígeno. Si se aclara la secuencia de ADN del scFv que se une a un antígeno, puede prepararse un vector de expresión adecuado que contenga la secuencia y puede obtenerse un anticuerpo humano. Estos procedimientos ya son muy conocidos y se pueden consultar los documentos WO92/01047, WO92/20791, WO93/06213, WO93/11236, WO93/19172, WO95/01438 y WO95/15388. Dichos anticuerpos humanos también se incluyen en los anticuerpos que se van a utilizar en la presente invención.

Cuando un gen de anticuerpo se aísla y se introduce en un hospedador adecuado para preparar un anticuerpo, puede emplearse una combinación de un hospedador adecuado y un vector de expresión. Cuando se utilizan células eucariotas como hospedadoras, pueden emplearse células animales, células vegetales y células fúngicas. Algunas células animales conocidas incluyen (1) células de mamífero, tales como CHO, COS, mieloma, BHK ("baby hamster kidney", riñón de cría de hámster), HeLa, Vero, (2) células de anfibio, tales como oocitos de *Xenopus*, o (3) células de insecto, tales como sf9, sf21 y Tn5. Algunas células vegetales conocidas incluyen células derivadas del género *Nicotiana*, tales como células derivadas de *Nicotiana tabacum*, y estas células pueden someterse a un cultivo de callo. Algunas células fúngicas conocidas incluyen levaduras, tales como las del género *Saccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, y hongos filamentosos, tales como los del género *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus niger*. Cuando se emplean células procariotas, existen sistemas de producción que emplean células bacterianas. Algunas células bacterianas conocidas incluyen *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Puede obtenerse un anticuerpo introduciendo un gen del anticuerpo de interés en estas células mediante transformación y, a continuación, cultivando las células transformadas *in vitro*.

Además, los anticuerpos que se van a utilizar en la presente divulgación incluyen los productos modificados de anticuerpos. Por ejemplo, también pueden emplearse anticuerpos conjugados con diversas moléculas, tales como polietilenglicool (PEG) y fármacos citotóxicos (Farmaco, 30 de agosto de 1999, 54(8):497-516, Cancer J., mayo-junio de 2008, 14(3):154-169). Los anticuerpos que se van a utilizar en la presente divulgación también incluyen estos productos modificados de anticuerpos. Dicho producto modificado de un anticuerpo puede obtenerse por modificación química de un anticuerpo. Estos procedimientos ya han sido establecidos en este campo.

Algunos ejemplos de anticuerpos que se van a utilizar en la presente invención son uno cualquiera de un anticuerpo humanizado contra el receptor de interleucina 6 (IL-6), un anticuerpo humanizado biespecífico contra el factor IX y el factor X, y un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor A de IL-31.

Algunos ejemplos de un anticuerpo humanizado remodelado preferido incluyen un anticuerpo humanizado contra el receptor de interleucina 6 (IL-6) (tocilizumab, hPM-1 o MRA, véase el documento WO92/19759), un anticuerpo monoclonal humanizado contra HM1.24 (véase el documento WO98/14580), un anticuerpo humanizado contra el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (anticuerpo anti-PTHrP) (véase el documento WO98/13388), un anticuerpo humanizado contra el factor tisular (véase el documento WO99/51743), un anticuerpo IgG1κ humanizado contra el glipícano 3 (codrituzumab, GC33, véase el documento WO2006/006693), un anticuerpo humanizado anti-NR10 (véase el documento WO2009/072604), un anticuerpo humanizado biespecífico contra el factor IX y el factor X (ACE910, véase el documento WO2012/067176) y el anticuerpo nemolizumab (CIM331), que es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor A de IL-31. Se prefieren especialmente como anticuerpos humanizados un anticuerpo humanizado contra el receptor de IL-6, un anticuerpo humanizado anti-NR10, un anticuerpo humanizado biespecífico contra el factor IX y el factor X, y el anticuerpo nemolizumab (CIM331), que es un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor A de IL-31.

El anticuerpo IgM humano es preferentemente un anticuerpo IgM humano recombinante contra el gangliósido GM3 (véase el documento WO05/05636) y similares.

Como el anticuerpo de bajo peso molecular, son preferibles un diacuerpo contra un agonista del receptor de TPO (véase el documento WO02/33072), un diacuerpo contra un agonista de CD47 (véase el documento WO01/66737) y similares.

- 5 En la presente invención, la expresión "anticuerpo con bajo punto isoelectrónico (anticuerpo de bajo pI)" se refiere a un anticuerpo con bajo punto isoelectrónico, que, en concreto, apenas existe en la naturaleza. Algunos ejemplos del punto isoelectrónico de dicho anticuerpo incluyen, entre otros, de 3,0 a 8,0, preferentemente de 5,0 a 7,5, más preferentemente de 5,0 a 7,0, y en especial preferentemente de 5,0 a 6,5. Cabe destacar que suele considerarse que los anticuerpos naturales (o normales) tienen un punto isoelectrónico en el intervalo de 7,5 a 9,5.
- 10 Además, el anticuerpo preferentemente es un anticuerpo con pI modificado, en el que el pI del anticuerpo disminuye al modificar residuos de aminoácidos expuestos en la superficie del anticuerpo. Dicho anticuerpo con pI modificado se refiere a un anticuerpo con un pI disminuido en 1 o más, preferentemente en 2 o más, y más preferentemente en 3 o más que el pI del anticuerpo antes de la modificación. Algunos ejemplos de dicho anticuerpo con pI modificado incluyen, entre otros, SA237 (MAb1, cadena H/SEQ ID NO:1; cadena L/SEQ ID NO:2), que es un anticuerpo contra el receptor de IL-6 descrito en el documento WO2009/041621, un anticuerpo humanizado anti-NR10, y un anticuerpo totalmente humanizado NS22 preparado mediante el procedimiento descrito en el ejemplo 12 del documento WO2009/072604.
- 15 20 Algunos ejemplos de residuos de aminoácidos expuestos en la superficie de un anticuerpo incluyen, entre otros, en el caso de la región variable de cadena H, los seleccionados entre los residuos de aminoácidos basados en la numeración de Kabat H1, H3, H5, H8, H10, H12, H13, H15, H16, H19, H23, H25, H26, H31, H39, H42, H43, H44, H46, H61, H62, H64, H65, H68, H71, H72, H73, H75, H76, H81, H82b, H83, H85, H86, H105, H108, H110 y H112. Algunos ejemplos de los mismos incluyen, entre otros, en el caso de la región variable de cadena L, los seleccionados entre los residuos de aminoácidos basados en la numeración de Kabat L1, L3, L7, L8, L9, L11, L12, L16, L17, L18, L20, L22, L24, L27, L38, L39, L41, L42, L43, L45, L46, L49, L53, L54, L55, L57, L60, L63, L65, L66, L68, L69, L70, L74, L76, L77, L79, L80, L81, L85, L100, L103, L105, L106 y L107.
- 25 30 En la presente invención, el término "modificación" se refiere a la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos originales por otro u otros residuos de aminoácidos, la delección del residuo o residuos de aminoácidos originales, la adición de uno o más residuos de aminoácidos nuevos, etc. Preferentemente, el término se refiere a la sustitución de uno o más residuos de aminoácidos originales por otro u otros residuos de aminoácidos.
- 35 40 Se sabe que, entre el conjunto de los aminoácidos, hay aminoácidos cargados. Por lo general, se sabe que la lisina (K), la arginina (R) y la histidina (H) son aminoácidos con carga positiva (aminoácidos cargados positivamente). Como aminoácidos con carga negativa (aminoácidos cargados negativamente), se conocen el ácido aspártico (D), el ácido glutámico (E) y similares. Los otros aminoácidos se conocen como aminoácidos sin carga.
- 45 Los residuos de aminoácidos después de la modificación de la presente invención preferentemente se seleccionan de modo adecuado de residuos de aminoácidos incluidos en cualquiera de los siguientes grupos (a) o (b), aunque no se limitan concretamente a estos aminoácidos:
- (a) ácido glutámico (E), ácido aspártico (D)
- 45 (b) lisina (K), arginina (R), histidina (H)
- Además, cuando un residuo de aminoácido no modificado está cargado de antemano, un aspecto preferido es modificar el residuo aminoácido cargado en un residuo aminoácido sin carga.
- 50 55 Concretamente, algunos ejemplos de modificación en la presente invención incluyen (1) la sustitución de un aminoácido cargado por un aminoácido sin carga, (2) la sustitución de un aminoácido cargado por un aminoácido con carga opuesta, y (3) la sustitución de un aminoácido sin carga por un aminoácido cargado.
- El valor del punto isoelectrónico puede medirse mediante enfoque isoelectrónico, conocido por los expertos en la materia. El valor del punto isoelectrónico teórico puede calcularse empleando un software de análisis de secuencia de aminoácidos y genes (Genetyx, etc.).
- 60 65 Puede obtenerse un anticuerpo con un residuo de aminoácido con una carga modificada al modificar un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, cultivar el ácido nucleico en células hospedadoras y purificar el anticuerpo del cultivo de células hospedadoras. En la presente invención, la expresión "modificar un ácido nucleico" se refiere a la modificación de una secuencia de ácido nucleico para que contenga un codón correspondiente a un residuo de aminoácido que se va a introducir mediante modificación. Más específicamente, la expresión se refiere a la modificación de la secuencia de nucleótidos de un ácido nucleico, de modo que un codón de un residuo de aminoácido antes de la modificación se modifica para que sea el codón de un resto aminoácido que se va a introducir mediante modificación. Es decir, el codón que codifica un residuo de aminoácido que se va a modificar se sustituye por el codón que codifica un residuo de aminoácido que se va a introducir mediante modificación. Dicha

modificación del ácido nucleico puede ser llevada a cabo de modo adecuado por los expertos en la materia empleando técnicas conocidas, tales como la mutagénesis dirigida a sitio y la mutagénesis con PCR.

- 5 La proteína también divulgada en la presente descripción puede ser una proteína fisiológicamente activa que puede emplearse como producto farmacéutico distinto a un anticuerpo. Algunos ejemplos de dichas proteínas fisiológicamente activas incluyen, entre otras, un factor estimulante de colonias de granulocitos ("granulocyte colony-stimulating factor", G-CSF), un factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos ("granulocyte-macrophage colony-stimulating factor", GM-CSF), factores de crecimiento hematopoyéticos, tales como eritropoyetina (EPO) y trombopoyetina, interferón, citocinas, tales como IL-1 e IL-6, anticuerpos monoclonales, 10 activador del plasminógeno tisular ("tissue plasminogen activator", TPA), urocinasa, seroalbúmina, factor de coagulación sanguíneo VIII, leptina, insulina, factor de crecimiento de células madre ("stem cell growth factor", SCF).

La proteína fisiológicamente activa tiene sustancialmente la misma actividad biológica que la de un mamífero, especialmente una proteína fisiológicamente activa humana, y algunos ejemplos de la misma incluyen las derivadas de fuentes naturales, preferentemente las obtenidas por procedimientos de recombinación genética. Como proteína fisiológicamente activa obtenida mediante un procedimiento de recombinación génica, pueden mencionarse las producidas permitiendo que bacterias, tales como *Escherichia coli*; levaduras; células cultivadas derivadas de animales, tales como células de ovario de hámster chino ("Chinese hamster ovary", CHO), células C127 y células COS, produzcan la proteína, y extrayendo, separando y purificando el resultado por diversos procedimientos. Las 15 proteínas obtenidas mediante procedimientos de recombinación genética incluyen las que tienen la misma secuencia de aminoácidos que la proteína natural, o las que tienen contienen una o más delecciones, sustituciones o adiciones en la secuencia de aminoácidos y tienen la actividad biológica. Además, algunos ejemplos de la proteína fisiológicamente activa, también incluyen las modificadas químicamente con PEG o similares.

- 20 25 Algunos ejemplos de la proteína fisiológicamente activa incluyen proteínas con cadenas de azúcares. El origen de la cadena de azúcar no presenta limitaciones concretas, pero es preferible una cadena de azúcar que se va a añadir a células de mamífero. Algunos ejemplos de células de mamífero incluyen células CHO, células BHK, células COS, células derivadas de seres humanos, etc. Entre éstas, las más preferibles son las células CHO.

30 35 40 Por ejemplo, cuando la proteína fisiológicamente activa es G-CSF, puede utilizarse cualquier G-CSF altamente purificado. El G-CSF en la presente invención puede ser cualquiera producido por cualquier procedimiento. El G-CSF que se va a utilizar en este caso es el producido cultivando una línea de células tumorales humanas, extrayendo, separando y purificando el resultado por diversos procedimientos, o el G-CSF producido en bacterias, tales como *Escherichia coli*, levaduras, células cultivadas derivadas de animales, tales como células de ovario de hámster chino (CHO), células C127, células COS, etc., por técnicas de ingeniería genética y, a continuación, se extrae, se separa y se purifica el resultado por diversos procedimientos. Preferentemente, el G-CSF se produce por medio de un procedimiento de recombinación genética que emplea *E. coli*, levaduras o células CHO. El más preferido es el producido por células CHO utilizando un procedimiento de recombinación genética. Además, también se incluye un G-CSF modificado químicamente con PEG o similares (véase la publicación de solicitud de patente internacional n.º WO90/12874).

45 50 55 El tampón que se va a utilizar en la formulación en disolución que contiene proteínas se prepara empleando un agente tamponante, que es una sustancia para mantener el pH de una disolución. Para la formulación en disolución que contiene anticuerpos, el pH de la disolución varía preferentemente de 4 a 8, más preferentemente de 5,0 a 7,5, aún más preferentemente de 5,5 a 7,2, y todavía más preferentemente de 6,0 a 6,5. El agente tamponante que puede utilizarse en la presente invención puede ajustar el pH en estos intervalos y es farmacéuticamente aceptable. Dichos agentes tamponantes son conocidos por los expertos en la técnica de las formulaciones en disolución y, por ejemplo, pueden emplearse sales inorgánicas, tales como sales fosfato (de sodio o potasio), bicarbonato de sodio; sales de ácidos orgánicos, tales como sales citrato (de sodio o potasio), acetato de sodio y succinato de sodio; o ácidos, tales como ácido fosfórico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico y ácido glucónico. Además, pueden emplearse agentes tamponantes de Tris y Good, tales como MES, MOPS y HEPES, histidina (por ejemplo, clorhidrato de histidina), glicina y similares.

60 65 En la formulación en disolución que contiene anticuerpos, el tampón es preferentemente un tampón histidina o un tampón glicina, y se prefiere especialmente un tampón histidina. La concentración del tampón varía en general de 1 a 500 mM, preferentemente de 5 a 100 mM, y más preferentemente de 10 a 20 mM. Cuando se emplea un tampón histidina, el tampón preferentemente contiene de histidina de 5 a 25 mM, y más preferentemente histidina de 10 a 20 mM.

66 La formulación en disolución que contiene anticuerpos preferentemente se estabiliza al añadir un agente estabilizante adecuado para un anticuerpo como principio activo. Una formulación en disolución que contiene anticuerpos "estable" es cuando no se observan cambios significativos en la temperatura de refrigeración (de 2 °C a 8 °C) durante al menos 2 meses, preferentemente 2 años, y más preferentemente 3 años; o a temperatura ambiente (de 22 °C a 28 °C) durante al menos 3 meses, preferentemente 6 meses, y más preferentemente un año. Por ejemplo, la cantidad total de dímeros y de productos de degradación después de la conservación a 5 °C durante 2 años representa el 5,0 % o menos, preferentemente el 2 % o menos, y más preferentemente el 1,5 % o menos,

dicha cantidad, después de la conservación a 25 °C durante 6 meses, representa el 5,0 % o menos, preferentemente el 2 % o menos, y más preferentemente el 1,5 % o menos.

La formulación liofilizada de la presente invención contiene al menos un tipo de tensioactivo.

5 Los ejemplos típicos del tensioactivo pueden incluir: tensioactivos no iónicos, tales como ésteres de ácidos grasos de sorbitán, tales como monocaprilato de sorbitán, monolaurato de sorbitán y monopalmitato de sorbitán; ésteres de ácidos grasos de glicerina, tales como monocaprilato de glicerina, monomiristato de glicerina y monoestearato de glicerina; ésteres de ácidos grasos de poliglicerina, tales como monoestearato de decaglicerilo, diestearato de decaglicerilo y monolinoleato de decaglicerilo; ésteres de ácidos grasos de sorbitán polioxietilenoado, tales como monolaurato de sorbitán polioxietilenoado, monooleato de sorbitán polioxietilenoado, monoestearato de sorbitán polioxietilenoado, monopalmitato de sorbitán polioxietilenoado, trioleato de sorbitán polioxietilenoado y triestearato de sorbitán polioxietilenoado; ésteres de ácidos grasos de sorbit polioxietilenoado, tales como tetraestearato de sorbit poloxietilenoado y tetraoleato de sorbit poloxietilenoado; ésteres de ácidos grados de glicerina polioxietilenoada, tales como monoestearato de glicerilo polioxietilenoado; ésteres de ácidos grasos de polielenglicol, tales como diestearato de polielenglicol; éteres alquílicos polioxietilenoados, tales como éter laurílico polioxietilenoado; éteres alquílicos polioxietilenoados y polioxipropilenados, tales como éter glicólico polioxietilenoado y polioxipropilenado, éter propílico polioxietilenoado y polioxipropilenado y éter cetílico polioxietilenoado y polioxipropilenado; éteres alquilfenílicos polioxietilenoado, tales como étere nonilfenílico poloxietilenoado; aceites de ricino hidrogenados polioxietilenoados, tales como aceite de ricino poloxietilenoado y aceite de ricino hidrogenado poloxietilenoado (aceite de ricino de hidrógeno y poloxietileno); derivados de cera de abeja poloxietilenoados, tales como cera de abeja de sorbit poloxietilenoado; derivados de lanolina poloxietilenoados, tales como lanolina poloxietilenoada; los que tienen un HLB de 6 a 18, tales como amidas de ácidos grasos poloxietilenoadas, por ejemplo, estearamida poloxietilenoada; tensioactivos aniónicos, tales como sales de sulfato de alquilo con 10 a 18 átomos de carbono, tales como cetilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio y oleilsulfato de sodio; sulfatos de éter alquílico poloxietilenoados, en los que número molar promedio de óxido de etileno varía de 2 a 4 y el número de átomos de carbono de un grupo alquilo varía de 10 a 18, tales como laurilsulfato de sodio poloxietilenoado; sales de ésteres sulfosuccinato de alquilo con un grupo alquilo de 8 a 18 átomos de carbono, tales como laurylsulfosuccinato de sodio; tensioactivos naturales, tales como lecitina y glicerofosfolípido; esfingofosfolípidos, tales como esfingomielina; y ésteres de ácidos grasos de sacarosa con 12 a 19 átomo de carbono. La formulación liofilizada de la presente invención puede contener uno o una combinación de dos o más tipos de estos tensioactivos.

35 Los tensioactivos preferidos son los tensioactivos no iónicos, tales como ésteres de ácidos grasos de sorbitán poloxietilenoado y copolímeros de polioxietileno y polioxipropileno, y se prefieren especialmente los polisorbatos 20, 40, 60, 65, 80, 81, 20, 80 y los tensioactivos Pluronic, y los más preferidos son los polisorbatos 21, 85 y Pluronic F-68 (poloxámero 188).

40 La cantidad del tensioactivo que se va a añadir a la disolución previa a la liofilización varía en general del 0,0001 % al 10 % (p/v). En un aspecto, la concentración del tensioactivo no iónico en la disolución previa a la liofilización en la presente invención varía del 0,001 % al 1 % (p/v), tal como del 0,001 % al 5 % (p/v), y del 0,005 % al 3 % (p/v).

45 La formulación liofilizada de la presente invención puede contener, de modo adecuado, ingredientes farmacéuticamente aceptables a demanda. Algunos ejemplos de los mismos incluyen agentes suspensores, solubilizantes, conservantes, inhibidores de la adsorción, diluyentes, excipientes, ajustadores del pH, agentes calmantes, agentes reductores que contienen azufre y antioxidantes.

50 Algunos ejemplos de los agentes suspensores pueden incluir metilcelulosa, polisorbato 80, hidroxietilcelulosa, goma arábica, polvo de tragacanto, carboximetilcelulosa de sodio y monolaurato de sorbitán poloxietilenoado.

55 Algunos ejemplos de los solubilizantes pueden incluir aceite de ricino hidrogenado poloxietilenoado, polisorbato 80, amida del ácido nicotínico, monolaurato de sorbitán poloxietilenoado, Magrogol y éster étlico de ácido graso de aceite de ricino.

Algunos ejemplos de los agentes isotónicos pueden incluir cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio.

55 Algunos ejemplos de los conservantes pueden incluir paraoxibenzoato de metilo, paraoxibenzoato de etilo, ácido sóblico, fenol, cresol y clorocresol.

60 Algunos ejemplos de los inhibidores de la adsorción pueden incluir seroalbúmina humana, lecitina, dextrano, copolímero de óxido de etileno-óxido de propileno, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, aceite de ricino hidrogenado poloxietilenoado y polielenglicol.

65 Algunos ejemplos de los agentes reductores que contienen azufre incluyen N-acetilcisteína, N-acetilhomocisteína, ácido tióctico, tioglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico y una sal del mismo, tiosulfato de sodio, glutatión, y los que contienen un grupo sulfhidrilo, tales como ácido tioalcanoico de 1 a 7 átomos de carbono.

Algunos ejemplos de los antioxidantes incluyen ácido eritórbico, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, α -tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico y una sal del mismo, palmitato del ácido L-ascórbico, estearato del ácido L-ascórbico, hidrógeno sulfito de sodio, sulfito de sodio, galato de triamilo, galato de propilo o agentes quelantes, tales como etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA), pirofosfato de sodio y metafosfato de sodio.

5 Además, la formulación liofilizada de la presente invención puede contener, de modo adecuado, un agente estabilizante y/o un regulador de la tonicidad a demanda.

10 Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "agente estabilizante" se refiere a un aditivo farmacéuticamente aceptable que protege a un agente terapéutico y/o a una formulación frente a la degradación química y/o física durante la fabricación, la conservación y la aplicación. Las vías de degradación química y física de los productos farmacéuticos se resumen en Cleland *et al.* (1993), Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst., 10(4):307-777; Wang (1999), Int. J. Pharm., 185(2):129-188; Wang (2000), Int. J. Pharm., 203(1-2):1-60; y Chi *et al.* (2003), Pharm. Res., 20(9):1325-1336. Algunos ejemplos del agente estabilizante incluyen azúcares, aminoácidos, polioles, ciclodextrinas (por ejemplo, hidroxipropil- β -ciclodextrina, sulfobutiletil- β -ciclodextrina y β -ciclodextrina), polietilenglicol (por ejemplo, PEG 3000, PEG 3350, PEG 4000 y PEG 6000), albúmina (por ejemplo, seroalbúmina humana ["human serum albumin", HSA] y seroalbúmina bovina ["bovine serum albumin", BSA]), sales (por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de magnesio y cloruro de calcio) y agentes quelantes (por ejemplo, EDTA). El agente estabilizante puede estar presente en una disolución previa a la liofilización o en una disolución reconstituida en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mM, preferentemente en una cantidad de aproximadamente 10 a aproximadamente 300 mM, y más preferentemente en una cantidad de aproximadamente 100 a aproximadamente 300 mM.

15 Tal como se emplea en el presente documento, la expresión "regulador de la tonicidad" se refiere a un aditivo farmacéuticamente aceptable que se emplea para regular la tonicidad (propiedad osmótica) de una disolución previa a la liofilización o de una disolución reconstituida. Algunos ejemplos del regulador de la tonicidad incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio, glicerina y cualquier ingrediente del grupo de los aminoácidos o los azúcares. El regulador de la tonicidad puede estar presente en una disolución previa a la liofilización o en una disolución reconstituida en una cantidad de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mM, preferentemente en una cantidad de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 mM.

20 En un aspecto preferido, la disolución previa a la liofilización en la presente invención contiene:

25 un agente terapéutico de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 200 mg/ml;
 30 un agente tamponante de 0 a aproximadamente 100 mM;
 35 un tensioactivo de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 1 % (p/v); y
 40 un agente estabilizante de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mM y/o un regulador de la tonicidad de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mM.

45 En un aspecto preferido, cuando el agente terapéutico es una proteína, la disolución previa a la liofilización en la presente invención contiene:

45 la proteína de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 mg/ml;
 50 un agente tamponante de 0 a aproximadamente 100 mM;
 55 un tensioactivo de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 1 % (p/v); y
 60 un agente estabilizante de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mM y/o un regulador de la tonicidad de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mM.

55 La formulación liofilizada de la presente invención se disuelve en un disolvente farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyección, antes del uso y se administra a un sujeto en forma de una disolución reconstituida. La composición de la disolución reconstituida puede ser la misma o puede ser diferente de la composición de la disolución previa a la liofilización.

60 La concentración del agente terapéutico en una disolución reconstituida depende del tipo de agente terapéutico, su uso y similares. La concentración del agente terapéutico está en el intervalo, por ejemplo, de 0,01 a 300 mg/ml, en el intervalo de 0,01 a 250 mg/ml, o en el intervalo de 0,01 a 200 mg/ml.

65 En un aspecto, cuando el agente terapéutico en la presente invención es una proteína, la formulación liofilizada de la presente invención se reconstituye en un disolvente, de modo que la concentración de la proteína en la disolución reconstituida es, por ejemplo, de 0,01 mg o superior, 1 mg/ml o superior, 10 mg/ml o superior, 50 mg/ml o superior,

80 mg/ml o superior, 100 mg/ml o superior, 120 mg/ml o superior, 150 mg/ml o superior, inferior a 300 mg/ml, inferior a 250 mg/ml, o inferior a 200 mg/ml. En un aspecto, la formulación liofilizada de la presente invención se reconstituye en un disolvente, de modo que la concentración de la proteína en la disolución reconstituida oscila entre 0,01 mg/ml y 300 mg/ml, tal como entre 1 y 300 mg/ml, y entre 50 y 300 mg/ml.

5 En un aspecto, la formulación liofilizada de la presente invención se resuspender en un disolvente, de modo que la concentración de un tensioactivo no iónico en la disolución reconstituida varía del 0,001 % al 1 % (p/v), tal como del 0,001 % al 5 % (p/v), o del 0,005 % al 3 % (p/v).

10 En un aspecto preferido, la formulación liofilizada de la presente invención se reconstituye de modo que la disolución reconstituida contiene:

un agente terapéutico de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 200 mg/ml;

15 un agente tamponante de 0 a aproximadamente 100 mM;

un tensioactivo de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 1 % (p/v); y

20 un agente estabilizante de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mM y/o un regulador de la tonicidad de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mM.

En un aspecto preferido, cuando el agente terapéutico es una proteína, la formulación liofilizada de la presente invención se reconstituye de modo que la disolución reconstituida contiene:

25 la proteína de aproximadamente 50 a aproximadamente 300 mg/ml;

un agente tamponante de 0 a aproximadamente 100 mM;

30 un tensioactivo de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 1 % (p/v); y

un agente estabilizante de aproximadamente 1 a aproximadamente 500 mM y/o un regulador de la tonicidad de aproximadamente 5 a aproximadamente 500 mM.

35 La relación de presión osmótica de la disolución reconstituida preparada a partir de la formulación liofilizada de la presente invención oscila entre aproximadamente 0,5 y 4, más preferentemente entre aproximadamente 0,7 y 2, y más preferentemente es de aproximadamente 1.

40 La formulación liofilizada de la presente invención se disuelve en un disolvente farmacéuticamente aceptable y, a continuación, se administra mediante inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular o similares. En la formulación para inyección subcutánea, la dosis por administración es grande (por ejemplo, de aproximadamente 80 a 200 mg cuando el agente terapéutico es un anticuerpo), pero la cantidad de dicha disolución para inyección es limitada. La formulación liofilizada de la presente invención es especialmente útil para la inyección subcutánea, porque puede prepararse una disolución reconstituida que contenga una elevada concentración del agente terapéutico.

45 Cuando se emplea un vial en la presente invención, el volumen del vial varía de 2 ml a 100 ml, y de 3 a 20 ml, por ejemplo.

50 En un aspecto, la cantidad de la disolución previa a la liofilización representa del 10 % al 90 % y, por ejemplo, del 20 % al 80 % del volumen del vial. Por ejemplo, cuando el volumen del vial es de 10 ml, la cantidad de la disolución previa a la liofilización varía de 1 ml a 9 ml, y de 2 a 8 ml, por ejemplo.

55 En un aspecto, la cantidad de una disolución de fármaco después de la redisolución representa del 10 % al 90 % y, por ejemplo, del 20 % al 80 % del volumen del vial. Por ejemplo, cuando el volumen del vial es de 10 ml, la cantidad de la disolución de fármaco después de la redisolución varía de 1 ml a 9 ml, y de 2 a 8 ml, por ejemplo.

La presente invención se describirá a continuación con más detalle en referencia a los siguientes ejemplos, pero el alcance de la presente invención no se limita a los mismos.

60 Ejemplos

Ejemplo 1: Efecto antiempañamiento para un vial de vidrio a través de un tratamiento con azufre o un tratamiento con VIST

65 Se evaluó el grado de empañamiento de la superficie interior de un recipiente de vidrio cuando una disolución de fármaco que contiene proteínas se introduce en un vial de vidrio tratado con azufre, tratado con VIST, siliconado o

sin tratar y, a continuación, se liofiliza.

- Los viales utilizados fueron viales de 10 ml, blancos a granel (material: vidrio de borosilicato; sin tratamiento; fabricados por Murase Glass Co., Ltd.), viales de 10 ml, blancos de azufre a granel (material: vidrio de borosilicato; tratados con azufre; fabricados por Murase Glass Co., Ltd.), viales de 10 ml VIST (material: vidrio de borosilicato; tratados con VIST; fabricados por Daiwa Special Glass Co., Ltd.) y viales de 10 ml TopLyo (marca registrada) (material: vidrio de borosilicato; siliconados; fabricados por SCHOTT AG). Cada vial se utilizó tras una esterilización con calor seco a 250 °C durante 120 minutos.
- Como disolución de fármaco que contiene proteínas, se preparó una disolución de un anticuerpo (CIM331) (30 mg/ml), tampón Tris (6 mmol/l), sacarosa (75 mmol/l), arginina (45 mmol/l) y poloxámero 188 (0,15 mg/ml). CIM331 es un anticuerpo contra la IL-31RA humana descrito en los documentos WO2010/064697 A1 y WO2016/167263 A1, y se preparó mediante un procedimiento conocido por los expertos en la materia de acuerdo con la descripción de los documentos de patente.
- Se introdujeron 5 ml de la disolución de fármaco que contiene proteínas en un vial, se congeló a -45 °C usando un Triomaster (fabricado por Kyowa Vacuum Engineering Co., Ltd.), se sometió a un secado primario a temperaturas cercanas a la temperatura de colapso en condiciones de vacío y, a continuación, se sometió a un secado secundario a 30 °C en condiciones de vacío.
- Después de la liofilización, se evaluó el grado de empañamiento en la superficie interior del recipiente de vidrio basándose en la puntuación de empañamiento. La puntuación de empañamiento se calcula multiplicando las puntuaciones de evaluación de dos parámetros (elementos de evaluación), a saber, la superficie de empañamiento (Superficie) por la altura de empañamiento (Altura) (véase la siguiente tabla 1).
- Puntuación de empañamiento = Puntuación de la superficie de empañamiento (1) × Puntuación de la altura de empañamiento (2)
- (1) La superficie de empañamiento (Superficie) se refiere a la superficie de una parte a la que se adhiere un residuo de una composición farmacéutica en una disolución de fármaco, sobre la superficie de la pared de vidrio, desde la parte superior del punto de contacto de la torta liofilizada hasta el tapón de goma. La superficie de empañamiento (%) se calculó empleando la superficie de la zona de la pared de vidrio desde la parte superior del punto de contacto de la torta liofilizada hasta el tapón de goma, siendo aquella del 100 %. A continuación, se registró la puntuación de evaluación de acuerdo con los siguientes criterios:
- (a) La puntuación de evaluación de una superficie de empañamiento es "0" cuando la superficie de empañamiento (%) es del 0 %.
 - (b) La puntuación de evaluación de una superficie de empañamiento es "1" cuando la superficie de empañamiento (%) es superior al 0 % y 5 % o inferior.
 - (c) La puntuación de evaluación de una superficie de empañamiento es "2" cuando la superficie de empañamiento (%) es superior al 5 % y 25 % o inferior.
 - (d) La puntuación de evaluación de una superficie de empañamiento es "3" cuando la superficie de empañamiento (%) es superior al 25 % y 50 % o inferior.
 - (e) La puntuación de evaluación de una superficie de empañamiento es "4" cuando la superficie de empañamiento (%) es superior al 50 % y 75 % o inferior.
 - (f) La puntuación de evaluación de una superficie de empañamiento es "5" cuando la superficie de empañamiento (%) es superior al 75 % y 100 % o inferior.
- (2) La altura de empañamiento (Altura) se refiere a la altura (distancia) desde la parte superior del punto de contacto de la torta liofilizada hasta el punto más elevado (longitud mayor) al que se ha adherido el residuo de la composición farmacéutica en la disolución de fármaco. La altura de empañamiento (%) se calculó empleando la altura desde la parte superior del punto de contacto de la torta liofilizada hasta el tapón de goma, siendo aquella del 100 %. A continuación, se registró la puntuación de evaluación de acuerdo con los siguientes criterios:
- (a) La puntuación de evaluación de una altura de empañamiento es "0" cuando no se observa empañamiento.
 - (b) La puntuación de evaluación de una altura de empañamiento es "1" cuando la altura de empañamiento (%) es superior al 0 % y 5 % o inferior.
 - (c) La puntuación de evaluación de una altura de empañamiento es "2" cuando la altura de empañamiento (%) es superior al 5 % y 25 % o inferior.

(d) La puntuación de evaluación de una altura de empañamiento es "3" cuando la altura de empañamiento (%) es superior al 25 % y 50 % o inferior.

5 (e) La puntuación de evaluación de una altura de empañamiento es "4" cuando la altura de empañamiento (%) es superior al 50 % y 75 % o inferior.

(f) La puntuación de evaluación de una altura de empañamiento es "5" cuando la altura de empañamiento (%) es superior al 75 % y 100 % o inferior.

10 Cuando la anterior puntuación de empañamiento es "inferior a 2", puede determinarse que no se observa empañamiento.

Tabla 1

	0	1	2	3	4	5
Superficie	0 %	aprox. 5 %	aprox. 25 %	aprox. 50 %	aprox. 75 %	aprox. 100 %
Altura	0 %	aprox. 5 %	aprox. 25 %	aprox. 50 %	aprox. 75 %	aprox. 100 %

Puntuación de empañamiento = (Superficie) x (Altura)

20 Los resultados se muestran en la figura 1. Los viales tratados con azufre, los viales tratados con VIST y los viales siliconados tuvieron una puntuación de empañamiento de 0, lo que indica que no se observó empañamiento. En cambio, los viales sin tratamiento tuvieron una puntuación de empañamiento de 16, lo que indica que se observó empañamiento. Se considera que, a través de estos tratamientos, se alivia la aspereza de las superficies del vial de vidrio, de modo que puede reducirse la humectabilidad y se dificulta la formación de empañamiento.

25 Ejemplo 2. Los viales tratados con azufre y los viales tratados con VIST no causan encogimiento de la torta

Se evaluaron viales sometidos a diferentes tratamientos de la superficie para el estado de la torta después de la preparación de formulaciones liofilizadas de la misma manera que en el ejemplo 1.

30 Los resultados se muestran en la figura 2. En los viales siliconados, se produjo el encogimiento de la torta tras la liofilización y se formó un hueco entre la superficie de la pared del recipiente y la torta, y se comprobó que la torta se movía con facilidad dentro del vial. En cambio, en los viales tratados con azufre y los viales tratados con VIST, no se produjo encogimiento de la torta y se consiguió la formación satisfactoria de la torta (los datos no se muestran). Si es fácil que la torta se mueva, puede colapsar debido al estrés físico durante el transporte o similares, lo que puede conducir al deterioro de la calidad. Por tanto, se demostró que los viales tratados con azufre y los viales tratados con VIST son mejores que los viales siliconados porque se logra la formación satisfactoria de la torta, además de suprimirse el empañamiento tras la liofilización.

35 Ejemplo 3: Evaluación de la puntuación de empañamiento y del movimiento de la torta (%) de productos liofilizados que contienen diferentes disoluciones de fármaco sellados en diversos viales con tratamiento de la superficie

40 Procedimiento

Muestras de ensayo: Se prepararon las disoluciones de proteínas enumeradas en la tabla 2.

Tabla 2

API ID	Formulación
mAb-A	ACE910 30 mg/ml, His 20 mM, Arg 150 mM, Asp 162 mM, Sac 150 mM, PX188 0,5 mg/ml
mAb-B	MRA 20 mg/ml, fosfato 14,3 mM, Sac 146 mM, PS80 0,5 mg/ml
mAb-C	CIM331 15 mg/ml, Tris/Tris-HCl 6 mM, Arg 45 mM, Sac 75 mM, PX188 0,15 mg/ml
Proteína-250	G-CSF 0,25 mg/ml, Arg 57 mM, Ph-Ala 61 mM, Met 7 mM, Man 137 mM, PS20 0,1 mg/ml

(continuación)

API ID	Formulación
Proteína-100	G-CSF 0,1 mg/ml , Arg 57 mM, Ph-Ala 61 mM, Met 7 mM, Man 137 mM, PS20 0,1 mg/ml
Proteína-50	G-CSF 0,05 mg/ml , Arg 57 mM, Ph-Ala 61 mM, Met 7 mM, Man 137 mM, PS20 0,1 mg/ml
Placebo (incl. tensioactivo, excl. mAb)	(Placebo) Tris/Tris-HCl 6 mM, Arg 45 mM, Sac 75 mM, PX188 0,15 mg/ml

- Vial: Como en el ejemplo 1, se utilizaron los viales enumerados en la tabla 3. Sin embargo, para los viales sin tratar (Normal) y los viales tratados con azufre (Azufre), también se usaron viales de 3 ml. Cada vial se utilizó tras una esterilización con calor seco a 250 °C durante 120 minutos.

Tabla 3

	Tamaño	Distribuidor
Normal (sin azufre)	3 ml, 10 ml	Murase Glass
Azufre (tratado con sulfato de amonio)	3 ml, 10 ml	Murase Glass
VIST (tratado con ácido cítrico)	10 ml	Daiwa Special Glass
TopLyo® (siliconado)	10 ml	Schott AG

- Procedimiento de evaluación: Se introdujeron aproximadamente 3 ml de una muestra de ensayo en un vial de 10 ml y se introdujeron aproximadamente 1 ml de una muestra de ensayo en un vial de 3 ml. Después de congelar a -45 °C, se llevó a cabo un secado primario con Triomaster II-A04 (fabricado por Kyowa Vacuum Engineering Co., Ltd.) a una temperatura cercana a la temperatura de colapso en condiciones de vacío, y se llevó a cabo un secado secundario a 30 °C en condiciones de vacío. A continuación, se evaluó el efecto antiempañamiento del vial de vidrio de la misma manera que en el ejemplo 1. Además, se calculó el movimiento de la torta (%) observando el movimiento de la torta cuando el vial se dio la vuelta y, a continuación, se evaluó el encogimiento de la torta (desorción del vial).

- Movimiento de la torta (%) = Número de muestras con movimiento de la torta/Número de muestras observada × 100

Resultado

Efecto antiempañamiento del vial de vidrio

- Los resultados se muestran en la tabla 4 y en las figuras 3 y 4.

Tabla 4

API	conc.	vol. de llenado	Recipientes principales	Puntuación de empañamiento			Movimiento de la torta tras el volteo		
				tamatio	Promedio	D.E.	N	movim. nro total	%
mAb A	30 mg/ml	3 ml	Normal (sin azufre)	10 ml	5,3	3,2	9	9	0
			Azufre		0,7	0,9	13	0	13
			VIST		0,0	0,0	8	0	8
			Siliconado (Toplyo®)		0,0	0,0	7	7	100
mAb-B	20 mg/ml	3 ml	Sin azufre	10 ml	9,0	3,8	9	6	46
			Azufre		0,6	0,8	13	6	46
			VIST		0,4	0,5	8	7	88
			Siliconado (Toplyo®)		0,0	0,0	7	7	100
mAb C	15 mg/ml	3 ml	Sin azufre	10 ml	7,8	5,3	6	4	67
			Azufre		0,8	0,9	16	4	25
			VIST		0,0	0,0	6	4	67
			Siliconado (Toplyo®)		0,0	0,0	6	6	100
Proteína-250	0,25 mg/ml	1 ml	Sin azufre	3 ml	17,6	2,2	5	5	100
			Azufre		0,0	0,0	5	5	100
			VIST		0,0	0,0	5	5	100
			Siliconado (Toplyo®)		0,0	0,0	5	5	100
Proteína-100	0,1 mg/ml	1 ml	Sin azufre	3 ml	18,4	2,2	5	5	100
			Azufre		0,0	0,0	3	3	100
			VIST		0,0	0,0	6	6	100
			Siliconado (Toplyo®)		0,0	0,0	6	6	100
Proteína-50	0,05 mg/ml	1 ml	Sin azufre	3 ml	18,0	2,2	6	6	100
			Azufre		0,0	0,0	4	4	100
			VIST		0,0	0,0	5	5	100
			Siliconado (Toplyo®)		0,0	0,0	6	6	100
Placebo	0 mg/ml	3 ml	Sin azufre	10 ml	9,7	3,8	6	4	67
			Azufre		0,7	1,0	12	4	12
			VIST		0,0	0,0	5	2	40
			Siliconado (Toplyo®)		2,0	0,8	4	4	100
mAB-A	30 mg/ml	1 ml	Sin azufre	3 ml	9,0	0,0	5	5	100
			Azufre		0,0	0,0	4	4	100
			VIST		5,0	4,6	3	3	100
			Siliconado (Toplyo®)		0,0	0,0	4	4	100
mAb-B	20 mg/ml	1 ml	Sin azufre	3 ml	9,0	0,0	5	5	100
			Azufre		0,0	0,0	4	4	100
			VIST		5,0	4,6	3	3	100
			Siliconado (Toplyo®)		0,0	0,0	4	4	100

Tal como se muestra en la tabla 4 y la figura 3, los viales tratados con azufre tuvieron una puntuación de empañamiento inferior a 2 en todas las muestras de ensayo, lo que indica que no se observó empañamiento. En cambio, los viales sin tratamiento tuvieron una puntuación de empañamiento de 2 o superior en todas las muestras de ensayo, lo que indica que se observó empañamiento.

Además, tal como se muestra en la tabla 4 y la figura 4, incluso en los viales tratados con VIST y los viales siliconados, los productos liofilizados con diferentes disoluciones de anticuerpos sellados tuvieron una puntuación de empañamiento inferior a 2 en todas las muestras de ensayo, lo que indica que no se observó empañamiento.

Encogimiento de la torta (tablas 4 y 5)

Los resultados se muestran en las tablas 4 y 5.

15 Tabla 5: Movimiento de la torta (%) cuando los productos liofilizados que contienen disoluciones de fármaco de anticuerpo sellados en viales de 10 ml sin tratar y diversos viales de 10 ml con tratamiento de la superficie se voltearon.

API	Vial	Movimiento de la torta con volteo
mAb-A	Azufre	0/13 (0 %)
	VIST	0/8 (0 %)
	Siliconado	7/7 (100 %)
mAb-B	Azufre	6/13 (46 %)
	VIST	7/8 (88 %)
	Siliconado	7/7 (100 %)
mAb-C	Azufre	4/16 (25 %)
	VIST	4/6 (67 %)
	Siliconado	6/6 (100 %)
Placebo (soluc. de tensioactivo)	Azufre	4/12 (33 %)
	VIST	2/5 (40 %)

En los viales siliconados, se produjo el movimiento de la torta en todos los viales en todas las muestras de ensayo (movimiento de la torta (%): 100 %). En cambio, los viales tratados con VIST presentaron menor movimiento de la torta (%) en todas las muestras de ensayo en comparación con los viales siliconados, y los viales tratados con azufre

5 presentaron un movimiento aún menor de la torta (%) que los viales tratados con VIST. Por tanto, se demostró que los viales tratados con azufre y los viales tratados con VIST causan menos encogimiento de la torta que los viales siliconados.

Aplicabilidad industrial

10 De acuerdo con la presente invención, en la formulación liofilizada se evita el empañamiento de la superficie interior de un recipiente de vidrio y el colapso de la torta, de modo que puede proporcionarse un producto de aspecto y calidad excelentes. Además, se evita el empañamiento de la superficie interior de un recipiente de vidrio, reduciendo de ese modo la detección errónea en un dispositivo de inspección automática y pudiendo llevar a cabo un proceso

15 de control de la calidad más eficiente de la formulación liofilizada.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación liofilizada que comprende un agente terapéutico y un tensioactivo sellada en un recipiente de vidrio, en donde una superficie interior del recipiente de vidrio está tratada con azufre o está tratada con VIST, y
- 5 en donde el agente terapéutico es uno cualquiera de un anticuerpo humanizado contra el receptor de interleucina 6 (IL-6), un anticuerpo humanizado biespecífico contra el factor IX y el factor X, y un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor A de IL-31.
- 10 2. La formulación según la reivindicación 1, destinada a reconstituirse en un disolvente, de modo que la concentración del agente terapéutico en la disolución reconstituida varía de 0,01 a 300 mg/ml.
- 15 3. La formulación según la reivindicación 1 o 2, en donde el tensioactivo es un tensioactivo no iónico.
- 20 4. La formulación según la reivindicación 3, en donde el tensioactivo no iónico es un éster de ácido graso de sorbitán polioxietileno o un copolímero de polioxietileno y poloxipropileno.
- 25 5. La formulación según la reivindicación 3 o 4, destinada a reconstituirse en un disolvente, de modo que la concentración del tensioactivo no iónico en la disolución reconstituida varía del 0,001 % al 1 % (p/v).
- 30 6. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, destinada a reconstituirse de modo que la disolución reconstituida comprende:
- un agente terapéutico de 0,01 a 300 mg/ml;
- 35 un agente tamponante de 0 a 100 mM;
- un tensioactivo del 0,001 % al 1 % (p/v); y
- 40 un agente estabilizante de 1 a 500 mM y/o un regulador de la tonicidad de 5 a 500 mM.
- 45 7. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde una disolución previa a la liofilización comprende:
- un agente terapéutico de 0,01 a 300 mg/ml;
- 50 un agente tamponante de 0 a 100 mM;
- un tensioactivo del 0,001 % al 1 % (p/v); y
- 55 un agente estabilizante de 1 a 500 mM y/o un regulador de la tonicidad de 5 a 500 mM.
- 60 8. La formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el recipiente de vidrio es un vial o una jeringuilla precargada.
- 45 9. Un kit que comprende la formulación según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el kit comprende además un disolvente para la redisolución; o
- en donde el kit comprende además instrucciones y/o un prospecto para indicar la redisolución en un disolvente.
- 50 10. Un procedimiento para producir una formulación liofilizada o un procedimiento para evitar o reducir el empañamiento de un recipiente de vidrio para una formulación liofilizada, comprendiendo dicho procedimiento:
- (a) proporcionar un recipiente de vidrio con una superficie interior tratada con azufre o tratada con VIST;
- 55 (b) introducir una disolución previa a la liofilización que contiene un agente terapéutico y un tensioactivo en el recipiente de vidrio; en donde el agente terapéutico es uno cualquiera de un anticuerpo humanizado contra el receptor de interleucina 6 (IL-6), un anticuerpo humanizado biespecífico contra el factor IX y el factor X, y un anticuerpo monoclonal humanizado contra el receptor A de IL-31; y
- 60 (c) llevar a cabo la liofilización.
- 65 11. El uso de un recipiente de vidrio con una superficie interior tratada con azufre o tratada con VIST con el fin de evitar o reducir el empañamiento del vidrio tras la liofilización cuando se produce la formulación liofilizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 .

Figura 1

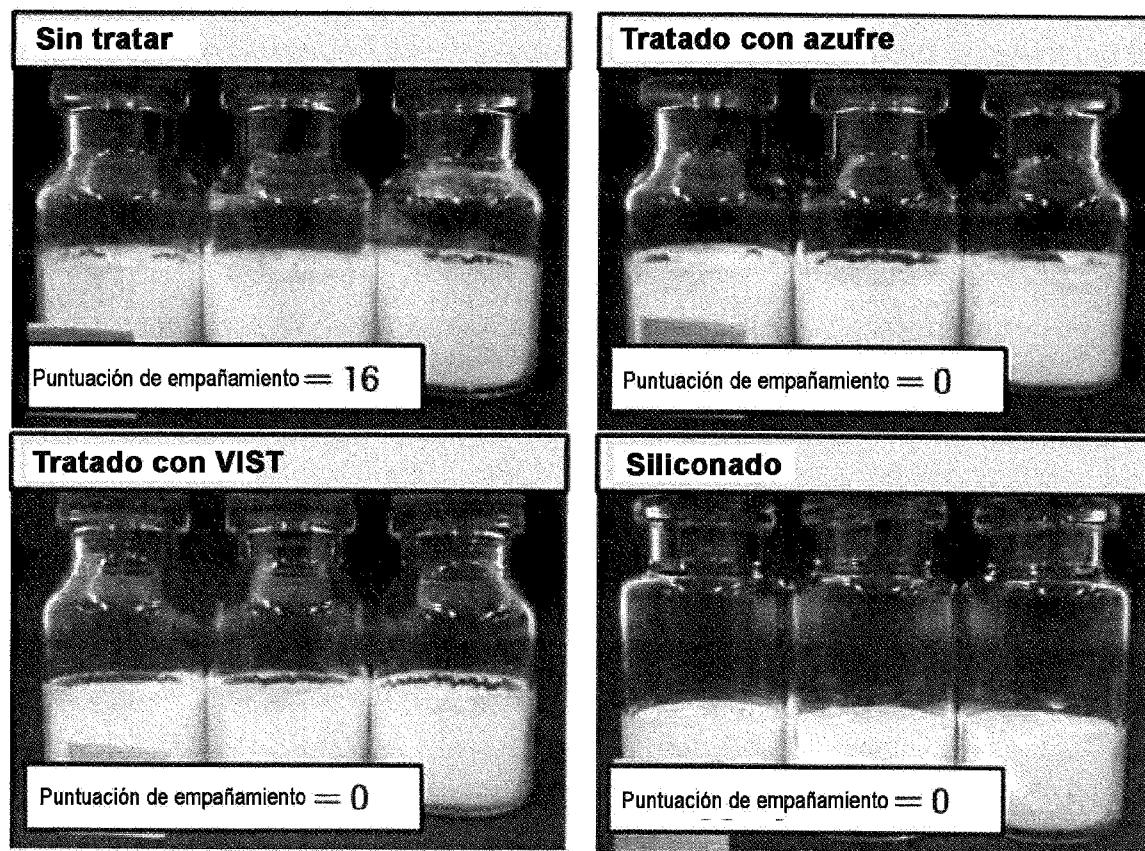


Figura 2

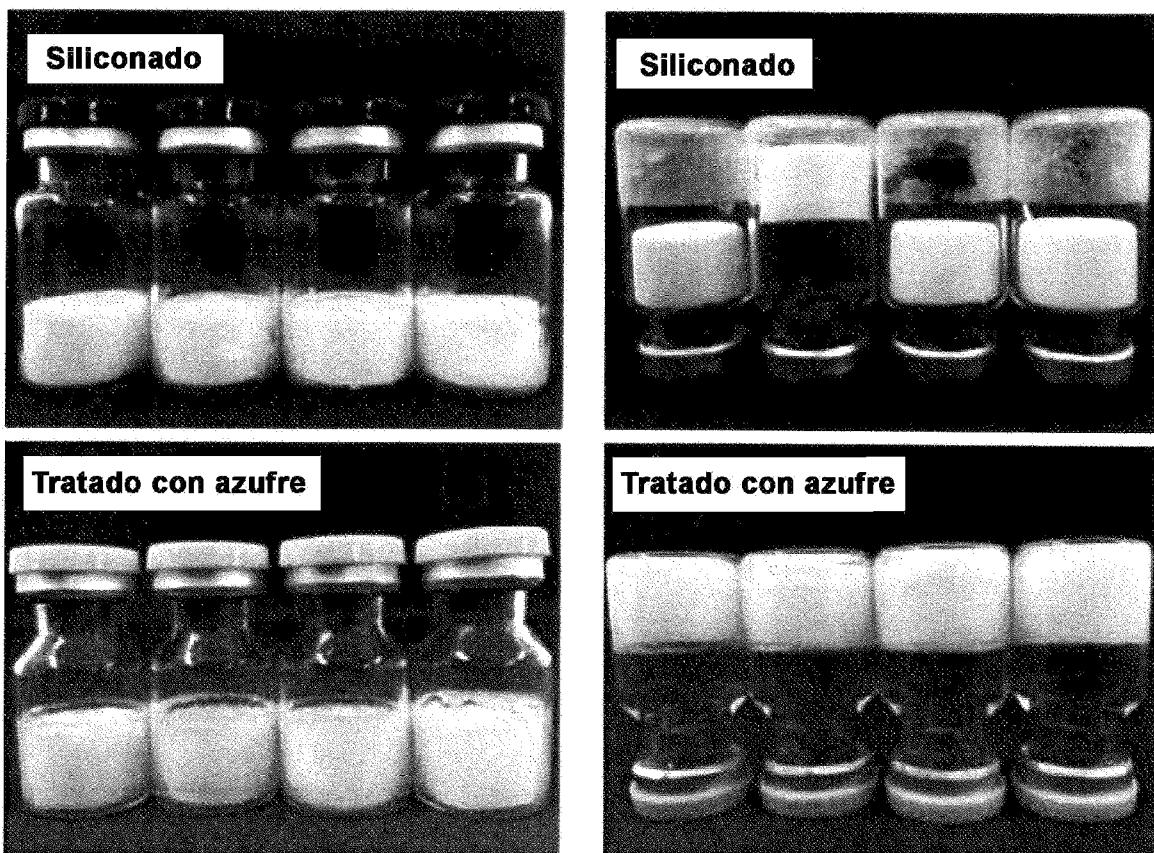
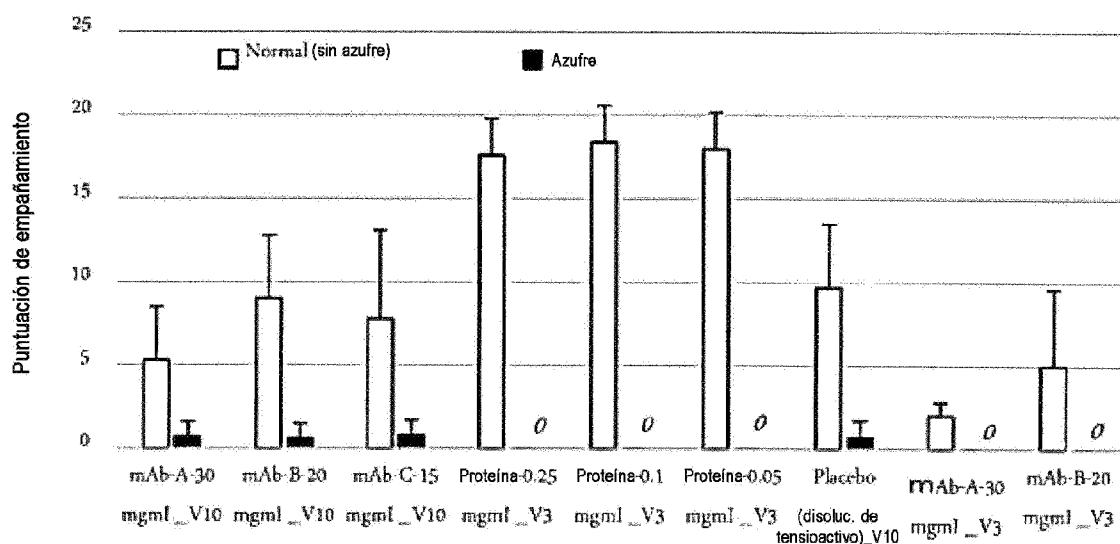


Figura 3**Figura 4**