

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 387 616**

51 Int. Cl.:
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 9/19 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **03748439 .1**
96 Fecha de presentación: **15.08.2003**
97 Número de publicación de la solicitud: **1528933**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **11.05.2005**

54 Título: **Formulación farmacéutica de anticuerpos anti-TNF-alfa**

30 Prioridad:
16.08.2002 US 222140

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
27.09.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
27.09.2012

73 Titular/es:
**ABBOTT BIOTECHNOLOGY LTD.
CLARENDON HOUSE, 2 CHURCH STREET
HM 11 HAMILTON, BM**

72 Inventor/es:
**KRAUSE, Hans-Juergen;
BAUST, Lisa y
DICKES, Michael**

74 Agente/Representante:
Carvajal y Urquijo, Isabel

ES 2 387 616 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 farmacéutica de anticuerpos anti-TNF-alfa

Antecedentes de la invención

5 El factor de necrosis tumoral α (TNF α) es una citocina producida por numerosos tipos de células, incluyendo monocitos y macrófagos, que se identificó originalmente basándose en su capacidad de inducir la necrosis de determinados tumores en ratón (véase por ejemplo, Old, L. (1985) *Science* 230:630-632). Posteriormente, se demostró que un factor denominado caquectina, asociado con caquexia, era la misma molécula que TNF α . Se ha implicado a TNF α en la mediación del choque (véase por ejemplo, Beutler, B. y Cerami, A. (1988) *Annu. Rev. Biochem.* 57:505-518; Beutler, B. y Cerami, A. (1989) *Annu. Rev. Immunol.* 7:625-655). Además, se ha implicado a

10 TNF α en la fisiopatología de una variedad de otras enfermedades y trastornos humanos, incluyendo septicemia, infecciones, enfermedades autoinmunitarias, rechazo de trasplantes y enfermedad de injerto contra huésped (véase por ejemplo, Moeller, A., *et al.* (1990) *Cytokine* 2:162-169; patente estadounidense n.º 5.231.024 de Moeller *et al.*; publicación de patente europea n.º 260 610 B1 de Moeller, A., *et al.* Vasilli, P. (1992) *Annu. Rev. Immunol.* 10:411-452; Tracey, K.J. y Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45:491-503).

15 Debido al papel perjudicial del TNF α humano (hTNF α) en una variedad de trastornos humanos, se han diseñado estrategias terapéuticas para inhibir o contrarrestar la actividad de hTNF α . En particular, se han buscado anticuerpos que se unan a y neutralicen hTNF α como medio para inhibir la actividad de hTNF α . Algunos de los más tempranos de tales anticuerpos eran anticuerpos monoclonales de ratón (AcM), secretados por hibridomas preparados a partir de linfocitos de ratones inmunizados con hTNF α (véase por ejemplo, Hahn T; *et al.*, (1985) *Proc Natl Acad Sci USA* 82: 3814-3818; Liang, C-M., *et al.* (1986) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 137:847-854; Hirai, M., *et al.* (1987) *J. Immunol. Methods* 96:57-62; Fendly, B.M., *et al.* (1987) *Hybridoma* 6:359-370; Moeller, A., *et al.* (1990) *Cytokine* 2:162-169; patente estadounidense n.º 5.231.024 concedida a Moeller *et al.*; publicación de patente europea n.º 186 833 B1 por Wallach, D.; publicación de solicitud de patente europea n.º 218 868 A1 por Old *et al.*; publicación de patente europea n.º 260 610 B1 por Moeller, A., *et al.*). Aunque estos anticuerpos anti-hTNF α de ratón presentaban a menudo alta afinidad por hTNF α (por ejemplo, Kd $\leq 10^{-9}$ M) y podían neutralizar la actividad de hTNF α , su uso *in vivo* puede estar limitado por problemas asociados con la administración de anticuerpos de ratón a seres humanos, tales como semivida sérica corta, una incapacidad para desencadenar determinadas funciones efectoras humanas y la generación de una respuesta inmunitaria no deseada contra el anticuerpo de ratón en un ser humano (la reacción "anti-anticuerpo de ratón humana" (HAMA)).

30 En un intento de superar los problemas asociados con el uso de anticuerpos totalmente murinos en seres humanos, se han modificado por ingeniería genética anticuerpos anti-hTNF α murinos para que sean más "de tipo humano". Por ejemplo, se han preparado anticuerpos quiméricos, en los que las regiones variables de las cadenas de anticuerpos se derivan de ratón y las regiones constantes de las cadenas de anticuerpos se derivan de ser humano, (Knight, D.M., *et al.* (1993) *Mol. Immunol.* 30:1443-1453; publicación PCT n.º WO 92/16553 por Daddona, P.E., *et al.*). Adicionalmente, también se han preparado anticuerpos humanizados, en los que los dominios hipervariables de las regiones variables de anticuerpos se derivan de ratón pero el resto de las regiones variables y las regiones constantes de anticuerpos se derivan de ser humano (publicación PCT n.º WO 92/11383 por Adair, J.R., *et al.*). Sin embargo, debido a que estos anticuerpos humanizados y quiméricos todavía conservan algunas secuencias murinas, todavía pueden provocar una reacción inmunitaria no deseada, la reacción anti-anticuerpo quimérico humana (HACA), especialmente cuando se administra durante periodos prolongados, por ejemplo, para indicaciones crónicas, tales como artritis reumatoide (véase por ejemplo, Elliott, M.J., *et al.* (1994) *Lancet* 344:1125-1127; Elliot, M.J., *et al.* (1994) *Lancet* 344:1105-1110).

45 Un agente inhibidor de hTNF α preferido para AcM murinos o derivados de los mismos (por ejemplo, anticuerpos humanizados o quiméricos) podría ser un anticuerpo anti-hTNF α completamente humano, ya que un agente de ese tipo no debe provocar la reacción HAMA, incluso si se usa durante periodos prolongados. Se han preparado autoanticuerpos monoclonales humanos contra hTNF α usando técnicas de hibridoma humano (Boyle, P., *et al.* (1993) *Cell. Immunol.* 152:556-568; Boyle, P., *et al.* (1993) *Cell. Immunol.* 152: 569-581; publicación de solicitud de patente europea n.º 614 984 A2 por Boyle, *et al.*). Sin embargo, se notificó que estos autoanticuerpos monoclonales derivados de hibridoma tenían una afinidad por hTNF α que era demasiado baja como para calcularse mediante métodos convencionales, no podían unirse a hTNF α soluble y no podían neutralizar la citotoxicidad inducida por hTNF α (véase Boyle, *et al.*; citado anteriormente). Además, el éxito de la técnica de hibridoma humano depende de la presencia natural en la sangre periférica humana de linfocitos que producen autoanticuerpos específicos para hTNF α . Determinados estudios han detectado autoanticuerpos séricos contra hTNF α en sujetos humanos (Fomsgaard, A., *et al.* (1989) *Scand. J. Immunol.* 30:219-223; Bendtzen, K., *et al.* (1990) *Prog. Leukocyte Biol.* 10B:447-452), mientras que otros no (Leusch, H-G., *et al.* (1991) *J. Immunol. Methods* 139:145-147).

Una alternativa a los anticuerpos anti-hTNF α humanos que se producen de manera natural sería un anticuerpo

frente a hTNF α recombinante. Se han descrito anticuerpos humanos recombinantes que se unen a hTNF α con afinidad relativamente baja (es decir, $K_d \sim 10^{-7}$ M) y una velocidad de disociación rápida (es decir, $K_{\text{disociación}} \sim 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) (Griffiths, A.D., *et al.* (1993) EMBO J. 12:725-734). Sin embargo, debido a su cinética de disociación relativamente rápida, estos anticuerpos pueden no ser adecuados para uso terapéutico. Adicionalmente, se ha descrito un anticuerpo anti-hTNF α humano recombinante no neutraliza la actividad de hTNF α , sino que más bien potencia la unión de hTNF α a la superficie de células y potencia la internalización de hTNF α (Lidbury, A., *et al.* (1994) Biotechnol. Ther. 5:27-45; publicación PCT n.º WO 92/03145 por Aston, R. *et al.*)

También se han descrito anticuerpos humanos recombinantes que se unen a hTNF α soluble con afinidad alta y cinética de disociación lenta y que tienen la capacidad de neutralizar la actividad de hTNF α , incluyendo citotoxicidad inducida por hTNF α (*in vitro* e *in vivo*) y activación celular inducida por hTNF α (véase la patente estadounidense n.º 6.090.382).

Sumario de la invención

El alcance de la presente invención se define mediante las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona sólo para información. Hay una necesidad de una formulación farmacéutica acuosa estable con una vida útil prolongada, que comprenda un anticuerpo que es adecuado para uso terapéutico para inhibir o contrarrestar la actividad de hTNF α perjudicial. También hay una necesidad de una formulación farmacéutica acuosa estable con una vida útil prolongada, que comprenda un anticuerpo adecuado para uso terapéutico que se administre fácilmente y contenga una alta concentración de proteína.

En particular, la invención proporciona una formulación farmacéutica acuosa líquida que tiene un pH de 4 a 8 y que comprende

(a) de 20 a 130 mg/ml de un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) IgG 1 humano que comprende una región variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2,

(b) 10-14 mg/ml de manitol,

(c) 0,1-5 mg/ml de polisorbato 80,

(d) 1-1,5 mg/ml de ácido cítrico monohidratado,

(e) 0,25-0,5 mg/ml de citrato de sodio,

(f) 1,25-1,75 mg/ml de fosfato de disodio dihidratado,

(g) 0,7-1,1 mg/ml de dihidrogenofosfato de sodio dihidratado, y

(h) 6,0-6,4 mg/ml de cloruro de sodio.

Esta invención también proporciona una formulación farmacéutica acuosa líquida que consiste en una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo en una disolución tamponada tal como se define en las reivindicaciones y que tiene una vida útil de al menos 18 meses. La invención también incluye una formulación farmacéutica acuosa que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo en una disolución tamponada tal como se define en las reivindicaciones y que tiene una vida útil de al menos 18 meses en estado líquido. En una realización adicional, la formulación de la invención es estable tras al menos 3 ciclos de congelación/descongelación de la formulación. Todavía en otra realización, el anticuerpo es D2E7.

Esta invención también proporciona una formulación farmacéutica acuosa líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo en una disolución tamponada tal como se define en las reivindicaciones y que tiene estabilidad potenciada de al menos 12 meses a una temperatura de 2 - 8°C. En una realización, la formulación tiene estabilidad potenciada de al menos 18 meses. En una realización adicional, el anticuerpo es D2E7.

La invención proporciona además una formulación farmacéutica acuosa líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo en una disolución tamponada tal como se define en las reivindicaciones que puede administrarse fácilmente. En una realización adicional, el anticuerpo es D2E7.

En una realización de la invención, la formulación farmacéutica acuosa líquida es adecuada para inyección. En una realización adicional, la formulación es adecuada para inyección s.c. de uso único. Aún en otra realización, la

concentración del anticuerpo en la formulación es de aproximadamente 50 mg/ml. Todavía en otra realización, la formulación tiene una alta concentración de proteína. Aún en otra realización de la invención, la formulación no es sensible a la luz.

5 En una realización de la invención, la formulación farmacéutica acuosa líquida tal como se define en las reivindicaciones contiene un anticuerpo, que se disocia de TNF α humano con una K_d de 1×10^{-8} M o menos y una constante de velocidad $K_{\text{disociación}}$ de 1×10^{-3} s $^{-1}$ o menos, ambas determinadas mediante resonancia de plasmón superficial, y neutraliza la citotoxicidad de TNF α humano en un ensayo de L929 *in vitro* convencional con una CI_{50} de 1×10^{-7} M o menos. En otra realización, la formulación de la invención contiene un anticuerpo, que se disocia de TNF α humano con una constante de velocidad $K_{\text{disociación}}$ de 5×10^{-4} s $^{-1}$ o menos. En una realización adicional, la formulación contiene un anticuerpo, que se disocia de TNF α humano con una constante de velocidad $K_{\text{disociación}}$ de 1×10^{-4} s $^{-1}$ o menos. Todavía en una realización adicional, la formulación de la invención contiene un anticuerpo, que neutraliza la citotoxicidad de TNF α humano en un ensayo de L929 *in vitro* convencional con una CI_{50} de 1×10^{-8} M o menos. Aún en otra realización de la invención, la formulación reivindicada incluye un anticuerpo, que neutraliza la citotoxicidad de TNF α humano en un ensayo de L929 *in vitro* convencional con una CI_{50} de 1×10^{-9} M o menos. Otra realización de la invención incluye una formulación en la que el anticuerpo neutraliza la citotoxicidad de TNF α humano en un ensayo de L929 *in vitro* convencional con una CI_{50} de 1×10^{-10} M o menos.

En otra realización de la invención, la formulación farmacéutica acuosa líquida contiene un anticuerpo, que es un anticuerpo recombinante. En otra realización, la formulación contiene un anticuerpo, que inhibe la expresión inducida por TNF α humano de ELAM-1 en células endoteliales de vena umbilical humana. Todavía en otra realización, la formulación reivindicada incluye el anticuerpo D2E7.

El anticuerpo contenido en la formulación reivindicada tiene un dominio CDR3 de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y tiene un dominio CDR3 de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Todavía en otra realización, el anticuerpo de la formulación neutraliza la actividad de TNF α humano, TNF α de chimpancé y al menos un TNF α de primate adicional seleccionado del grupo que consiste en TNF α de babuino, TNF α de tití, TNF α de mono cynomolgus y TNF α de mono rhesus. En una realización adicional, la formulación de la invención incluye un anticuerpo, que también neutraliza la actividad de TNF α de ratón. La formulación de la invención también incluye un anticuerpo, que neutraliza la actividad de TNF α de cerdo. En una realización, el pH de la formulación está entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,0. En otra realización, el pH está entre aproximadamente 4,8 y aproximadamente 5,5. Aún en otra realización, el pH de la invención está entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 5,2.

En una realización de la invención, la formulación farmacéutica acuosa líquida incluye aproximadamente 1,305 mg/ml de ácido cítrico, aproximadamente 0,305 mg/ml de citrato de sodio, aproximadamente 1,53 mg/ml de fosfato de disodio dihidratado, aproximadamente 0,86 mg/ml de dihidrogenofosfato de sodio dihidratado y aproximadamente 6,165 mg/ml de cloruro de sodio. Aún en otra realización, la formulación de la invención incluye el anticuerpo D2E7. Aún en una realización adicional, la formulación de la invención puede administrarse a un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de TNF α es perjudicial de modo que se inhibe la actividad de TNF α en el sujeto.

Descripción detallada de la invención

El alcance de la presente invención se define por las reivindicaciones y cualquier información que no se encuentre dentro de las reivindicaciones se proporciona sólo para información. Esta invención se refiere a una formulación farmacéutica acuosa líquida tal como se define en las reivindicaciones con un pH de aproximadamente 4 a aproximadamente 8 que contiene una alta concentración de proteína, incluyendo un anticuerpo, y tiene estabilidad potenciada. Esta invención también se refiere a una formulación farmacéutica acuosa líquida para uso terapéutico en un sujeto que padece un estado caracterizado por actividad de TNF α perjudicial. La formulación de la invención comprende los siguientes constituyentes: un anticuerpo que se une a TNF α humano con alta afinidad, una baja constante de disociación y una alta capacidad de neutralización; un tampón, que incluye ácido cítrico, citrato de sodio, fosfato de disodio dihidratado y dihidrogenofosfato de sodio dihidratado; agentes de tonicidad, que incluyen manitol y cloruro de sodio; un detergente, incluyendo polisorbato 80; e hidróxido de sodio, para el ajuste del pH.

Definiciones

50 Con el fin de que la presente invención pueda entenderse más fácilmente, en primer lugar se definen determinados términos.

El término "sujeto" pretende incluir organismos vivos, por ejemplo, procariotas y eucariotas. Los ejemplos de sujetos incluyen mamíferos, por ejemplo, seres humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales no humanos transgénicos. En realizaciones específicas de la invención, el sujeto es un ser

humano.

El término “formulación farmacéutica” se refiere a preparaciones que están en tal forma que permiten que la actividad biológica de los principios activos sea inequívocamente eficaz, y que no contienen componentes adicionales que sean significativamente tóxicos para los sujetos a los que se administraría la formulación.

5 Excipientes (vehículos, aditivos) “farmacéuticamente aceptables” son aquéllos que pueden administrarse razonablemente a un sujeto mamífero para proporcionar una dosis eficaz del principio activo empleado.

Una formulación “estable” es una en la que el anticuerpo en la misma conserva esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras el almacenamiento. Diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de proteínas están disponibles en la técnica y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991) y Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. Preferiblemente, la formulación es estable a temperatura ambiente (aproximadamente 30°C) o a 40°C durante al menos 1 mes y/o estable a aproximadamente 2-8°C durante al menos 1 año durante al menos 2 años. Además, la formulación es preferiblemente estable tras la congelación (hasta, por ejemplo, -70°C) y la descongelación de la formulación, denominado a continuación en el presente documento “ciclo de congelación/descongelación”.

Un anticuerpo “conserva su estabilidad física” en una formulación farmacéutica si no muestra sustancialmente signos de agregación, precipitación y/o desnaturalización tras el examen visual del color y/o la claridad, o tal como se mide mediante dispersión de luz UV o mediante cromatografía de exclusión molecular.

20 Un anticuerpo “conserva su estabilidad química” en una formulación farmacéutica si la estabilidad química en un momento dado es tal que se considera que el anticuerpo conserva todavía su actividad biológica tal como se define a continuación. La estabilidad química puede evaluarse detectando y cuantificando formas químicamente alteradas del anticuerpo. La alteración química puede implicar modificación del tamaño (por ejemplo recorte) que puede evaluarse usando cromatografía de exclusión molecular, SDS-PAGE y/o espectrometría de masas por desorción/ionización mediante láser asistida por matriz - tiempo de vuelo (EM MALDI/TOF), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen alteración de carga (por ejemplo que se produce como resultado de desamidación) que puede evaluarse mediante cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo.

30 Un anticuerpo “conserva su actividad biológica” en una formulación farmacéutica si el anticuerpo en una formulación farmacéutica es biológicamente activo para su fin previsto. Por ejemplo, se conserva la actividad biológica si la actividad biológica del anticuerpo en la formulación farmacéutica está dentro de aproximadamente el 30%, aproximadamente el 20% o aproximadamente el 10% (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica presentada en el momento en el que se preparó la formulación farmacéutica (por ejemplo, tal como se determina en un ensayo de unión a antígeno).

35 “Isotónico” es un término reconocido en la técnica. Isotónico puede significar, por ejemplo, que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tendrán una presión osmótica de desde aproximadamente 250 hasta 350 mOsm. La isotonicidad puede medirse usando un osmómetro de presión de vapor o de tipo crioscópico, por ejemplo. Un “agente de tonicidad” es un compuesto que hace que la formulación sea isotónica.

40 Un “poliol” es una sustancia con múltiples grupos hidroxilo, e incluye azúcares (azúcares reductores y no reductores), alcoholes de azúcar y ácidos de azúcar. Los polioles preferidos en el presente documento tienen un peso molecular que es inferior a aproximadamente 600 kD (por ejemplo en el intervalo de desde aproximadamente 120 hasta aproximadamente 400 kD). Un “azúcar reductor” es uno que contiene un grupo hemiacetal que puede reducir iones metálicos o reaccionar de manera covalente con lisina y otros grupos amino en proteínas y un “azúcar no reductor” es uno que no tiene estas propiedades de un azúcar reductor. Los ejemplos de azúcares reductores son fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa. Los azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, melecitosa y rafinosa. Manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol son ejemplos de alcoholes de azúcar. En cuanto a ácidos de azúcar, estos incluyen L-gluconato y sales metálicas del mismo. Cuando se desea que la formulación sea estable en congelación-descongelación, el poliol es preferiblemente uno que no cristaliza a temperaturas de congelación (por ejemplo -20°C) de modo que desestabilice el anticuerpo en la formulación. El poliol también puede actuar como agente de tonicidad. En la invención, un componente de la formulación es manitol en una concentración de 10-14 mg/ml.

55 Tal como se usa en el presente documento, “tampón” se refiere a una disolución tamponada que resiste cambios en el pH mediante la acción de sus componentes de conjugado ácido-base. El tampón de esta invención tiene un pH en el intervalo de desde 4 hasta 8; preferiblemente desde aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 7; y lo más preferiblemente tiene un pH en el intervalo de desde aproximadamente 5,0 hasta aproximadamente 6,5.

En un sentido farmacológico, en el contexto de la presente invención, una “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” de un anticuerpo se refiere a una cantidad eficaz en la prevención o el tratamiento de un trastorno para el tratamiento del cual el anticuerpo es eficaz. Un “trastorno” es cualquier estado que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo. Esto incluye enfermedades o trastornos crónicos o agudos incluyendo los estados patológicos que predisponen el sujeto al trastorno en cuestión.

Un “conservante” es un compuesto que puede incluirse en la formulación para reducir esencialmente la acción bacteriana en la misma, facilitando así la producción de una formulación multiuso, por ejemplo. Los ejemplos de posibles conservantes incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en la que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquilparabenos tales como metil o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol.

“Tratamiento” se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los que necesitan tratamiento incluyen aquéllos ya con el trastorno así como aquéllos en los que el trastorno va a prevenirse.

Las expresiones “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral” tal como se usan en el presente documento significan modos de administración distintos de administración entérica y tópica, habitualmente mediante inyección, e incluyen, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal e intraesternal.

Las expresiones “administración sistémica”, “administrado de manera sistémica”, “administración periférica” y “administrado de manera periférica” tal como se usan en el presente documento significa la administración de un compuesto, fármaco u otro material que no sea directamente en el sistema nervioso central, de modo que entra en el sistema del paciente y, por tanto, se somete a metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

La frase “portador farmacéuticamente aceptable” se reconoce en la técnica e incluye un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, adecuado para su administración a mamíferos. Los portadores incluyen carga sólida o líquida, diluyente, excipiente, disolvente o material de encapsulación, implicado en llevar o transportar el agente de interés desde un órgano o parte del cuerpo hasta otro órgano o parte del cuerpo. Cada portador debe ser “aceptable” en el sentido de ser compatible con los demás componentes de la formulación y no perjudicial para el paciente.

El término “TNF α humano” (abreviado en el presente documento como hTNF α , o simplemente hTNF), tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a una citocina humana que existe como una forma secretada de 17 kD y una forma asociada a membrana de 26 kD, cuya forma biológicamente activa está compuesta por un trímero de moléculas de 17 kD unidas no covalentemente. La estructura de hTNF α se describe adicionalmente en, por ejemplo, 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. El término TNF α humano pretende incluir TNF α humano recombinante (rhTNF α), que puede prepararse mediante métodos de expresión recombinante convencionales o adquirirse comercialmente (R & D Systems, n.º de catálogo 210-TA, Minneapolis, MN).

El término “anticuerpo”, tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a moléculas de inmunoglobulina compuestas por cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada está compuesta por tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse además en regiones de hipervariabilidad, denominada regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal hasta el carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. La formulación de la descripción contiene un anticuerpo con secuencias de CDR1, CDR2 y CDR3 similares a las descritas en las patentes estadounidenses n.ºs 6.090.382 y 6.258.562.

El término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “parte de anticuerpo”), tal como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hTNF α). Se ha mostrado que la función de unión a antígeno de un anticuerpo pueden realizarla fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término “parte de unión a antígeno” de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un

fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de una ramificación única de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward *et al.*, (1989) Nature 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, se codifican por genes separados, pueden unirse, usando métodos recombinantes, por un ligador sintético que permite que se produzcan como una única cadena de proteína en la que el par de regiones VL y VH forman moléculas monovalentes (conocido como Fv de cadena sencilla (scFv); véanse por ejemplo, Bird *et al.* (1988) Science 242:423-426; y Huston *et al.* (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Tales anticuerpos de cadena sencilla también pretenden abarcarse dentro del término "parte de unión a antígeno" de un anticuerpo. También se abarcan otras formas de anticuerpos de cadena sencilla, tales como diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes, biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan sobre una única cadena polipeptídica, pero usando un ligador que es demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios sobre la misma cadena, forzando de ese modo a los dominios a aparearse con dominios de complementariedad de otra cadena y creando dos sitios de unión a antígeno (véase por ejemplo, Holliger, P., *et al.* (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., *et al.* (1994) Structure 2:1121-1123).

Además, pueden obtenerse anticuerpos, partes de anticuerpos y moléculas de inmunoadhesión usando técnicas de ADN recombinante convencionales, tal como se describe en el presente documento.

El término "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos pueden incluir residuos de aminoácido no codificados por secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis específica de sitio o al azar *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", tal como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, sobre secuencias de entramado humanas.

El término "anticuerpo humano recombinante", tal como se usa en el presente documento, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped (descrito adicionalmente en la sección II, a continuación), anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria, recombinante (descrito adicionalmente en la sección III, a continuación), anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humanos (véase por ejemplo, Taylor, L.D., *et al.* (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique corte y empalme de secuencias génicas de inmunoglobulinas humanas a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. En determinados aspectos, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un animal transgénico para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones VH y VL de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivadas de y relacionadas con secuencias de VH y VL de línea germinal humana, no pueden existir de manera natural dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

Un "anticuerpo aislado", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hTNF α está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos de hTNF α). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hTNF α , sin embargo, puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de TNF α de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o productos químicos.

Un "anticuerpo neutralizante", tal como se usa en el presente documento (o un "anticuerpo que neutraliza la actividad de hTNF α "), pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a hTNF α da como resultado la inhibición de la actividad biológica de hTNF α . Esta inhibición de la actividad biológica de hTNF α puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de actividad biológica de hTNF α , tales como citotoxicidad inducida por hTNF α (o bien *in vitro* o bien *in vivo*), activación celular inducida por hTNF α y unión de hTNF α a receptores de hTNF α . Estos indicadores de la actividad biológica de hTNF α pueden evaluarse mediante uno o más de varios ensayos *in vitro* o *in vivo* convencionales conocidos en la técnica, y descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 6.090.382 y 6.258.562, cada una incorporada como referencia en el presente documento. Preferiblemente, la capacidad de un anticuerpo para neutralizar la actividad de hTNF α se evalúa mediante la inhibición de citotoxicidad inducida por hTNF α de células L929. Como parámetro adicional o alternativo de la actividad de hTNF α , puede evaluarse la capacidad de un anticuerpo para inhibir la expresión de ELAM-1 inducida por hTNF α sobre HUVEC, como medida de la activación celular inducida por hTNF α .

El término "resonancia de plasmón superficial", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en concentraciones de proteína dentro de una matriz de biosensor, por ejemplo usando el sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, NJ). Para descripciones adicionales, véase Jönsson, U., *et al.* (1993) *Ann. Biol. Clin.* 51:19-26; Jönsson, U., *et al.* (1991) *Biotechniques* 11:620-627; Johnsson, B., *et al.* (1995) *J. Mol. Recognit.* 8:125-131; y Johnsson, B., *et al.* (1991) *Anal. Biochem.* 198:268-277.

El término " $K_{\text{disociación}}$ ", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de velocidad de disociación para la disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

El término " K_d ", tal como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular.

II. Anticuerpos de la formulación

La invención se refiere a una formulación farmacéutica acuosa líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo en una disolución tamponada tal como se define en las reivindicaciones y que tiene una vida útil prolongada, preferiblemente de al menos aproximadamente 18 meses. En otra realización, la formulación farmacéutica acuosa líquida de la invención tiene estabilidad potenciada. En una realización adicional de la invención, la formulación no es sensible a la luz. Aún en otra realización de la invención, la formulación reivindicada sigue siendo estable tras al menos 3 ciclos de congelación/descongelación. Todavía en otra realización, la formulación farmacéutica de la invención es adecuada para inyección s.c. de uso único.

Los anticuerpos que pueden usarse en la formulación incluyen anticuerpos monoclonales y recombinantes. Anticuerpos preferidos usados en la formulación son anticuerpos humanos que se clonan a partir de células humanas o de archivos de genes que representan el reservorio de anticuerpos humanos.

En un aspecto de la descripción, la formulación tal como se define en las reivindicaciones contiene un anticuerpo, que se disocia de TNF γ humano con una K_d de 1×10^{-8} M o menos y una constante de velocidad de $K_{\text{disociación}}$ de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, ambas determinadas por resonancia de plasmón superficial, y neutraliza la citotoxicidad de TNF α humano en un ensayo de L929 *in vitro* convencional con una CI_{50} de 1×10^{-7} M o menos. En otro aspecto, la formulación de la descripción contiene un anticuerpo, como los descritos en las patentes estadounidenses n.ºs 6.090.382 y 6.258.562.

En un aspecto, la formulación de la invención contiene anticuerpos D2E7. En otro aspecto, la formulación de la descripción contiene un anticuerpo humano aislado, o una parte de unión a antígeno del mismo, que se disocia de TNF α humano con una K_d de 1×10^{-8} M o menos y una constante de velocidad de $K_{\text{disociación}}$ de $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ o menos, ambas determinadas por resonancia de plasmón superficial, y neutraliza la citotoxicidad de TNF α humano en un ensayo de L929 *in vitro* convencional con una CI_{50} de 1×10^{-7} M o menos. Más preferiblemente, el anticuerpo humano aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, se disocia de TNF α humano con un $K_{\text{disociación}}$ de $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos, o incluso más preferiblemente, con un $K_{\text{disociación}}$ de $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ o menos. Más preferiblemente, el anticuerpo humano aislado, o parte de unión a antígeno del mismo, neutraliza la citotoxicidad de TNF α humano en un ensayo de L929 *in vitro* convencional con una CI_{50} de 1×10^{-8} M o menos, incluso más preferiblemente con una CI_{50} de 1×10^{-9} M o menos y todavía más preferiblemente con una CI_{50} de 5×10^{-10} M o menos. En una realización preferida, la formulación contiene un anticuerpo que es un anticuerpo recombinante humano aislado tal como se define en las reivindicaciones. La formulación contiene un anticuerpo que también neutraliza la activación celular inducida por TNF α , tal como se evalúa usando un ensayo *in vitro* convencional para determinar la expresión de ELAM-1 inducida por TNF α sobre células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC).

III. Preparación de la formulación

La presente invención ofrece formulaciones de anticuerpo tal como se definen en las reivindicaciones que tienen propiedades mejoradas en comparación con formulaciones reconocidas en la técnica. Por ejemplo, las formulaciones de la invención tienen una vida útil y/o estabilidad mejoradas en comparación con formulaciones reconocidas en la técnica. En un aspecto preferido, las formulaciones de la invención comprenden una alta concentración de proteína, incluyendo, por ejemplo, una concentración de proteína superior a aproximadamente 45 mg/ml, una concentración de proteína superior a aproximadamente 50 mg/ml, una concentración de proteína superior a aproximadamente 100 mg/ml o una concentración de proteína superior a aproximadamente 150 mg/ml. En un aspecto de la descripción, la proteína es un anticuerpo. En otro aspecto, el anticuerpo es D2E7. La descripción también proporciona una composición farmacéutica acuosa que comprende un poliol, un tensioactivo y un sistema de tampón que comprende citrato y fosfato tal como se define en las reivindicaciones con un pH de 4 a 8, en cantidades suficientes para formular un anticuerpo para uso terapéutico a una concentración de más de aproximadamente, por ejemplo, 45 mg/ml.

La preparación del anticuerpo de interés se realiza según métodos convencionales conocidos en la técnica. En una realización preferida de la invención, el anticuerpo usado en la formulación se expresa en células CHO y se purifica mediante una serie convencional de etapas de cromatografía. En una realización preferida adicional, el anticuerpo se refiere a hTNF α , y se prepara según los métodos descritos en las patentes estadounidenses n.^{os} 6.090.382 y 6.258.562.

Tras la preparación del anticuerpo de interés, se prepara la formulación farmacéutica que comprende el anticuerpo. Se determina la cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo presente en la formulación, por ejemplo, teniendo en cuenta los volúmenes de dosis y modo(s) de administración deseados. En una realización preferida, la concentración del anticuerpo en la formulación es de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 50 mg/ml. La formulación es especialmente adecuada para grandes dosificaciones de anticuerpos. En una realización preferida, la concentración del anticuerpo es de 50 mg/ml.

En otra realización de la invención, la concentración del anticuerpo en la formulación es de 20-130 mg/ml, o aproximadamente 25-125 mg/ml, aproximadamente 30-120 mg/ml, aproximadamente 35-115 mg/ml, aproximadamente 40-110 mg/ml, aproximadamente 45-105 mg/ml, aproximadamente 50-100 mg/ml, aproximadamente 55-95 mg/ml, aproximadamente 60-90 mg/ml, aproximadamente 65-85 mg/ml, aproximadamente 70-80 mg/ml o aproximadamente 75 mg/ml. También se pretende que intervalos intermedios a las concentraciones mencionadas anteriormente sean parte de esta invención. Por ejemplo, se pretende que estén incluidos intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente como límites superiores y/o inferiores.

En una realización, la invención proporciona una formulación con una vida útil prolongada que comprende un anticuerpo, en combinación con manitol, ácido cítrico monohidratado, citrato de sodio, fosfato de disodio dihidratado, dihidrogenofosfato de sodio dihidratado, cloruro de sodio, polisorbato 80, agua tal como se define en las reivindicaciones e hidróxido de sodio. En una realización adicional, la formulación de la invención tiene una vida útil prolongada de al menos aproximadamente 18 meses en estado líquido. También puede usarse la congelación de la formulación de la invención para prolongar adicionalmente su vida útil.

Se prepara una formulación acuosa que comprende el anticuerpo en una disolución de pH tamponado tal como se define en las reivindicaciones. El tampón de esta invención tiene un pH que oscila entre 4 y 8, preferiblemente entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,0, más preferiblemente entre aproximadamente 4,8 y aproximadamente 5,5 y lo más preferiblemente tiene un pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,2. También se pretende que intervalos intermedios a los pH mencionados anteriormente sean parte de esta invención. Por ejemplo, se pretende que estén incluidos intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente como límites superiores y/o inferiores.

La formulación comprende un sistema de tampón que contiene citrato y fosfato tal como se define en las reivindicaciones para mantener el pH en un intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 8. El intervalo de pH es de desde aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 6,0, más preferiblemente desde aproximadamente pH 4,8 hasta aproximadamente 5,5 y lo más preferiblemente en un intervalo de pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 5,2. El sistema de tampón incluye aproximadamente 1,3 mg/ml de ácido cítrico (por ejemplo, 1,305 mg/ml), aproximadamente 0,3 mg/ml de citrato de sodio (por ejemplo, 0,305 mg/ml), aproximadamente 1,5 mg/ml de fosfato de disodio dihidratado (por ejemplo 1,53 mg/ml), aproximadamente 0,9 mg/ml de dihidrogenofosfato de sodio dihidratado (por ejemplo, 0,86) y aproximadamente 6,2 mg/ml de cloruro de sodio (por ejemplo, 6,165 mg/ml), se ajusta el pH de la formulación con hidróxido de sodio.

También se incluye en la formulación un poliol, que actúa como tónico y puede estabilizar el anticuerpo. Se añade el poliol a la formulación en una cantidad que puede variar con respecto a la isotonicidad deseada de la formulación. Preferiblemente, la formulación acuosa es isotónica. El poliol que se usa en la formulación como agente de tonicidad es manitol, siendo la concentración de manitol de 10-14 mg/ml. En la realización más preferida, la concentración de manitol es de aproximadamente 12 mg/ml.

También se añade un detergente o tensioactivo a la formulación de anticuerpo. El detergente es el detergente no iónico polisorbato 80. La cantidad de detergente añadida es tal que reduce la agregación del anticuerpo formulado y/o minimiza la formación de materiales particulados en la formulación y/o reduce la adsorción. El polisorbato 80 también se denomina Tween 80. Tween 80 es un término usado para describir monooleato de polioxietilensorbitano (20) (véase Fiedler, Lexikon der Hifsstoffe, Editio Cantor Verlag Aulendorf, 4^a ed., 1996). En otra realización preferida, se encuentra aproximadamente un 0,1% de polisorbato 80 en la formulación de la invención.

En una realización preferida de la invención, la formulación es una disolución de 0,8 ml en un vial que contiene los componentes mostrados a continuación en la tabla 1.

Tabla 1

1 vial con 0,8 ml de disolución para inyección ¹⁾ contiene:		
Nombre del componente	Cantidad	Función
<i>Principio activo:</i> Anticuerpo (D2E7) ²⁾	40,0 mg	Principio activo
<i>Excipientes:</i>		
Manitol	9,6 mg	Agente de tonicidad
Ácido cítrico monohidratado - Ácido cítrico	1,044 mg	Tampón
Citrato de sodio - Citrato de sodio	0,244 mg	Tampón
Fosfato de disodio dihidratado - Fosfato de sodio dibásico dihidratado	1,224 mg	Tampón
Dihidrogenofosfato de sodio dihidratado - Fosfato de sodio monobásico dihidratado	0,688 mg	Tampón
Cloruro de sodio	4,932 mg	Agente de tonicidad
Polisorbato 80	0,8 mg	Detergente
Agua para inyecciones - Agua para inyección	759,028 - 759,048 mg	Disolvente
Hidróxido de sodio ³⁾	0,02 - 0,04 mg	Ajuste del pH
Total	817,6 mg	
¹⁾ Densidad de la disolución: 1,022 g/ml		
²⁾ Se usa como concentrado		
³⁾ Adición como disolución 1 M		

En un aspecto, la formulación contiene los agentes identificados anteriormente (es decir, anticuerpo, tampón, poliol y detergente) y está esencialmente libre de uno o más conservantes, tales como alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol y Cl de bencetonio. En otro aspecto, puede incluirse un conservante en la formulación, particularmente cuando la formulación es una formulación de múltiples dosis. Pueden incluirse uno o más otros portadores, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980) en la formulación siempre que no afecten de manera significativamente adversa a las características deseadas de la formulación. Los portadores, excipientes o estabilizadores aceptables son no tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen; agentes de tamponamiento adicionales; codisolventes; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sal tales como sodio.

La formulación en el presente documento también puede combinarse con uno o más otros agentes terapéuticos según sea necesario para la indicación particular que está tratándose, preferiblemente aquéllos con actividades complementarias que no afectan de manera adversa al anticuerpo de la formulación. Tales agentes terapéuticos están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el fin pretendido. Se describen adicionalmente agentes terapéuticos adicionales que pueden combinarse con la formulación de la invención en las patentes estadounidenses n.ºs 6.090.382 y 6.258.562.

Las formulaciones que van a usarse para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes de, o después de la preparación de la formulación.

IV. Administración de la formulación

La formulación de la invención puede usarse en indicaciones similares como las descritas en las patentes estadounidenses n.ºs 6.090.382 y 6.258.562, y detalladas adicionalmente a continuación.

5 La expresión "cantidad eficaz" de la formulación es la cantidad necesaria o suficiente para inhibir la actividad de TNF α , por ejemplo, prevenir los diversos síntomas morfológicos y somáticos de un estado asociado a actividad de TNF α perjudicial. En otra realización, la cantidad eficaz de la formulación es la cantidad necesaria para lograr el resultado deseado. En un ejemplo, una cantidad eficaz de la formulación es la cantidad suficiente para inhibir la actividad de TNF α perjudicial. En otro ejemplo, una cantidad eficaz de la formulación es 0,8 ml de la formulación que contiene 40 mg de anticuerpo, tal como se describe en la tabla 1. La cantidad eficaz puede variar dependiendo de factores tales como el tamaño y peso del sujeto, o el tipo de enfermedad. Por ejemplo, la elección de una formulación inhibidora de la actividad de TNF α puede afectar a lo que constituye una "cantidad eficaz". Un experto habitual en la técnica podría estudiar los factores mencionados anteriormente y realizar la determinación con respecto a la cantidad eficaz de la formulación inhibidora de la actividad de TNF α sin experimentación excesiva.

15 El régimen de administración puede afectar a lo que constituye una cantidad eficaz. La formulación inhibidora de la actividad de TNF α puede administrarse al sujeto o bien antes de o bien después del comienzo de la actividad de TNF α perjudicial. Además, pueden administrarse varias dosificaciones divididas, así como dosificaciones escalonadas, diaria o secuencialmente, o la dosis puede infundirse de manera continua, o puede ser una inyección en bolo. Además, las dosificaciones de la formulación inhibidora de la actividad de TNF α pueden aumentarse o disminuirse proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica o profiláctica.

20 El término "tratado," "tratar" o "tratamiento" incluye la disminución o el alivio de al menos un síntoma asociado o provocado por el estado, trastorno o enfermedad que está tratándose. Por ejemplo, el tratamiento puede ser la disminución de uno o varios síntomas de un trastorno o la erradicación completa de un trastorno.

25 Los niveles de dosificación reales de los principios activos (anticuerpo) en la formulación farmacéutica de esta invención pueden variarse de modo que se obtenga una cantidad del principio activo que es eficaz para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin que sea tóxica para el paciente.

30 El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores incluyendo la actividad del anticuerpo encontrado en la formulación, la vía de administración, el tiempo de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que está empleándose, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el compuesto particular empleado, la edad, sexo, peso, estado, salud general e historia clínica previa del paciente que está tratándose, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas.

35 Un médico o veterinario de experiencia habitual en la técnica puede determinar y prescribir fácilmente la cantidad eficaz de la composición farmacéutica de la presente invención requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario podría empezar las dosis de los compuestos de la invención empleados en la formulación farmacéutica a niveles inferiores a los requeridos con el fin de lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado.

40 En general, una dosis diaria adecuada de una formulación de la invención será la cantidad de la formulación que es la dosis mínima eficaz para producir un efecto terapéutico. Una dosis eficaz de ese tipo dependerá generalmente de los factores descritos anteriormente. Una cantidad eficaz de la formulación de la presente invención es una cantidad que inhibe la actividad de TNF α en un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de TNF α es perjudicial. En una realización preferida, la formulación proporciona una dosis eficaz de 40 mg por inyección del principio activo, el anticuerpo. En otra realización, la formulación proporciona una dosis eficaz que oscila entre aproximadamente 1 y 150 mg de anticuerpo. Si se desea, la dosis diaria eficaz de la formulación farmacéutica puede administrarse como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo de todo el día, opcionalmente, en formas farmacéuticas unitarias.

45 En una realización de la invención, la dosificación del anticuerpo en la formulación es de entre aproximadamente 5 y aproximadamente 80 mg. En otra realización, la dosificación del anticuerpo en la formulación es de entre aproximadamente 25 y aproximadamente 50 mg. La formulación es especialmente adecuada para dosificaciones grandes de anticuerpo de más de 15 mg. En una realización preferida de la invención, la formulación proporciona un anticuerpo a una dosis de aproximadamente 40 mg.

50 La dosificación del anticuerpo en la formulación es de entre 20-130 mg, o aproximadamente 25-125 mg, aproximadamente 30-120 mg, aproximadamente 35-115 mg, aproximadamente 40-110 mg, aproximadamente 45-105 mg, aproximadamente 50-100 mg, aproximadamente 55-95 mg, aproximadamente 60-90 mg, aproximadamente 65-85 mg, aproximadamente 70-80 mg o aproximadamente 75 mg. En una realización preferida, la dosificación del

anticuerpo es de 40 mg. En la realización más preferida, el anticuerpo es D2E7. También se pretende que intervalos intermedios a las dosificaciones mencionadas anteriormente sean parte de esta invención. Por ejemplo, se pretende que estén incluidos intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente como límites superiores y/o inferiores.

- 5 Debe indicarse que los valores de dosificación pueden variar con la gravedad del estado que va a aliviarse. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, deben ajustarse regímenes de dosificación específicos a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación expuestos en el presente documento son sólo a modo de ejemplo y no pretenden limitar el alcance o la práctica de la composición reivindicada.
- 10 La invención proporciona una formulación farmacéutica tal como se reivindica con una vida útil prolongada que, en una realización, se usa para inhibir la actividad de TNF α en un sujeto que padece un trastorno en el que la actividad de TNF α es perjudicial, que comprende administrar al sujeto un anticuerpo o parte de anticuerpo de la invención de modo que se inhibe la actividad de TNF α en el sujeto. Preferiblemente, el TNF α es TNF α humano y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa un TNF α con el cual un anticuerpo de la invención reacciona de manera cruzada. Todavía adicionalmente, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido hTNF α (por ejemplo, mediante administración de hTNF α o mediante expresión de un transgén de hTNF α). Puede administrarse una formulación de la invención a un sujeto humano para fines terapéuticos (mencionados adicionalmente a continuación). En una realización de la invención, la formulación farmacéutica líquida puede administrarse fácilmente, lo que incluye, por ejemplo, una formulación que se autoadministra por el paciente. En una realización preferida, la formulación de la invención se administra a través de inyección s.c., preferiblemente de uso único. Además, puede administrarse una formulación de la invención a un mamífero no humano que expresa un TNF α con el que el anticuerpo reacciona de manera cruzada (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) para fines veterinarios o como modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a esto último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de anticuerpos de la invención (por ejemplo, pruebas de dosificación y transcurros de tiempo de la administración).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión “un trastorno en el que la actividad de TNF α es perjudicial” pretende incluir enfermedades y otros trastornos en los que se ha demostrado que la presencia de TNF α en un sujeto que padece el trastorno es o se sospecha que es o bien responsable de la fisiopatología del trastorno o bien un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Por consiguiente, un trastorno en el que la actividad de TNF α es perjudicial es un trastorno en el que se espera que la inhibición de la actividad de TNF α alivie los síntomas y/o la progresión del trastorno. Tales trastornos pueden demostrarse, por ejemplo, mediante un aumento en la concentración de TNF α en un fluido biológico de un sujeto que padece el trastorno (por ejemplo, un aumento en la concentración de TNF α en suero, plasma, líquido sinovial, etc. del sujeto), que puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-TNF α tal como se describió anteriormente.

35 Hay numerosos ejemplos de trastornos en los que la actividad de TNF α es perjudicial. Se describen ejemplos de trastornos en los que la actividad de TNF α es perjudicial en la solicitud estadounidense n.º 60/397275. También se describen ejemplos en los que la actividad de TNF α es perjudicial en las patentes estadounidenses n.ºs 6.015.557, 6.177.077, 6.379.666, 6.419.934, 6.419.944, 6.423.321 y 6.428.787; solicitudes de patentes estadounidenses n.ºs US2001/0016195, US2001/0004456 y US2001/026801; documentos WO 00/50079 y WO 01/49321.

40 El uso de los anticuerpos y las partes de anticuerpos de la invención en el tratamiento de trastornos específicos se comenta adicionalmente a continuación:

A. Septicemia

45 El factor de necrosis tumoral tiene un papel establecido en la fisiopatología de la septicemia, con efectos biológicos que incluyen hipotensión, supresión miocárdica, síndrome de fuga vascular, necrosis de órganos, estimulación de la liberación de mediadores secundarios tóxicos y activación de la cascada de coagulación (véase por ejemplo, Tracey, K.J. y Cerami, A. (1994) Annu. Rev. Med. 45:491-503; Russell, D y Thompson, R.C. (1993) Curr. Opin. Biotech. 4:714-721). Por consiguiente, la formulación de la invención puede usarse para tratar la septicemia en cualquiera de sus prácticas clínicas, incluyendo choque séptico, choque endotóxico, septicemia gram negativa y síndrome de choque tóxico.

50 Además, para tratar la septicemia, la formulación de la invención puede coadministrarse con uno o más agentes terapéuticos adicionales que pueden aliviar además la septicemia, tales como un inhibidor de interleucina-1 (tal como los descritos en las publicaciones PCT n.ºs WO 92/16221 y WO 92/17583), la citocina interleucina-6 (véase por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 93/11793) o un antagonista del factor activador de plaquetas (véase por ejemplo, la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 374 510).

Adicionalmente, en una realización preferida, la formulación de la invención se administra a un sujeto humano dentro de un subgrupo de pacientes con septicemia que tienen una concentración sérica o plasmática de IL-6 por encima de 500 pg/ml, y más preferiblemente 1000 pg/ml, en el momento de tratamiento (véase la publicación PCT n.º WO 95/20978 por Daum, L., *et al.*).

5 B. Enfermedades autoinmunitarias

Se ha implicado al factor de necrosis tumoral en el desempeño de un papel en la fisiopatología de una variedad de enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, se ha implicado a TNF α en la activación de la inflamación de tejidos y en la producción de destrucción de articulaciones en artritis reumatoide (véase por ejemplo, Tracey y Cerami, citado anteriormente; Arend, W.P. y Dayer, J-M. (1995) *Arth. Rheum.* 38:151-160; Fava, R.A., *et al.* (1993) *Clin. Exp. Immunol.* 94:261-266). También se ha implicado a TNF α en la promoción de la muerte de células de los islotes y en la mediación de la resistencia a la insulina en diabetes (véase por ejemplo, Tracey y Cerami, citado anteriormente; publicación PCT n.º WO 94/08609). También se ha implicado a TNF α en la mediación de citotoxicidad a oligodendrocitos e inducción de placas inflamatorias en esclerosis múltiple (véase por ejemplo, Tracey y Cerami, citado anteriormente). Se han sometido anticuerpos anti-hTNF α murinos humanizados y quiméricos a pruebas clínicas para el tratamiento de artritis reumatoide (véase por ejemplo, Elliott, M.J., *et al.* (1994) *Lancet* 344:1125-1127; Elliot, M.J., *et al.* (1994) *Lancet* 344:1105-1110; Rankin, E.C., *et al.* (1995) *Br. J. Rheumatol.* 34:334-342).

La formulación de la invención puede usarse para tratar enfermedades autoinmunitarias, en particular las asociadas con inflamación, incluyendo artritis reumatoide, espondilitis reumatoide, osteoartritis y artritis gotosa, alergia, esclerosis múltiple, diabetes autoinmunitaria, uveítis autoinmunitaria y síndrome nefrótico. Normalmente, la formulación se administra de manera sistémica, aunque para determinados trastornos, la administración local del anticuerpo o parte de anticuerpo a un sitio de inflamación puede ser beneficiosa (por ejemplo, administración local en las articulaciones en artritis reumatoide o aplicación tópica a úlceras diabéticas, solo o en combinación con un derivado de ciclohexano-ilideno tal como se describe en la publicación PCT n.º WO 93/19751).

20 C. Enfermedades infecciosas

Se ha implicado al factor de necrosis tumoral en la mediación de efectos biológicos observados en una variedad de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, se ha implicado a TNF α en la mediación de inflamación cerebral y trombosis capilar e infarto en malaria (véase por ejemplo, Tracey y Cerami, citado anteriormente). También se ha implicado a TNF α en la mediación de inflamación cerebral, inducción de la descomposición de la barrera hematoencefálica, desencadenamiento del síndrome del choque séptico y activación del infarto venoso en meningitis (véase por ejemplo, Tracey y Cerami, citado anteriormente). También se ha implicado a TNF α en la inducción de caquexia, estimulación de la proliferación viral y mediación de la lesión del sistema nervioso central en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) (véase por ejemplo, Tracey y Cerami, citado anteriormente). Por consiguiente, los anticuerpos, y partes de anticuerpos, de la invención, pueden usarse en el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluyendo meningitis bacteriana (véase por ejemplo, la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 585 705), malaria cerebral, SIDA y complejo relacionado con SIDA (ARC) (véase por ejemplo, la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 230 574), así como infección por citomegalovirus tras trasplante (véase por ejemplo, Fietze, E., *et al.* (1994) *Transplantation* 58:675-680). La formulación de la invención también puede usarse para aliviar síntomas asociados con enfermedades infecciosas, incluyendo fiebre y mialgias debido a infección (tal como gripe) y caquexia tras infección (por ejemplo, tras SIDA o ARC).

40 D. Trasplante

Se ha implicado al factor de necrosis tumoral como un mediador clave del rechazo de aloinjertos y enfermedad de injerto contra huésped (EICH) y en la mediación de una reacción adversa que se ha observado cuando el anticuerpo OKT3 de rata, dirigido contra el complejo CD3 del receptor de células T, se usa para inhibir el rechazo de trasplantes renales (véase por ejemplo, Tracey y Cerami, citado anteriormente; Eason, J.D., *et al.* (1995) *Transplantation* 59:300-305; Suthanthiran, M. y Strom, T.B. (1994) *New Engl. J. Med.* 331: 365-375). Por consiguiente, la formulación de la invención puede usarse para inhibir el rechazo de trasplantes, incluyendo rechazos de aloinjertos y xenoinjertos y para inhibir EICH. Aunque el anticuerpo o parte de anticuerpo puede usarse solo, más preferiblemente se usa en combinación con uno o más otros agentes que inhiben la respuesta inmunitaria contra el aloinjerto o inhiben EICH. Por ejemplo, en una realización, la formulación de la invención se usa en combinación con OKT3 para inhibir reacciones inducidas por OKT3. En otra realización, la formulación de la invención se usa en combinación con uno o más anticuerpos dirigidos a otras dianas implicadas en la regulación de repuestas inmunitarias, tales como las moléculas CD25 de superficie celular (receptor- α de interleucina-2), CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B7-1) y/o CD86 (B7-2). Aún en otra realización, la formulación de la invención se usa en combinación con uno o más agentes inmunosupresores generales, tales como ciclosporina A o FK506.

55 E. Tumor maligno

Se ha implicado al factor de necrosis tumoral en la inducción de caquexia, estimulación del crecimiento tumoral, potenciación del potencial metastásico y mediación de la citotoxicidad en tumores malignos (véase por ejemplo, Tracey y Cerami, citado anteriormente). Por consiguiente, la formulación de la invención puede usarse en el tratamiento de tumores malignos, para inhibir el crecimiento tumoral o metástasis y/o para aliviar la caquexia tras tumor maligno. La formulación puede administrarse de manera sistémica o local al sitio tumoral.

F. Trastornos pulmonares

Se ha implicado al factor de necrosis tumoral en la fisiopatología del síndrome de dificultad respiratoria en adultos, incluyendo la estimulación de la activación endotelial de leucocitos, dirección de la citotoxicidad a pneumocitos e inducción del síndrome de fuga vascular (véase por ejemplo, Tracey y Cerami, citado anteriormente). Por consiguiente, la formulación de la invención puede usarse para tratar diversos trastornos pulmonares, incluyendo síndrome de dificultad respiratoria en adultos (véase por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 91/04054), edema pulmonar fulminante, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, sarcoidosis pulmonar, silicosis y fibrosis pulmonar. La formulación puede administrarse de manera sistémica o local a la superficie pulmonar, por ejemplo como un aerosol.

G. Trastornos intestinales

Se ha implicado al factor de necrosis tumoral en la fisiopatología de trastornos inflamatorios del intestino (véase por ejemplo, Tracy, K.J., *et al.* (1986) *Science* 234:470-474; Sun, X.-M., *et al.* (1988) *J. Clin. Invest.* 81:1328-1331; MacDonald, T.T., *et al.* (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 81:301-305). Se han sometido anticuerpos anti-hTNF α murinos quiméricos a pruebas clínicas para el tratamiento de la enfermedad de Crohn (van Dullemen, H.M., *et al.* (1995) *Gastroenterology* 109:129-135). La formulación de la invención también puede usarse para tratar trastornos intestinales, tales como enfermedad inflamatoria del intestino idiopática, que incluye dos síndromes, enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa.

H. Trastornos cardiacos

La formulación de la invención también puede usarse para tratar diversos trastornos cardiacos, incluyendo isquemia del corazón (véase por ejemplo, la publicación de solicitud de patente europea n.º EP 453 898) e insuficiencia cardiaca (debilidad del músculo cardíaco) (véase por ejemplo, la publicación PCT n.º WO 94/20139).

I. Otros

La formulación farmacéutica de la invención también puede usarse para tratar diversos otros trastornos en los que la actividad de TNF α es perjudicial. Los ejemplos de otras enfermedades y trastornos en los que se ha implicado la actividad de TNF α en la fisiopatología, y por tanto que pueden tratarse usando la formulación de la invención, incluyen trastornos inflamatorios de los huesos y enfermedad de resorción ósea (véanse por ejemplo, Bertolini, D.R., *et al.* (1986) *Nature* 319:516-518; König, A., *et al.* (1988) *J. Bone Miner. Res.* 3:621-627; Lerner, U.H. y Ohlin, A. (1993) *J. Bone Miner. Res.* 8:147-155; y Shankar, G. y Stem, P.H. (1993) *Bone* 14:871-876), hepatitis, incluyendo hepatitis alcohólica (véanse por ejemplo, McClain, C.J. y Cohen, D.A. (1989) *Hepatology* 9:349-351; Felver, M.E., *et al.* (1990) *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 14:255-259; y Hansen, J., *et al.* (1994) *Hepatology* 20:461-474) y hepatitis viral (Sheron, N., *et al.* (1991) *J. Hepatol.* 12:241-245; y Hussain, M.J., *et al.* (1994) *J. Clin. Pathol.* 47:1112-1115), alteraciones de la coagulación (véanse por ejemplo, van der Poll, T., *et al.* (1990) *N. Engl. J. Med.* 322:1622-1627; y van der Poll, T., *et al.* (1991) *Prog. Clin. Biol. Res.* 367:55-60), quemaduras (véase por ejemplo, Giroir, B.P., *et al.* (1994) *Am. J. Physiol.* 267:H118-124; y Liu, X.S., *et al.* (1994) *Burns* 20:40-44), lesión por reperfusión (véanse por ejemplo, Scales, W.E., *et al.* (1994) *Am. J. Physiol.* 267:G1122-1127; Serrick, C., *et al.* (1994) *Transplantation* 58:1158-1162; y Yao, Y.M., *et al.* (1995) *Resuscitation* 29:157-168), formación de queloides (véase por ejemplo, McCauley, R.L., *et al.* (1992) *J. Clin. Immunol.* 12:300-308), formación de tejido cicatricial; pirexia; enfermedad periodontal; obesidad y toxicidad por radiación.

Otros trastornos en los que la actividad de TNF α es perjudicial incluyen, pero no se limitan a, enfermedad de Still en adultos, enfermedad de Alzheimer, espondilitis anquilosante, asma, cáncer y caquexia, aterosclerosis, aterosclerosis crónica, síndrome de fatiga crónica, insuficiencia hepática, insuficiencia hepática crónica, enfermedad pulmonar obstructiva, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, insuficiencia cardiaca congestiva, dermatopolimiositis, macrovasculopatía diabética, endometriosis, fiebres periódicas familiares, fibrosis, hemodiálisis, reacción de Jarisch-Herxheimer, AR juvenil, síndrome de Kawasaki, síndrome mielodisplásico, infarto de miocardio, panciaticular vulgaris, enfermedad periodontal, neuropatía periférica, poliarticular, polimiositis, insuficiencia renal progresiva, psoriasis, artritis psoriásica, síndrome de Reiter, sarcoidosis, esclerodermia, espondiloartropatías, enfermedad de Still, accidente cerebrovascular, síndrome asociado con terapia, síndrome inflamatorio inducido por terapia, síndrome inflamatorio tras administración de IL-2, reparación de aneurisma aórtico toracoabdominal (TAAA), enfermedad de Vasulo-Behcet, vacunación contra la fiebre amarilla, diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2, dolor neuropático, ciática, edema cerebral, edema en y/o alrededor de la médula espinal, vasculitis, granulomatosis

de Wegener, arteritis temporal, polimialgia reumática, arteritis de Takayasu, poliarteritis nudosa, poliangeítis microscópica, síndrome de Churg-Strauss, síndrome de Felty, síndrome de Sjogren, trastorno del tejido conjuntivo mixto, policondritis recidivante, seudogota, aflojamiento de prótesis, hepatitis autoinmunitaria, colangitis esclerosante, pancreatitis aguda, pancreatitis crónica, glomerulonefritis, glomerulonefritis posestreptocócica o nefropatía por IgA, cardiopatía reumática, cardiomiopatía, orquitis, pioderma gangrenoso, mieloma múltiple, síndrome periódico asociado al receptor de TNF [TRAPS], aterosclerosis, arteritis de células gigantes dependiente de esteroides, miositis, uveítis y reacciones farmacológicas.

La invención se ilustra adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no deben interpretarse como limitativos adicionalmente.

10 Ejemplos

EJEMPLO 1: Preparación de la formulación

Se preparó la formulación farmacéutica de la invención según el siguiente protocolo.

Los materiales que se usaron en la formulación incluyen: manitol, ácido cítrico monohidratado (ácido cítrico), citrato de sodio, fosfato de sodio dihidratado (fosfato de sodio dibásico dihidratado), dihidrogenofosfato de sodio dihidratado (fosfato de sodio monobásico dihidratado), cloruro de sodio, polisorbato 80, agua para las inyecciones, hidróxido de sodio, que se usó como una disolución 1 M para ajustar el pH, y concentrado de proteína (por ejemplo, concentrado de anticuerpo).

Preparación de 20 l de tampón (equivalente a 20,180 kg - densidad de la disolución: 1,009 g/ml)

Se pesaron los componentes tal como sigue: 240,0 g de manitol, 26,1 g de ácido cítrico monohidratado, 6,1 g de citrato de sodio, 30,6 g de fosfato de sodio dihidratado, 17,2 g de dihidrogenofosfato de sodio dihidratado, 123,3 g de cloruro de sodio, 20,0 g de polisorbato 80 y de 19.715,7 a 19.716,1 g de agua.

Se preparó una disolución de hidróxido de sodio combinando 40,0 g de hidróxido de sodio con 1000,8 g de agua para inyecciones.

A continuación, se preparó un tampón disolviendo los siguientes componentes pesados previamente (descritos anteriormente) en aproximadamente el 90% del agua para inyecciones: manitol, ácido cítrico monohidratado, citrato de sodio, fosfato de sodio dihidratado, dihidrogenofosfato de sodio, cloruro de sodio y polisorbato 80. Se determinó que la secuencia de la adición de los constituyentes del tampón no era importante y, por tanto, puede elegirse a voluntad.

Tras la adición de todos de los constituyentes del tampón, se ajustó el pH de la disolución con hidróxido de sodio 1 M que se preparó tal como se describió anteriormente. Tras la adición del hidróxido de sodio, se añadió el peso final del agua. Entonces se filtró la disolución de tampón a través de un filtro esterilizado (poli(difluoruro de vinilideno) hidrófilo, 0,22 μm de tamaño de poro) en un recipiente esterilizado. El medio de filtración usado fue nitrógeno esterilizado por filtración.

Preparación de 40 l de formulación (equivalente a 40,88 kg)

Entonces se añadió la disolución de tampón filtrada al concentrado de anticuerpo descongelado y reunido (el principio activo de la formulación farmacéutica), preparado tal como sigue. Se descongeló el anticuerpo (concentrado) en un baño de agua antes de la preparación de la formulación farmacéutica. Se usaron 34,207 g de concentrado de anticuerpo, lo que es equivalente a 2,0 kg de proteína con 60 mg de proteína/ml de concentrado de proteína. La densidad del concentrado era de 1,0262 g/ml. Puede usarse cualquier concentrado de proteína que oscile entre 25,655 y 37,316, lo que es equivalente a una concentración de proteína en el concentrado de proteína de 55 a 80 mg/ml. Se añadió el tampón mientras se agitaba, hasta que se alcanzó el peso final de la disolución a granel.

Entonces se esterilizó la formulación, con todos sus componentes incluidos, mediante filtración tal como se describió anteriormente, excepto porque se filtró la formulación a través de dos filtros de membrana de 0,22 μm estériles. Tras la esterilización, se envasó la formulación para su uso en o bien un vial o bien una jeringuilla cargada previamente.

El experto también apreciará que las cantidades en peso y/o razones de peso con respecto a volumen mencionadas en el presente documento pueden convertirse en moles y/o molaridades usando los pesos moleculares reconocidos en la técnica de los componentes mencionados. Las cantidades en peso mostradas como ejemplo en el presente documento (por ejemplo, g o kg) son para los volúmenes (por ejemplo, de tampón o formulación farmacéutica)

mencionados. El experto apreciará que las cantidades en peso pueden ajustarse proporcionalmente cuando se desean volúmenes de formulación diferentes. Por ejemplo, formulaciones de 32 l, 20 l, 10 l, 5 l o 1 l incluirían el 80%, el 50%, el 25%, el 12,5% o el 2,5%, respectivamente, de las cantidades en peso mostradas a modo de ejemplo.

EJEMPLO 2: Estudios de congelación/descongelación

5 Tras seleccionarse el tampón de formulación para el anticuerpo D2E7, se formuló el principio activo en la misma matriz como producto acabado.

Se evaluó el comportamiento de congelación-descongelación del principio activo de anticuerpo D2E7 a una concentración de proteína de 63 mg/ml mediante ciclación del principio activo 3 veces desde el estado congelado hasta el estado líquido. La tabla N muestra los resultados de un experimento que evalúa el efecto de tres ciclos de congelación-descongelación rápidos y lentos en presencia y ausencia de polisorbato 80 al 0,1% partiendo de -80°C o -30°C, respectivamente.

15 La tabla 2 muestra que el principio activo de anticuerpo D2E7 puede congelarse/descongelarse al menos 3 veces sin ningún efecto perjudicial sobre o bien las propiedades químicas (HPLC de intercambio catiónico, HPLC de exclusión molecular, color, pH), fisicoquímicas (partículas subvisibles, claridad) o bien la actividad biológica (ensayo de neutralización de TNF *in vitro*). Además, la tabla 2 muestra que la inclusión de polisorbato 80 mejoró las propiedades fisicoquímicas del principio activo de anticuerpo D2E7 tal como se demuestra por el menor número de partículas subvisibles independientemente de si estaba usándose un ciclo de congelación/descongelación rápido o lento (véanse las áreas sombreadas en la tabla 2).

Tabla 2: Efecto de congelación-descongelación sobre el principio activo de anticuerpo D2E7 con/sin polisorbato 80

Criterios de prueba	Polisorbato (0,1%) ¹⁾	Sin congelación/descongelación	Descongelación lenta -30°C en refrigerador	Descongelación rápida -30°C en baño de agua	Descongelación lenta -80° en refrigerador	Descongelación rápida -80°C en baño de agua
Claridad	-	25,0	22,5	25,3	25,8	25,6
	+	27,8	28,1	28,2	28,0	28,1
Color	-	≤ B9	≤ B9	≤ B9	≤ B9	≤ B9
	+	≤ B9	≤ B9	≤ B9	≤ B9	≤ B9
pH	-	5,01	5,02	5,02	5,02	5,02
	+	5,02	5,02	5,02	5,02	5,02
Partículas subvisibles	-	42	600	303	1891	303
		2	4	5	8	0
	+	0	5	1	0	8
		0	0	0	0	1
HPLC de exclusión molecular	-	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8
	+	99,8	99,8	99,8	99,8	99,8

(continuación)

Crterios de prueba	Polisorbato (0,1%) ¹⁾	Sin congelación/descongelación	Descongelación lenta -30°C en refrigerador	Descongelación rápida -30°C en baño de agua	Descongelación lenta -80° en refrigerador	Descongelación rápida -80°C en baño de agua
HPLC de intercambio catiónico	-	87,1	87,0	87,2	86,9	86,9
	+	86,8	87,0	87,1	87,3	86,8
Prueba de neutralización de TNF <i>in vitro</i>	-	118,0	123,8	118,0	103,3	120,5
	+	111,8	96,2	100,9	96,7	95,8
1) + = formulación con polisorbato 80 al 0,1%; - = formulación sin polisorbato 80 al 0,1 %						

EJEMPLO 3: Estudios microbianos

5 Se realizaron pruebas para determinar si la formulación puede soportar el crecimiento microbiano. Los resultados a partir de estos experimentos mostraron que la formulación no soporta el crecimiento microbiano si se almacena a de 20 a 25 °C durante 14 días. Se determinó este resultado mediante inoculación directa en la formulación estéril de microorganismos (por ejemplo, *Staphylococcus aureus*, n.º de la ATCC: 6538P, *Candida albicans*, n.º de la ATCC: 10231, *Aspergillus niger*, n.º de la ATCCC: 16404, *Pseudomonas aeruginosa*, n.º de la ATCC: 9027, un aislado medioambiental) a bajo nivel (NMT 100 ufc/ml). Entonces se examinaron las formulaciones inoculadas para determinar el crecimiento microbiano global, por ejemplo, para determinar cambios en la turbidez. Una falta de turbidez era una indicación de que no se producía crecimiento global, y se detectó en los envases inoculados tras 14 días. Además, no pudo volver a aislarse ningún organismo a partir de estos envases. Por tanto, se concluyó que la formulación no soporta el crecimiento microbiano en estas condiciones.

15 LISTA DE SECUENCIAS

<110> Krause, Hans Juergen Baust, Lisa Dickes, Michael

<120> FORMULACIÓN FARMACÉUTICA DE ANTICUERPOS ANTI-TNF-ALFA

<130> M/45063-EP

<140> 10/222140

20 <141> 16-08-2002

<140> Documento PCT/IB2003/004502

<141> 15-08-2003

<160> 34

<170> FastSEQ para Windows versión 4.0

25 <210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 1

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
      20      25      30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35      40      45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65      70      75      80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr
      85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
      100      105
    
```

5

<210> 2

<211> 121

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 2

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
 1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
      20      25      30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
      50      55      60
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly

          100      105      110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115      120
    
```

15

<210> 3

<211> 9

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 6

Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15
Glu Gly

10 <210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> anticuerpo humano mutado

<400> 7

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 8

<211> 5

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 8

Asp Tyr Ala Met His
1 5

25

<210> 9

<400> 9

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 14

Gln Lys Tyr Ser Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 15

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

15 <400> 15

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 16

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 16

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr
1 5

25 <210> 17

<211> 9

<212> PRT

Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn
1 5

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 21

Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser
1 5

10 <210> 22

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> anticuerpo humano mutado

<400> 22

Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr
1 5

<210> 23

<211> 9

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 23

25

Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

5 <220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 24

Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr
1 5

<210> 25

10 <211> 9

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

15 <400> 25

Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr
1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 26

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala
1 5

25 <210> 27

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 27

5 Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn
1 5 10

<210> 28

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

10 <220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 28

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys
1 5 10

<210> 29

15 <211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

20 <400> 29

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 30

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp
1 5 10

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 31

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

10 <210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> anticuerpo humano mutado

<400> 32

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr
1 5 10

<210> 33

<211> 12

20 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

<400> 33

Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr
1 5 10

25

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> anticuerpo humano mutado

5 <400> 34

Al**a** **Ser** **Tyr** **Leu** **Ser** **Thr** **A**l**a** **Ser** **Ser** **Leu** **G**l**u** **Tyr**
1 **5** **10**

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n farmac3utica acuosa l3quida que tiene un pH de 4 a 8 y que comprende
- 5 (a) de 20 a 130 mg/ml de un anticuerpo anti-factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) IgG1 humano que comprende una regi3n variable de cadena ligera que comprende la secuencia de amino3cidos de SEQ ID NO: 1 y una regi3n variable de cadena pesada que comprende la secuencia de amino3cidos de SEQ ID NO: 2,
- (b) 10-14 mg/ml de manitol,
- (c) 0,1-5 mg/ml de polisorbato 80,
- (d) 1-1,5 mg/ml de 3cido c3trico monohidratado,
- (e) 0,25-0,5 mg/ml de citrato de sodio,
- 10 (f) 1,25-1,75 mg/ml de fosfato de disodio dihidratado,
- (g) 0,7-1,1 mg/ml de dihidrogenofosfato de sodio dihidratado, y
- (h) 6,0-6,4 mg/ml de cloruro de sodio.
2. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, en la que el pH se selecciona del grupo que consiste en entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,0, entre aproximadamente 4,8 y aproximadamente 5,5 y entre
- 15 aproximadamente 5,0 y aproximadamente 5,2.
3. Formulaci3n farmac3utica acuosa l3quida seg3n la reivindicaci3n 1, que contiene
- (a) aproximadamente 50 mg/ml de anticuerpo,
- (b) aproximadamente 12 mg/ml de manitol, y
- (c) aproximadamente 1 mg/ml de polisorbato 80.
- 20 4. Formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que adem3s es adecuada para inyecci3n subcut3nea de uso 3nico.
5. Uso de la formulaci3n seg3n las reivindicaciones 1 a 4, en la preparaci3n de un medicamento para tratar un trastorno en el que la actividad de TNF α es perjudicial.