

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 389 881**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/08** (2006.01)

**A61K 47/18** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61P 43/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08866971 .8**

96 Fecha de presentación: **26.12.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2238985**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **13.10.2010**

54 Título: **Formulación líquida que contiene un anticuerpo a alta concentración**

30 Prioridad:  
**27.12.2007 JP 2007336310**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**02.11.2012**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**02.11.2012**

73 Titular/es:  
**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (50.0%)**  
**5-1 UKIMA 5-CHOME**  
**KITA-KU TOKYO 115-8543, JP y**  
**F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (50.0%)**

72 Inventor/es:  
**MORICHIKA, TOSHIYUKI;**  
**KAMEOKA, DAISUKE;**  
**IMAEDA, YOSHIMI;**  
**MAEDA, TERUTOSHI y**  
**STAUCH, OLIVER BORIS**

74 Agente/Representante:  
**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 389 881 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Formulación líquida que contiene un anticuerpo a alta concentración

### 5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una formulación que contiene un anticuerpo, y en concreto, a una formulación líquida estable que contiene una alta concentración de un anticuerpo.

### 10 **Técnica anterior**

En los últimos años, se han desarrollado y utilizado en la práctica diversas formulaciones de anticuerpos. Muchas de formulaciones de anticuerpos se utilizan para inyección intravenosa. Sin embargo, debido a las necesidades de un centro médico, existe una creciente demanda para el desarrollo de una formulación que contenga anticuerpos que pueda administrarse como una inyección subcutánea auto-inyectable.

En el diseño de una formulación que contiene un anticuerpo para la inyección subcutánea, puesto que la dosis de anticuerpo por administración es grande (aproximadamente de 100 mg a 200 mg) y la cantidad de solución para inyección está generalmente limitada a la inyección subcutánea, es necesario aumentar la concentración de anticuerpo en un líquido a administrar. En vista de esto, en muchos casos, se utilizan formulaciones a alta concentración, que se preparan mediante la técnica de liofilización-concentración, en la que una formulación liofilizada se reconstituye en agua con un volumen menor que el de antes de la liofilización. Sin embargo, existe una fuerte demanda de una formulación líquida que no requiera reconstitución, y que sea fácil de manejar. Aunque no es preferible el aumento de la viscosidad de una formulación debido a la adición de un agente crioprotector tal como un azúcar en el proceso de producción de la formulación liofilizada para las formulaciones para inyección subcutánea, se supone que este problema podría evitarse si la formulación fuese una formulación líquida.

Las soluciones que contienen una alta concentración de un anticuerpo tienden a formar soluciones de alta viscosidad debido a las propiedades macromoleculares de las proteínas, y debido a las interacciones intermoleculares de las proteínas. Además, en los casos en los que se almacena una proteína en forma de solución con una alta concentración, se produce una degradación problemática, que incluye una generación de agregados insolubles y/o solubles; y es necesario evitar tal degradación. Especialmente, en las formulaciones de anticuerpos, es probable que se formen asociaciones y es probable que se generen agregados insolubles en un estado líquido. En los casos en los que la formulación líquida se almacena durante largo tiempo, existe un problema en lo referente a la pérdida de bioactividad de las moléculas de anticuerpo debida a la desamidación de los residuos de aminoácidos tales como los residuos de asparagina.

Se han propuesto diversas ideas para proporcionar una formulación estabilizada, en la que la pérdida de un componente activo sea pequeña incluso después de almacenar la formulación durante un largo período de tiempo. Tales formulaciones se producen por disolución de un componente activo y diversos excipientes en una solución tampón. Sin embargo, para las formulaciones líquidas que contienen una alta concentración de un anticuerpo, no existe aún una tecnología que sea suficiente para evitar la dimerización y la desamidación.

Los documentos WO 2004/091658 y US 2004/0191243 desvelan formulaciones estables de anticuerpos a alta concentración que comprenden, por ejemplo, arginina. El documento WO 2007/074880 (véase también el documento EP 1977763) desvela formulaciones liofilizadas que contienen un anticuerpo que comprenden, por ejemplo, arginina para inhibir la formación de dímeros.

Existe la necesidad de proporcionar una formulación que contengan un anticuerpo a alta concentración, en la que la dimerización y la desamidación estén inhibidas durante el almacenamiento a largo plazo, y que sea a la vez estable y adecuada para su uso en la administración subcutánea.

### **Descripción de la invención**

#### **Problema a ser resuelto por la invención**

Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación líquida que contiene un anticuerpo a alta concentración, en la que la dimerización y la desamidación se inhiban durante el almacenamiento a largo plazo, y que sea estable y adecuada para uso en la administración subcutánea.

#### **Medios para resolver el problema**

Los autores de la presente invención llevaron a cabo un estudio exhaustivo con el fin de alcanzar el objetivo anteriormente indicado, y como resultado, descubrieron que puede proporcionarse una formulación líquida que contenga un anticuerpo a alta concentración añadiendo un aminoácido, arginina o una sal de los mismos, como estabilizador, para completar así la presente invención.

Es decir, la presente invención proporciona lo siguiente:

- (1) Una formulación líquida estable que contiene un anticuerpo, caracterizada porque comprende de 40 a 1.000 mM de arginina y de 10 a 200 mM de metionina.
- (2) Un método para inhibir la dimerización de las moléculas de un anticuerpo en una formulación líquida que contiene el anticuerpo, que comprende añadir arginina y metionina a la formulación líquida.

### Ventajas de la invención

Mediante la presente invención, se proporciona una formulación líquida que contiene una alta concentración de un anticuerpo, con la que no resulta necesaria la reformulación mediante concentración por liofilización, y por lo tanto no requiere reconstitución. La formulación líquida que contiene un anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede almacenarse en un estado líquido durante largo tiempo. Puesto que la formulación líquida que contiene un anticuerpo de acuerdo con la presente invención puede producirse mediante un proceso que no incluye la etapa de liofilización, no resulta necesaria la adición de un azúcar o similar como agente crioprotector.

### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un cromatograma típico del Ejemplo 1.  
 La figura 2 muestra los resultados de la evaluación de la cromatografía de permeación en gel (SEC) del Ejemplo 1.  
 La figura 3 muestra los resultados de la evaluación de la cromatografía de permeación en gel (SEC) del Ejemplo 1.  
 La figura 4 muestra un cromatograma típico del Ejemplo 2.  
 La figura 5 muestra los resultados de la evaluación de la cromatografía de intercambio iónico (IEC) del Ejemplo 2.  
 La figura 6 muestra los resultados de la evaluación de la cromatografía de intercambio iónico (IEC) del Ejemplo 2.  
 La figura 7 muestra los resultados de la evaluación de la cromatografía de permeación en gel (SEC) del Ejemplo 3.  
 La figura 8 muestra los resultados de la evaluación de la cromatografía de intercambio iónico (IEC) del Ejemplo 3.

### Mejor modo de llevar a cabo la invención

A continuación se describirá en detalle la presente invención.

En la presente invención, "formulación líquida que contiene un anticuerpo" se refiere a una formulación líquida que contiene un anticuerpo como componente activo, que se prepara de manera que pueda administrarse a un animal tal como un ser humano, y que se produce preferentemente mediante un proceso que no incluye una etapa de liofilización.

La formulación líquida que contiene un anticuerpo de acuerdo con la presente invención es una formulación farmacéutica líquida que contiene un anticuerpo a alta concentración, que tiene preferentemente una concentración de anticuerpo no inferior a 50 mg/ml, más preferentemente no inferior a 100 mg/ml, aún más preferentemente no inferior a 120 mg/ml, y aún más preferentemente no inferior a 150 mg/ml. Hay que reseñar que no se ha desarrollado para uso comercial una formulación líquida que contiene un anticuerpo a una concentración de 120 mg/ml o más, o preferentemente 150 mg/ml o más. A saber, la presente invención permite por primera vez poner en uso una formulación líquida que contiene un anticuerpo a esta alta concentración.

Además, considerando el proceso de fabricación, la concentración más alta de anticuerpo en la formulación líquida de acuerdo con la presente invención puede ser por lo general de 300 mg/ml, preferentemente 250 mg/ml y más preferentemente 200 mg/ml. Por lo tanto, la formulación líquida que contiene un anticuerpo de acuerdo con la presente invención tiene preferentemente una concentración de anticuerpo de 50 a 300 mg/ml, más preferentemente de 100 a 300 mg/ml, aún más preferentemente de 120 a 250 mg/ml, y aún más preferentemente de 150 a 200 mg/ml.

El anticuerpo a utilizar en la presente invención no está restringido, siempre y cuando se una a un antígeno deseado. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, aunque es preferible un anticuerpo monoclonal porque puede producirse de manera estable un anticuerpo que tiene propiedades uniformes.

Un anticuerpo monoclonal que puede utilizarse en la presente invención incluye no sólo los anticuerpos monoclonales originados a partir de un animal tal como un ser humano, ratón, rata, hámster, conejo, oveja, camello o mono, sino que también incluye anticuerpos recombinantes modificados artificialmente, tales como un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado y un anticuerpo biespecífico. La clase de inmunoglobulina del anticuerpo no está restringida, y puede ser cualquiera de las clases que incluyen las IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA,

IgD, IgE e IgM. Entre estas clases, resultan preferentes IgG e IgM.

El anticuerpo que puede utilizarse en la presente invención incluye no sólo anticuerpos completos, sino también fragmentos de anticuerpo tales como Fv, Fab y F(ab)<sub>2</sub>; y anticuerpos de bajo peso molecular tales como Fv monocatenarios (scFv, sc(Fv)<sub>2</sub>, diacuerpos tales como el dímero scFv) que tienen una o más especificidades, preparados mediante la unión de las regiones variables de un anticuerpo a través de un conector tal como un conector peptídico.

Los anticuerpos descritos anteriormente que pueden utilizarse en la presente invención pueden prepararse por métodos bien conocidos por los expertos en la materia.

Puede prepararse un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal como sigue básicamente utilizando una técnica conocida. Es decir, el hibridoma puede prepararse inmunizando un animal con un antígeno deseado o células que expresan el antígeno deseado como antígeno de sensibilización por un método convencional; fusionando los linfocitos obtenidos con células precursoras conocidas por un método convencional de fusión de células; y seleccionando una célula productora de anticuerpos monoclonales (hibridoma) por un método de cribado convencional. La preparación de un hibridoma puede llevarse a cabo, por ejemplo, por el método de acuerdo con el método de Milstein *et al.* (Kohler, G. y Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46). En los casos en los que la inmunogenicidad del antígeno sea baja, el antígeno puede unirse a una macromolécula antigénica tal como albúmina, y puede utilizarse el conjugado resultante como inmunógeno.

Pueden emplearse anticuerpos recombinantes, que se preparan mediante la técnica de recombinación genética en la que un gen del antígeno se clona a partir de un hibridoma, incorporando el gen en un vector apropiado, introduciendo el vector en un hospedador, y haciendo que el hospedador produzca el anticuerpo (véase, por ejemplo, Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES, publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Más concretamente, se sintetiza un ADNc que codifica la región variable (región V) del anticuerpo a partir del ARNm de un hibridoma utilizando una transcriptasa inversa. Si se obtiene un ADN que codifica la región V del anticuerpo deseado, a continuación se liga el ADN a un ADN que codifica la región constante (región C) de un anticuerpo deseado, y el ADN ligado resultante se introduce en un vector de expresión. De manera alternativa, puede incorporarse un ADN que codifica la región V del anticuerpo en un vector de expresión que contiene el ADN que codifica la región C del anticuerpo. El ADN se incorpora en el vector de expresión de manera que el ADN se exprese bajo el control de una región de control de la expresión tal como un potenciador o promotor. Las células hospedadoras se transforman con el vector de expresión resultante, y el anticuerpo puede ser expresado por las células hospedadoras.

En la presente invención, pueden utilizarse anticuerpos recombinantes modificados artificialmente con el fin de reducir la heteroantigenicidad contra el ser humano, tales como anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Estos anticuerpos modificados pueden producirse por métodos conocidos. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo que comprende regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo de un animal distinto del ser humano, tal como el ratón, y regiones constantes de la cadena pesada y la cadena ligera de un anticuerpo de ser 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 ADN obtenido en un vector de expresión, introduciendo el vector de expresión en un hospedador, y haciendo que el hospedador produzca el anticuerpo.

Un anticuerpo humanizado denomina también anticuerpo humano reformado, y se obtiene trasplantando la CDR (región determinante de complementariedad) de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón a la región determinante de complementariedad de un anticuerpo humano. También se conoce una técnica convencional de recombinación genética para preparar el anticuerpo humanizado. Concretamente, se sintetiza un ADN diseñado de manera que la CDR del anticuerpo de ratón y la región marco (FR) del anticuerpo humano se ligan por el método de PCR a partir de varios oligonucleótidos preparados para que tengan regiones solapadas en sus extremos terminales. El ADN obtenido se liga a un ADN que codifica la región constante de un anticuerpo humano, y el ADN resultante se introduce en un vector de expresión. El vector de expresión se introduce en un hospedador, y se hace que el hospedador produzca el anticuerpo humanizado (véanse los documentos EP 239400 A y WO 96/02576). Como FR del anticuerpo humano a ligar a través de la CDR, se selecciona uno cuyas regiones determinantes de complementariedad forme un buen sitio de unión al antígeno. Según sea necesario, puede sustituirse un aminoácido o aminoácidos en la región determinante de complementariedad de manera que la región determinante de complementariedad del anticuerpo humano reformado forme un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato, K. *et al.*, *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856).

Los métodos para obtener un anticuerpo humano son conocidos en la técnica. Por ejemplo, puede obtenerse un anticuerpo humano deseado que tenga una actividad de unión a un antígeno deseado, sensibilizando *in vitro* linfocitos humanos con el antígeno deseado o con las células que expresan el antígeno deseado; fusionando los linfocitos sensibilizados con células de mieloma humano, por ejemplo, células U266; y obteniendo el anticuerpo a partir de las células (véase el documento JP 1-59878 B). También puede obtenerse el anticuerpo humano deseado inmunizando con el antígeno un animal transgénico que tenga todos los repertorios de genes de anticuerpos humanos (véanse los documentos WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y

WO 96/33735). Además, también se conoce una técnica mediante la cual se obtiene un anticuerpo humano mediante "panning" utilizando una biblioteca de anticuerpos humanos.

Por ejemplo, una región variable de un anticuerpo humano se expresa en forma de anticuerpo monocatenario (scFv) en la superficie de un fago mediante el uso de un método de presentación de fagos, y puede seleccionarse el fago que se une al antígeno. Analizando 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 determina la secuencia de ADN del scFv que se une al antígeno, se construye un vector de expresión apropiado que contiene la secuencia, y puede obtenerse el anticuerpo humanizado. Estos métodos son bien conocidos, y puede hacerse referencia a los documentos WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388.

En los casos en los que un gen de anticuerpo se aísla una vez, y el gen se introduce en un hospedador apropiado para preparar el anticuerpo, pueden utilizarse combinaciones apropiadas del hospedador y del vector de expresión. En los casos en los que se utilizan como hospedador células eucariotas, pueden utilizarse células animales, células vegetales y células fúngicas. Células animales conocidas incluyen (1) células de mamífero, por ejemplo, CHO, COS, mieloma, BHK (riñón de cría de hámster), Hela y Vero; (2) células de anfibio, por ejemplo, oocitos de *Xenopus* y (3) células de insecto, por ejemplo, sf9, sf21 y Tn5. Células vegetales conocidas incluyen células de origen vegetal pertenecientes al género *Nicotiana*, por ejemplo, *Nicotiana tabacum*, y las células pueden someterse a cultivo de callo. Células fúngicas conocidas incluyen las células originadas a partir de levaduras, por ejemplo, las pertenecientes al género *Saccharomyces* tales como *Saccharomyces cerevisia*; y bacterias filamentosas, por ejemplo, las pertenecientes al género *Aspergillus* tales como *Aspergillus niger*. En los casos en los que se utilizan células procariotas, existen sistemas de producción que utilizan células bacterianas. Células bacterianas conocidas incluyen células de *E. coli* y *Bacillus subtilis*. El anticuerpo se obtiene introduciendo un gen del anticuerpo deseado en estas células por transformación, y cultivando las células transformadas *in vitro*.

También pueden emplearse como anticuerpo de la presente invención anticuerpos en forma de fragmentos de anticuerpo, anticuerpos de bajo peso molecular y anticuerpos modificados. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo y anticuerpos de bajo peso molecular incluyen Fab, F(ab')<sub>2</sub>, Fv, y Fv monocatenarios (scFv, sc(Fv)<sub>2</sub> y similares) que tienen una o más especificidades, preparados ligando los Fv en la cadena H y en la cadena L a través de un conector apropiado (Huston, JS *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE.UU. (1988) 85, 5,879-5,883). Concretamente, se trata un anticuerpo con papaína o pepsina para generar fragmentos de anticuerpo, o se construye un gen que codifica estos fragmentos de anticuerpo, y el gen se expresa en células hospedadoras apropiadas después de introducir el gen en un vector de expresión (véanse, por ejemplo, Co, M.S. *et al.*, T. Immunol (1994) 152, 2968-2976; Better, M. y Horwitz, A.H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. y Skerra, A., Métodos Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol, (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. *et al.*, Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R.E. y Walker, B.W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137).

También pueden utilizarse como anticuerpos modificados anticuerpos unidos a diversas moléculas tales como polietilenglicol (PEG). El término "anticuerpo" utilizado en la presente invención también incluye estos anticuerpos modificados. Estos anticuerpos modificados pueden obtenerse modificando químicamente un anticuerpo obtenido. Los métodos para llevar a cabo las modificaciones están establecidos en la técnica.

Ejemplos del anticuerpo contenidos en la formulación de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-factor tisular, anticuerpos anti-receptor de IL-6, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos monoclonales contra el antígeno HM1.24, anticuerpos anti-peptido relacionado con la hormona paratiroidea (anticuerpos anti-PTHrP), anticuerpos anti-glicoproteína-3, anticuerpos anti-gangliósido GM3, anticuerpos anti-antagonista del receptor de TPO, anticuerpos que sustituyen el factor VIII, anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-GPIIb/IIIa, anticuerpos anti-TNF, anticuerpos anti-CD25, anticuerpos anti-EGFR, anticuerpos anti-Her2/neu, anticuerpos anti-RSV, anticuerpos anti-CD33, anticuerpos anti-CD52, anticuerpos anti-IgE, anticuerpos anti-CD11a, anticuerpos anti-VEGF, anticuerpos anti-VLA4, anticuerpos anti-AXL, y así sucesivamente.

Ejemplos preferentes de los anticuerpos humanos reformados utilizados en la presente invención incluyen anticuerpos humanizados anti-receptor de interleucina (IL-6) (hPM-1 o MRA) (véase el documento WO 92-19759), anticuerpos monoclonales humanizados anti-antígeno HM1.24 (véase el documento WO 98-14580), anticuerpos humanizados anti-peptido relacionado con la hormona paratiroides (anticuerpos anti-PTHrP) (véase el documento WO 98-13388), anticuerpos humanizados anti-factor tisular (véase el documento WO 99-51743) y anticuerpos IgG1k humanizados anti-glicoproteína-3 (véase el documento PCT/JP05/013103). Los anticuerpos humanizados especialmente preferentes en la presente invención son los anticuerpos humanizados anti-receptor de IL-6.

Como anticuerpos IgM humanos, resultan preferentes los anticuerpos IgM humanos recombinantes anti-gangliósido GM3 (véase el documento WO 05-05636) y similares.

Como anticuerpos de bajo peso molecular, resultan preferentes los anticuerpos anti-antagonista del receptor de TPO (véase el documento WO 02-33072), anticuerpos anti-agonista de CD47 (véase el documento WO 01-66737) y similares.

Para evaluar la estabilidad en almacenamiento de la formulación líquida que contiene un anticuerpo a alta concentración, los autores de la presente invención estudiaron los efectos de diversos excipientes llevando a cabo ensayos de aceleración por calor y ensayos de aceleración por luz. Como resultado, se descubrió que en las soluciones en las que se disolvió una alta concentración de anticuerpo en una solución tampón que contenía el aminoácido arginina, la cantidad de dímero generada fue menor que en las soluciones a las que no se añadió arginina. A partir de estos resultados, se descubrió que la arginina es eficaz como estabilizador para inhibir la dimerización. Además, en las soluciones en las que se disolvió una alta concentración de anticuerpo en una solución tampón que contenía arginina y metionina, el efecto inhibitor en la dimerización se observó a una concentración total de arginina y metionina que es menor que la concentración de arginina sola necesaria para lograr el mismo efecto inhibitor. A partir de estos resultados, se descubrió que se obtiene un efecto sinérgico al añadir arginina y metionina en combinación. Además, se descubrió que la desamidación de las moléculas de anticuerpo es inhibida por la adición de arginina. Estos resultados se ejemplifican como resultados de los ensayos obtenidos para una muestra que contiene un anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6 a una concentración de 180mg/ml.

Por lo tanto, puede proporcionarse una formulación estable de anticuerpo añadiendo arginina como estabilizador, en la que se reduce la dimerización del anticuerpo y se evita la desamidación del anticuerpo.

Además, como se ha descrito anteriormente, una formulación líquida que contiene un anticuerpo de la presente invención puede contener adicionalmente metionina en la solución, obteniéndose un efecto sinérgico mediante el uso de arginina y metionina en combinación. Por lo tanto, un segundo aspecto de la presente invención se caracteriza por la adición de arginina y metionina a una solución, de manera que en concreto la dimerización de las moléculas de anticuerpo queda inhibida en la formulación líquida que contiene un anticuerpo resultante. Por consiguiente, una forma de realización como formulación líquida estable que contiene un anticuerpo se caracteriza porque contiene un anticuerpo, arginina y metionina en una solución tampón.

Como arginina utilizada en la presente invención, puede utilizarse cualquiera de el compuesto de arginina *per se*, derivados del mismo y sales del mismo. Resultan preferentes L-arginina y sales de la misma. Como metionina utilizada en la presente invención, puede utilizarse cualquiera de el compuesto de metionina *per se*, derivados del mismo y sales del mismo. Resultan preferentes L-metionina y sales de la misma.

En los casos en los que la formulación líquida que contiene un anticuerpo de acuerdo con la presente invención contenga arginina y metionina, la concentración total de arginina y metionina es preferentemente de 50 a 1.200 mM; más preferentemente la concentración de arginina es de 50 a 700 mM y la concentración de metionina es de 10 a 100 mM; y aún más preferentemente, la concentración de arginina es de 100 a 300 mM, y la concentración de metionina es de 10 a 50 mM.

La solución tampón se prepara utilizando un agente tampón que es una sustancia para mantener el pH de la solución. En una formulación líquida que contiene un anticuerpo a alta concentración de acuerdo con la presente invención, el pH de la formulación es preferentemente de 4 a 8, más preferentemente de 5,0 a 7,5, aún más preferentemente de 5,5 a 7,2, y aún más preferentemente de 6,0 a 6,5. Un agente tampón que puede utilizarse en la presente invención es uno que puede ajustar el pH en este intervalo y que es farmacéuticamente aceptable. Un agente tampón de este tipo es conocido por los expertos en la materia, y ejemplos del mismo incluyen sales inorgánicas tales como sales de ácido fosfórico (sodio o potasio) e hidrogenocarbonato de sodio; sales de ácidos orgánicos tales como sales de ácido cítrico (sodio o potasio), acetato de sodio y succinato de sodio; y ácidos tales como ácido fosfórico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico y ácido glucónico. Además, también pueden utilizarse tampones Tris, tampones de Good tales como MES, MOPS y HEPES, histidina (por ejemplo, sal de ácido clorhídrico de histidina) y glicina. En la formulación líquida que contiene un anticuerpo a alta concentración de acuerdo con la presente invención, el tampón es preferentemente un tampón de histidina o un tampón de glicina, y resulta especialmente preferente un tampón de histidina. La concentración de la solución tampón es generalmente de 1 a 500 mM, preferentemente de 5 a 100 mM, aún más preferentemente de 10 a 20 mM. En los casos en los que se utiliza un tampón de histidina, la solución tampón contiene histidina a una concentración de preferentemente 5 a 25 mM, más preferentemente de 10 a 20 mM.

Para la formulación líquida "estable" que contiene un anticuerpo a alta concentración de acuerdo con la presente invención, no se observa un cambio significativo cuando se almacena a temperatura de refrigeración (2 a 8°C) durante por lo menos 12 meses, preferentemente durante 2 años, y más preferentemente durante 3 años; o cuando se almacena a temperatura ambiente (22 a 28°C) durante por lo menos 3 meses, preferentemente 6 meses, y más preferentemente 1 año. Por ejemplo, la cantidad total de dímeros y productos de degradación en la formulación cuando se almacena a 5°C durante 2 años es 5,0% o inferior, preferentemente 2% o inferior, y más preferentemente 1,5% o inferior; o la cantidad total de dímeros y productos de degradación en la formulación cuando se almacena a 25°C durante 6 meses es 5,0% o inferior, preferentemente 2% o inferior, y más preferentemente 1,5% o inferior.

La formulación de acuerdo con la presente invención puede contener adicionalmente un tensioactivo.

Ejemplos típicos de tensioactivos incluyen tensioactivos no iónicos, por ejemplo, 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 glicerol, monomiristato de glicerol y monoestearato de glicerol; ésteres de ácidos grasos de poliglicerol tales como monoestearato de decaglicerilo, diestearato de decaglicerilo y monolinoleato de decaglicerilo; ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitán tales como monolaurato de polioxietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, monoestearato de polioxietilensorbitán, 5 monopalmitato de polioxietilensorbitán, trioleato de polioxietilensorbitán y triestearato de polioxietilensorbitán; ésteres de ácidos grasos de polioxietilensorbitol tales como tetraestearato de polioxietilensorbitol y tetraoleato de polioxietilensorbitol; ésteres de ácidos grasos de polioxietilenglicerina tales como monoestearato de polioxietilenglicerina; ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol tales como diestearato de polietilenglicol; alquil éteres de polioxietileno tales como lauril éter de polioxietileno; alquil éteres de polioxietileno polioxipropileno tales como glicol éter de polioxietileno polioxipropileno, propil éter de polioxipropileno polioxietileno y cetil éter de polioxietileno polioxipropileno; alquil fenil éteres de polioxietileno tales como nonilfenil éter de polioxietileno; aceites de ricino endurecidos polioxietilenados tales como aceite de ricino polioxietilenado y aceite de ricino endurecido polioxietilenado (aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado); derivados de cera de abeja de polioxietileno tales como cera de abeja de polioxietilensorbitol; derivados de polioxietilanolina tales como lanolina de polioxietileno; 10 tensioactivos que tienen un HLB de 6 a 18 tales como amidas de ácidos grasos de polioxietileno, por ejemplo, polioxietilen octadecanamida; tensioactivos aniónicos, por ejemplo, sales de sulfato de alquilo que tiene un grupo alquilo C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>, tales como cetil sulfato de sodio, lauril sulfato de sodio y oleil sulfato de sodio; sales de alquil éter sulfato de polioxietileno en las que el número medio de moles de las unidades de óxido de etileno añadidas es de 2 a 4 y el número de átomos de carbono del grupo alquilo es de 10 a 18, tales como polioxietilen lauril sulfato de sodio; 20 sales de sulfosuccinato de alquilo que tienen un grupo alquilo C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>, tales como lauril sulfosuccinato de sodio; tensioactivos naturales tales como lecitina y glicerofosfolípidos; esfingofosfolípidos tales como esfingomielina, y ésteres de sacarosa de ácidos grasos C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>. Estos tensioactivos pueden añadirse a la formulación de la presente invención de forma individual, o pueden añadirse dos o más de estos tensioactivos en combinación.

25 Los tensioactivos preferentes son ésteres de ácidos grasos polioxietilensorbitán y alquil éteres de polioxietileno polioxipropileno, y son especialmente preferentes los polisorbatos 20, 21, 40, 60, 65, 80, 81 y 85, y los tensioactivos de tipo Pluronic, y los más preferentes son los polisorbatos 20 y 80, y Pluronic F-68 (Poloxámero 188).

30 La cantidad de tensioactivo(s) que se añade(n) a la formulación de anticuerpo de acuerdo con la presente invención es generalmente del 0,0001 al 10% (p/v), preferentemente del 0,001 al 5%, más preferentemente del 0,005 al 3%.

En otro aspecto de la presente invención, la formulación de acuerdo con la presente invención está preferentemente compuesta básicamente por los siguientes componentes:

- 35 A) anticuerpo anti-receptor de IL-6;  
 B) arginina y metionina, y otro(s) aminoácido(s) adicional(es) (por ejemplo, triptófano) como componente(s) adicional(es) opcional(es);  
 C) agente(s) tampón; y  
 D) tensioactivo(s).

40 La expresión "compuesta básicamente por" en el presente documento significa que no está contenido un elemento distinto de los componentes añadidos normalmente a las formulaciones, siendo los componentes añadidos normalmente a las formulaciones los componentes excipientes opcionales que se describen más adelante, tales como agentes de suspensión, agentes solubilizantes, agentes isotónicos, conservantes, inhibidores de la adsorción, 45 diluyentes, vehículos, ajustadores de pH, lenitivos, agentes reductores que contienen azufre y antioxidantes.

La expresión "B) arginina y metionina, y otro(s) aminoácido(s) adicional(es) (por ejemplo, triptófano) como componente(s) adicional(es) opcional(es)", anteriormente descrita, pretende incluir los casos en los que la formulación contiene arginina y metionina e incluye adicionalmente los casos en los que la formulación contiene 50 adicionalmente otro(s) aminoácido(s). Un ejemplo preferente del otro o de los otros aminoácidos es el triptófano. Como triptófano, puede utilizarse cualquiera del compuesto de triptófano *per se*, derivados del mismo y sales del mismo. Resultan preferentes L-triptófano y sales del mismo.

Según sea necesario, pueden añadirse a la formulación un agente de suspensión, agente solubilizante, agente isotónico, conservante, inhibidor de la adsorción, diluyente, vehículo, ajustador de pH, lenitivo, agente reductor que 55 contiene azufre, antioxidante y similares de acuerdo con la presente invención.

Ejemplos del agente de suspensión incluyen metilcelulosa, polisorbato 80, hidroxietilcelulosa, goma arábiga, tragacanto en polvo, carboximetilcelulosa de sodio y monolaurato de polioxietilensorbitán.

60 Ejemplos del agente solubilizante incluyen, aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado, polisorbato 80, nicotinamida, monolaurato de polioxietilensorbitán, macrogol y etiléster de ácido graso de aceite de ricino.

Ejemplos del agente isotónico incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio.

65 Ejemplos del conservante incluyen *p*-hidroxibenzoato de metilo, *p*-hidroxibenzoato de etilo, ácido sórbico, fenol,

cresol y clorocresol.

Ejemplos del inhibidor de la adsorción incluyen seroalbúmina humana, lecitina, dextrano, copolímero de óxido de propileno-óxido de etileno, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, aceite de ricino hidrogenado polioxietileno y polietilenglicol.

Ejemplos del agente reductor que contiene azufre incluyen los compuestos que tienen un(os) grupo(s) sulfhidrilo, tales como N-acetilcisteína, N-acetil homocisteína, ácido tióctico, tioglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico y sales de los mismos, tiosulfato de sodio, glutatión y tioalcanos C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>.

Ejemplos del antioxidante incluyen ácido eritórbito, dibutilhidroxitolueno, hidroxianisol butilado, α-tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico y sales de los mismos, palmitato de L-ascorbilo, estearato de L-ascorbilo, hidrogenosulfito de sodio, sulfito de sodio, galato de triamillo, galato de propilo, y agentes quelantes tales como etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA), pirofosfato de sodio y metafosfato de sodio.

La formulación líquida que contiene un anticuerpo de acuerdo con la presente invención se administra habitualmente por vía parenteral, por ejemplo, por inyección (inyecciones intramusculares, subcutáneas, intravenosas o similares), administración percutánea, transmucosa, transnasal o pulmonar, pero también puede administrarse por vía oral. En la inyección subcutánea, la dosis de anticuerpo por administración es grande (aproximadamente de 100 a 200 mg), mientras que la cantidad de solución para inyección es limitada, de manera que la formulación de acuerdo con la presente invención resulta especialmente adecuada para la inyección subcutánea.

La relación de presión osmótica de la formulación líquida que contiene un anticuerpo de acuerdo con la presente invención es preferentemente de aproximadamente 0,5 a 4, más preferentemente de aproximadamente 0,7 a 2, y aún más preferentemente de aproximadamente 1.

La viscosidad de la formulación líquida que contiene un anticuerpo de acuerdo con la presente invención es preferentemente de aproximadamente 2 a 15 mPa·s, más preferentemente de aproximadamente 4 a 10 mPa·s. Hay que reseñar que la viscosidad descrita en el presente documento se mide por un método de viscosímetro de rotación utilizando un viscosímetro de cono-placa, de acuerdo con el punto 2.53 Viscosity Determination/General Tests, de la 15ª edición de la Japanese Pharmacopoeia.

Como puede observarse a partir de los resultados de los ejemplos que se describen más adelante, puede obtenerse una formulación líquida estable, en la que la dimerización y la desamidación del anticuerpo durante el almacenamiento a largo plazo sean escasas, añadiendo a la formulación arginina sola, o arginina y metionina, o metionina sola.

Como otro aspecto más de la presente invención, se proporciona un método para inhibir la dimerización de un anticuerpo en formulaciones líquidas que contienen un anticuerpo, comprendiendo el método añadir a la formulación arginina y metionina.

En los dos métodos descritos anteriormente, el anticuerpo es preferentemente un anticuerpo anti-receptor de IL-6, que es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.

La presente invención se describirá a continuación en mayor detalle por medio de los ejemplos que se dan a continuación. Sin embargo, el alcance de la presente invención no se limita a los mismos.

## Ejemplos

### Muestra de anticuerpo

El anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6 fue el anticuerpo humanizado preparado de acuerdo con el método descrito en el Ejemplo de Referencia 2 del documento JP 8-99902 A que utiliza el factor de elongación humano 1α descrito en el Ejemplo 10 del documento WO 92/19759. Este anticuerpo se denominará en ocasiones "MRA" en las tablas de los Ejemplos.

### **Ejemplo 1**

#### Efectos estabilizadores de la combinación de arginina y metionina

Se evaluaron las formulaciones líquidas que contenían un anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6 para verificar su influencia en la estabilización de las formulaciones obtenidas mediante el uso de una combinación de arginina y metionina.

En este estudio, para evaluar los efectos de la combinación de arginina y metionina, se prepararon muestras de evaluación numeradas de A1 a A9. Las recetas para las muestras de evaluación fueron las siguientes:

[Tabla 1-1]

[Recetas]						
Nº de muestra	Anticuerpo mg/ml	Arg mM	Met mM	Polisorbato 80 mg/ml	Tampón de histidina mM	pH
A1	180	-	-	0,5	20	6,0
A2	180	50	-	0,5	20	6,0
A3	180	100	-	0,5	20	6,0
A4	180	150	-	0,5	20	6,0
A5	180	200	-	0,5	20	6,0
A6	180	300	-	0,5	20	6,0
A7	180	100	10	0,5	20	6,0
A8	180	100	30	0,5	20	6,0
A9	180	100	50	0,5	20	6,0

Las muestras A1 a A6 son ejemplos comparativos.

- 5 Para evaluar la estabilidad de las formulaciones líquidas, se sometió cada muestra a un ensayo de aceleración por calor (almacenada a 40°C durante 3 meses y a 25°C durante 6 meses, respectivamente). Se evaluó la pureza del anticuerpo antes y después del ensayo de aceleración por calor por cromatografía de permeación en gel (SEC). Las condiciones analíticas fueron como sigue:

10 [Cromatografía de permeación en gel]

La muestra se utilizó como solución a medir tal cual.

- 15 Se sometió a cromatografía líquida un microlitro de la solución a medir, y se midieron las áreas de pico de los picos del dímero, del monómero y de los productos de degradación de bajo peso molecular (LMW) por un método analítico automático, y se determinaron las cantidades de los mismos (%).

[Tabla 1-2]

20 Condiciones analíticas

- 25 Columna: TSKgel G3000SWx1 7,8 mm I.D. x 30 cm (TOSOH)  
 Fase móvil: tampón fosfato, pH 7,0 (50 mmol/l de tampón fosfato, pH 7,0, que contenía 300 mmol/l de cloruro de sodio y de azida de sodio al 0,05%)  
 Cantidad de muestra inyectada: aproximadamente 180 µg en términos de anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6  
 Caudal: 1 ml/min  
 30 Longitud de onda de detección: 280 nm

[Fórmula 1]

35 Ecuación de cálculo

40 **Área Total de Todos los Picos = Área de pico del Monómero + Área de pico del Dímero + Área de pico de los Productos de Degradación de Bajo Peso Molecular (LMW)**

40 **Cantidad de Dímero (%) = (Área de Pico del Dímero/Área Total de Todos los Picos) x 100**

45 **Cantidad de Productos de Degradación de Bajo Peso Molecular (LMW) (%) = (Área de Pico de los Productos de Degradación de Bajo Peso Molecular/Área Total de Todos los Picos) x 100**

En la Figura 1 se muestra una cromatografía típica.

- 50 En la Tabla 1 y en las Figuras 2 y 3 se muestran los resultados de la evaluación obtenidos mediante la cromatografía de permeación en gel (SEC). Como se muestra, la cantidad de dímero en las muestras (muestras nº A2 a A6) a las que se añadió arginina, después de la aceleración a 40°C durante 3 meses y a 25°C durante 6 meses, respectivamente, fue menor que en la muestra (muestra nº A1) a la que no se añadió arginina; y por consiguiente, se confirmó el efecto inhibitorio de la arginina en la dimerización. También se confirmó que la cantidad de dímero se reducía de manera proporcional a la cantidad de arginina añadida. Por otro lado, la cantidad de dímero en las muestras (muestras nº A7 a A9) a las que se añadió arginina (100 mM) y metionina, después de la aceleración a

40°C durante 3 meses y a 25°C durante 6 meses, respectivamente, fue menor que en las muestras (muestras nº A3 y A4) que contenían 150 mM de arginina, cuya concentración fue aproximadamente la misma que la concentración total de estabilizadores; y la cantidad de dímero fue aproximadamente la misma que en la muestra (muestra nº A6) que tenía una concentración de arginina de 300 mM. Se considera que estos resultados indican que combinando arginina y metionina se obtiene un efecto sinérgico en la inhibición de la dimerización.

No se observó influencia de la arginina y la metionina en la cantidad de productos de degradación de bajo peso molecular.

10 [Tabla 1-3]

Tabla 1

	40°C – 3 meses		25°C – 6 meses	
	Dímero (%)	LMW (%)	Dímero (%)	LMW (%)
A1	2,70	1,25	1,88	0,48
A2	2,19	1,24	1,41	0,47
A3	2,00	1,34	1,33	0,49
A4	1,85	1,38	1,19	0,49
A5	1,62	1,37	1,09	0,49
A6	1,53	1,46	0,99	0,50
A7	1,58	1,29	1,11	0,45
A8	1,52	1,21	1,07	0,47
A9	1,48	1,32	1,03	0,47

**Ejemplo 2** (no de acuerdo con la invención)

15

Efecto inhibitorio de la arginina en la desamidación

Se evaluaron las formulaciones líquidas que contenían un anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6 para verificar su influencia sobre la desamidación por la arginina.

20

En este estudio, se prepararon las muestras de evaluación numeradas de A10 a A15 y de A16 a A18, que contenían diferentes cantidades de arginina y metionina, respectivamente. Las recetas para las muestras de evaluación fueron las siguientes:

25

[Tabla 2-1]

[Recetas]						
Nº de muestra	Anticuerpo mg/ml	Arg mM	Met mM	Polisorbato 80 mg/ml	Tampón de histidina mM	pH
A10	180	-	-	0,5	20	6,0
A11	180	50	-	0,5	20	6,0
A12	180	100	-	0,5	20	6,0
A13	180	150	-	0,5	20	6,0
A14	180	200	-	0,5	20	6,0
A15	180	300	-	0,5	20	6,0
A16	180	-	10	0,5	20	6,0
A17	180	-	30	0,5	20	6,0
A18	180	-	50	0,5	20	6,0

Para evaluar la estabilidad de las formulaciones líquidas, se sometió cada muestra a un ensayo de aceleración por calor (almacenada a 40°C durante 3 meses y a 25°C durante 6 meses, respectivamente). La pureza del anticuerpo antes y después del ensayo de aceleración por calor se evaluó mediante cromatografía de intercambio iónico (IEC). Las condiciones analíticas fueron como sigue:

30

[Cromatografía de intercambio iónico]

Se añadió agua purificada a cada muestra para ajustar la cantidad del anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6 a aproximadamente 1 mg en 1 ml de la muestra, y la muestra resultante se utilizó como muestra a medir.

35

Se sometieron a cromatografía líquida treinta microlitros de la solución de muestra, y se midieron las áreas de pico de los picos de MRA Pre, MRA Principal, MRA Sub-1, MRA Sub-2, MRA R-1, MRA 1Q(H), MRA 2Q(H) y otras sustancias relacionadas (Otros) por un método analítico automático, y se determinaron las cantidades de los mismos (%) por un método de porcentaje de área.

40

MRA Pre indica el total de los picos de las sustancias cada una eluida después de un tiempo de retención menor que el del componente principal, y se incluyó una pluralidad de productos de degradación, principalmente productos

de desamidación del anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6. Cuando la cantidad de producción de este pico Pre era pequeña, se indica la inhibición de la desaminación del anticuerpo.

[Tabla 2-2]

5

Condiciones analíticas

Columna: ProPac WCX-10 4 x 250 mm (DIONEX)

Fase móvil: Solución A: 25 mmol/l de solución tampón MES, pH 6,1

10 Fase móvil: Solución B: 25 mmol/ml de solución tampón MES, pH 6,1 (que contenía 250 mmol/l de cloruro de sodio)

Cantidad de muestra inyectada: aproximadamente 30 µg en términos de anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6

Caudal: 0,5 ml/min

15 Longitud de onda de detección: 280 nm

[Fórmula 2]

Ecuación de cálculo

20

**Área Total de Todos los Picos = Total General de Todo el Área de los Picos MRA Pre + Área de Pico MRA Principal + Área de pico MAR Sub-1 + Área de pico MAR Sub-2 + Área de pico MAR Sub-3 + Área de pico MAR R-1 + Área Total de los Picos 1Q(H)-MRA + Área total de los Picos 2Q(H)-MRA + Área Pico de Otros**

25 **Cantidad de MRA Pre (%) = (Área Total de los Picos MRA Pre/Área Total de Todos los Picos) x 100**

En la Figura 4 se muestra una cromatografía típica. MRA Pre indica el total de los picos de las sustancias que aparecen antes que el del componente principal.

30 En la Tabla 2 y en las Figuras 5 y 6 se muestran los resultados de la evaluación de la cromatografía de intercambio iónico. Como se muestra, la cantidad de picos Pre en las muestras (muestras nº A11 a A15) a las que se añadió arginina, después de la aceleración a 40°C durante 3 meses y a 25°C durante 6 meses, respectivamente, fue menor que la de la muestra (muestra nº A10) a la que no se añadió arginina; y por consiguiente, se confirmó el efecto inhibidor de la arginina en la generación de picos Pre. También se confirmó que la cantidad de picos Pre se reducía de manera proporcional a la cantidad de arginina añadida. Por otro lado, la cantidad de picos Pre en las muestras (muestras nº A16 a A18) a las que se añadió metionina, después de la aceleración a 40°C durante 3 meses y a 25°C durante 6 meses, respectivamente, fue similar a la muestra (muestra nº A10) a la que no se añadió arginina; y por consiguiente, no se observó influencia de la adición de metionina.

40 [Tabla 2-3]

Tabla 2

	Pico Pre (%)	
	40°C – 3 meses	25°C – 6 meses
A10	56,2	32,3
A11	51,3	30,3
A12	50,7	29,3
A13	49,0	28,7
A14	47,8	28,5
A15	47,0	27,9
A16	55,7	31,2
A17	55,0	31,2
A18	55,3	31,4

**Ejemplo 3**

45

Efectos estabilizadores de la combinación de arginina y metionina (2)

Como en el Ejemplo 1, se evaluaron las formulaciones líquidas que contenían un anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6 para verificar su influencia en la estabilización de las formulaciones obtenidas mediante el uso de una combinación de arginina y metionina.

50

En este estudio, para evaluar los efectos de la combinación de arginina y metionina, se prepararon muestras de evaluación numeradas de A19 a A27. Las recetas para las muestras de evaluación fueron las siguientes:

[Tabla 3-1]

[Recetas]						
Nº de muestra	Anticuerpo mg/ml	Arg mM	Met mM	Polisorbato 80 mg/ml	Tampón de histidina mM	pH
A19	180	-	-	0,5	20	6,0
A20	180	50	-	0,5	20	6,0
A21	180	100	-	0,5	20	6,0
A22	180	150	-	0,5	20	6,0
A23	180	200	-	0,5	20	6,0
A24	180	300	-	0,5	20	6,0
A25	180	100	10	0,5	20	6,0
A26	180	100	30	0,5	20	6,0
A27	180	100	50	0,5	20	6,0

Las muestras A19 a A24 son ejemplos comparativos.

5

Para evaluar la estabilidad de las formulaciones líquidas, se sometió cada muestra a un ensayo de aceleración por luz (iluminancia total de 1.200.000 lux y energía de radiación cercana al ultravioleta total: 200 W·h/m<sup>2</sup>). Se evaluó la pureza del anticuerpo antes y después del ensayo de aceleración por luz mediante cromatografía de permeación en gel (SEC) y mediante cromatografía de intercambio iónico (IEC) como en los Ejemplos 1 y 2.

10

En la Tabla 3 y en la Figura 7 se muestran los resultados de la evaluación mediante la cromatografía de permeación en gel (SEC). Como se muestra, la cantidad de dímero en las muestras (muestras N° A20 a A24) a las que se añadió arginina, después del ensayo de aceleración por luz fue menor que la de la muestra (muestra n° A19) a la que no se añadió arginina; y por consiguiente, se confirmó el efecto inhibidor de la arginina en la dimerización. También se confirmó que la cantidad de dímero se reducía de manera proporcional a una cantidad de arginina añadida. Por otro lado, la cantidad de dímero en las muestras (muestras n° A25 a A27) a la que se añadió arginina (100 mM) y metionina, después del ensayo de aceleración por luz fue menor que la de la muestra (muestra n° A22) que contenía 150 mM de arginina, cuya concentración era aproximadamente la misma que la concentración total de estabilizadores; y la cantidad de dímero fue menor que en las muestras (muestras n° A23 y A24) que tenían unas concentraciones de arginina de 200 mM y 300 mM, respectivamente. Se piensa que estos resultados indican que combinando arginina y metionina se obtiene un efecto sinérgico en la inhibición de la dimerización.

15

20

No se observó influencia de la arginina y la metionina en la cantidad de productos de degradación de bajo peso molecular.

25

[Tabla 3-2]

Tabla 3

	1.200.000 lux + 200 W·h/m <sup>2</sup>	
	Dímero (%)	LMW (%)
A19	6,95	0,22
A20	6,75	0,24
A21	5,78	0,21
A22	5,08	0,19
A23	4,73	0,18
A24	4,13	0,18
A25	5,27	0,19
A26	4,05	0,17
A27	3,84	0,16

30

A continuación, en la Tabla 4 y en la Figura 8 se muestran los resultados de la evaluación mediante cromatografía de intercambio iónico (IEC).

35

Como se muestra, la cantidad de pico Pre en las muestras (muestras n° A20 a A24) a las que se añadió arginina, después del ensayo de aceleración por luz fue menor que la de la muestra (muestra n° A19) a la que no se añadió arginina; y por consiguiente se confirmó el efecto inhibidor de la arginina en la formación del pico Pre. Además, se confirmó que a medida que aumenta la cantidad de arginina, disminuye de manera proporcional la cantidad de producción del pico Pre. Por otro lado, la cantidad de dímero después del ensayo de aceleración por luz en las muestras (muestras n° A25 a A27) a las que se añadió metionina adicionalmente a la arginina (100 mM) fue menor que en la muestra (muestra n° A22) que contenía 150 mM de arginina, cuya concentración fue aproximadamente la misma que la concentración total de estabilizadores; y fue menor que en las muestras (muestras n° A23 y A24) que tenían concentraciones de arginina de 200 mM y 300 mM, respectivamente. Se piensa que estos resultados indican que combinando arginina y metionina se obtiene un efecto sinérgico en la inhibición del pico Pre.

40

[Tabla 4]

	Pico Pre (%)
	1.200.000 lux + 200 W·h/m <sup>2</sup>
A19	39,2
A20	38,6
A21	36,7
A22	35,7
A23	34,9
A24	34,9
A25	36,8
A26	35,0
A27	33,8

## REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n l3quida estable que contiene un anticuerpo que comprende de 40 a 1.000 mM de arginina y de 10 a 200 mM de metionina.
2. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, que comprende adicionalmente un agente tamp3n de histidina.
3. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 2 que comprende adicionalmente un tensioactivo.
4. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 3, que contienen el anticuerpo en una cantidad de por lo menos 50 mg/ml.
5. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 3 que contienen el anticuerpo en una cantidad de por lo menos 100 mg/ml.
6. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 3, que contienen el anticuerpo en una cantidad de por lo menos 120 mg/ml.
7. Formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, en la que el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor de IL-6.
8. Formulaci3n seg3n cualquiera de las reivindicaciones 4 a 7, que tiene un pH en el intervalo comprendido entre 4 y 8.
9. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 8, en la que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
10. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 8, en la que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6, la cantidad de tensioactivo es del 0,0001 al 10% (p/v), la concentraci3n de la soluci3n tamp3n de histidina es de 1 a 500 mM, y la concentraci3n del anticuerpo es.
11. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 8, en la que el anticuerpo es el anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6 MRA, la concentraci3n de arginina es de 50 a 700 mM, la concentraci3n de metionina es de 10 a 100 mM, la cantidad de polisorbato 80 como tensioactivo es del 0,005 al 3% (p/v), la concentraci3n de la soluci3n tamp3n de histidina es de 5 a 100 mM, y la concentraci3n del anticuerpo es de 100 a 300 mg/ml.
12. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 10 u 11, que comprende adicionalmente tript3fano.
13. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 10 u 11, que tiene una viscosidad de 2 a 15 mPa·s.
14. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 10 u 11, que es estable a 22-28°C durante por lo menos 6 meses.
15. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 10 u 11, en la que la dimerizaci3n de las mol3culas de anticuerpo est3 inhibida.
16. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 10 u 11, en la que la desamidaci3n de las mol3culas de anticuerpo est3 inhibida.
17. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 10 u 11, que es para administraci3n subcut3nea.
18. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 10 u 11, que no ha sido sometida a liofilizaci3n durante la preparaci3n de la formulaci3n.
19. M3todo para inhibir la dimerizaci3n de las mol3culas de un anticuerpo en una formulaci3n l3quida que contiene el anticuerpo, que comprende la adici3n de arginina a la formulaci3n l3quida.
20. M3todo seg3n la reivindicaci3n 19, en el que el anticuerpo es un anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6, y la formulaci3n comprende de 50 a 300 mg/ml del anticuerpo, de 1 a 500 mM de un agente tamp3n de histidina, y del 0,0001 al 10% (p/v) de un tensioactivo, y tiene un pH de 4 a 8, y en el que la arginina se a3ade a la formulaci3n en la cantidad de 40 a 1.000 mM, y la metionina en la cantidad de 10 a 200 mM.
21. M3todo seg3n la reivindicaci3n 19, en el que el anticuerpo es el anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-6 MRA, y la formulaci3n comprende de 100 a 300 mg/ml del anticuerpo, de 5 a 100 mM de un agente tamp3n de histidina, y del 0,005 al 3% (p/v) de polisorbato 80, y tiene un pH de 4 a 8, y en el que la arginina se a3ade a la formulaci3n en la cantidad de 50 a 700 mM, y la metionina en la cantidad de 10 a 100 mM.

Fig. 1

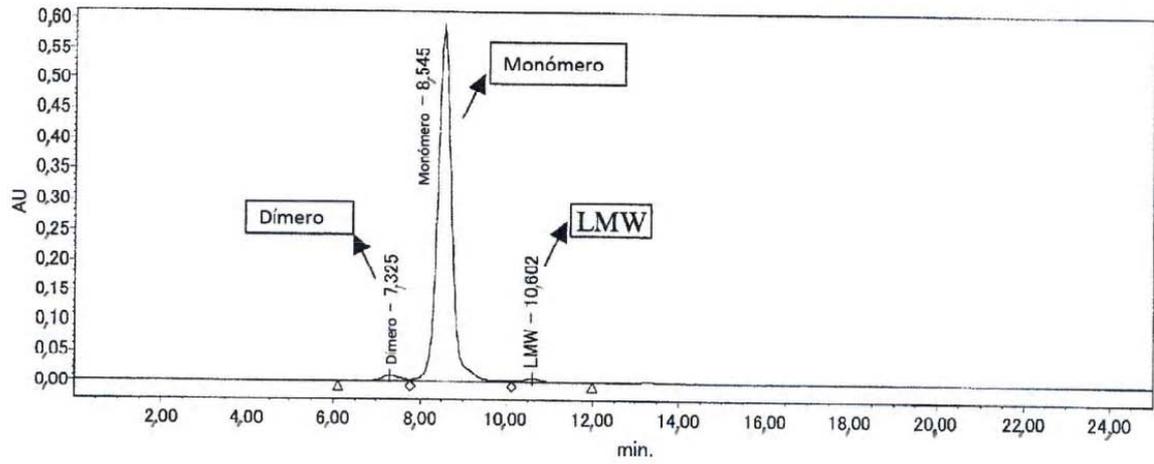


Fig. 2

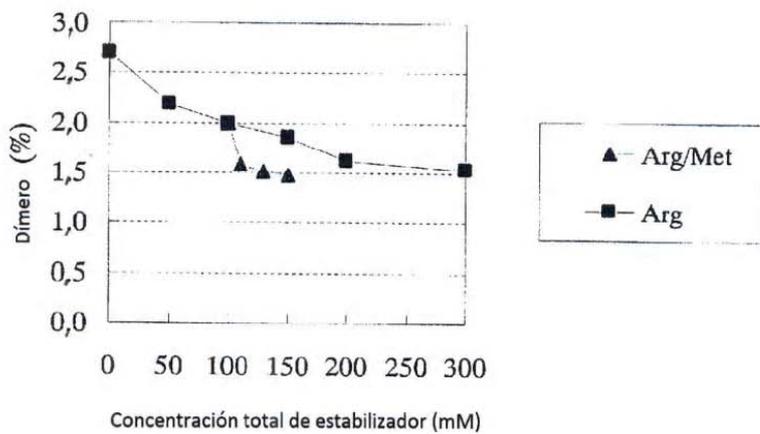


Fig. 3

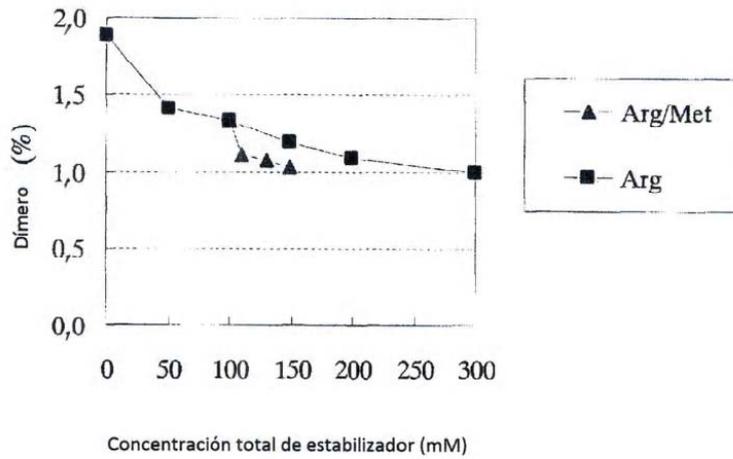
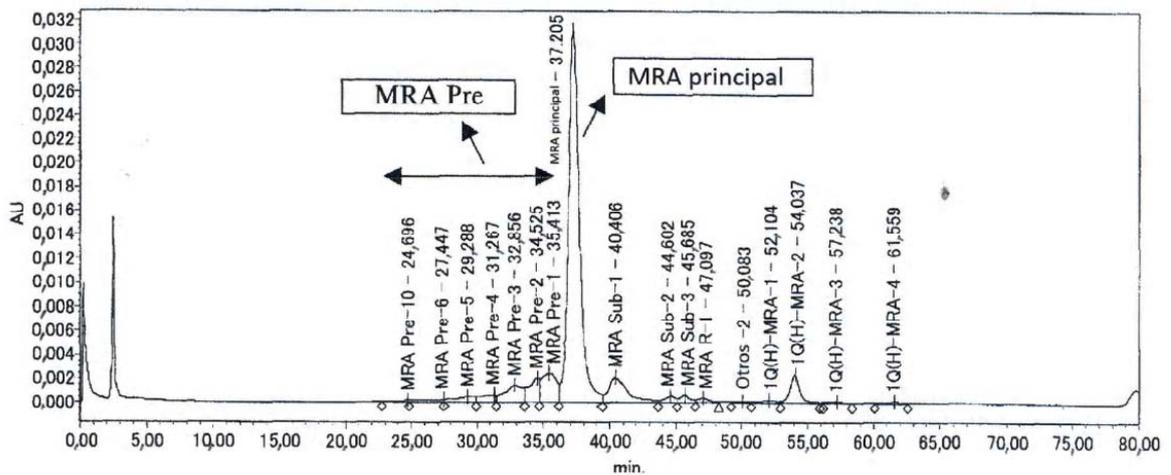
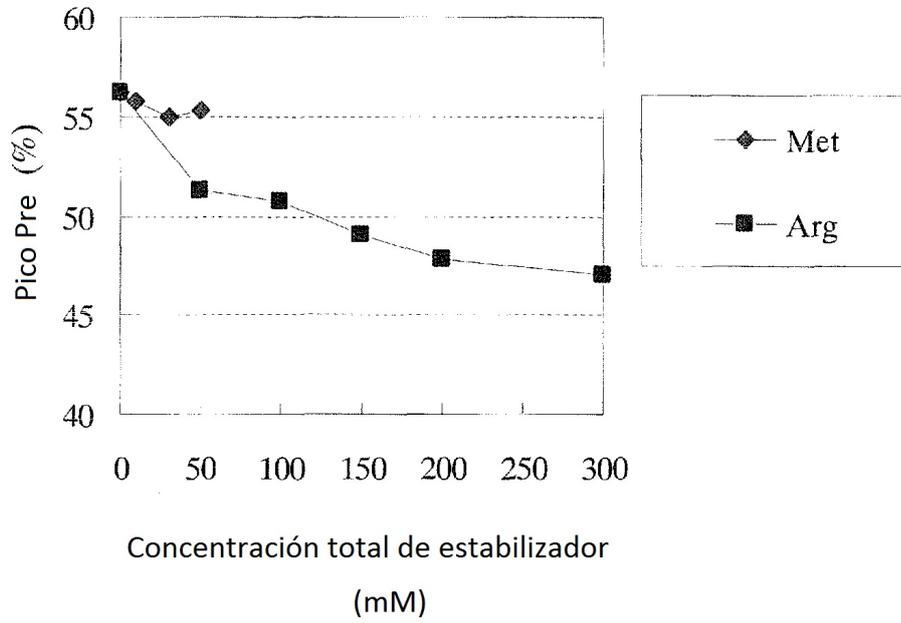


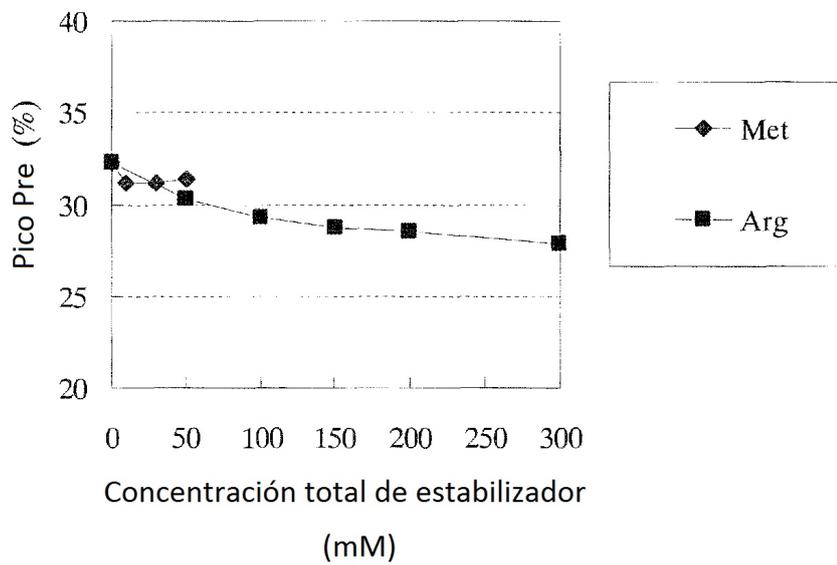
Fig. 4



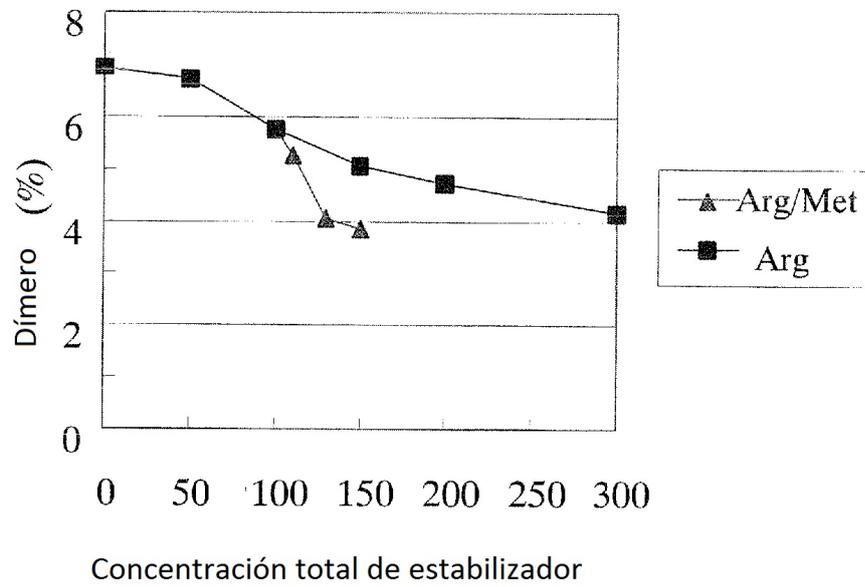
*Fig. 5*



*Fig. 6*



*Fig. 7*



*Fig. 8*

