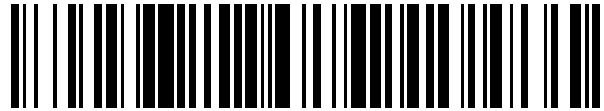


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 392 073**

51 Int. Cl.:

**A01N 37/18** (2006.01)

**A61K 38/00** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02802895 .9**

96 Fecha de presentación: **08.11.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1441589**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.08.2004**

54

Título: **Formulación farmacéutica líquida estable de anticuerpos IGG**

30

Prioridad:

**08.11.2001 US 337509 P**

45

Fecha de publicación de la mención BOPI:

**04.12.2012**

45

Fecha de la publicación del folleto de la patente:

**04.12.2012**

73

Titular/es:

**ABBOTT BIOTHERAPEUTICS CORP. (100.0%)  
1500 Seaport Boulevard  
Redwood City, CA 94063, US**

72

Inventor/es:

**KAISHEVA, ELIZABET A.;  
GUPTA, SUPRIYA;  
DUVUR, SHANTI G. y  
SUBRAMANIAN, MALATHY**

74

Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 392 073 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 líquida estable de anticuerpos IGG.

## 5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general al campo de la formulación farmacéutica de anticuerpos. Específicamente, la presente invención se refiere a una formulación de un anticuerpo muy concentrada, líquida y estable. Esta invención es ejemplificada por una formulación líquida estabilizada de Daclizumab, un anticuerpo anti-receptor de IL2; HAIL-12, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-IL-12; y HuEP5C7, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-selectina L.

## Antecedentes de la invención

15 Muchas preparaciones de proteínas destinadas al uso humano requieren estabilizadores para evitar la desnaturalización, agregación y otras alteraciones de las proteínas, antes de usarlas en la preparación. Esta inestabilidad se manifiesta en la formación de macropartículas solubles/insolubles, y a menudo aumenta cuando la preparación de la proteína es almacenada en el tiempo y durante el transporte. Una meta importante en el desarrollo de formulaciones farmacológicas de proteínas es mantener la solubilidad, la estabilidad y la bioactividad de la proteína.

Se sabe que, en particular, las inmunoglobulinas poseen características que tienden a formar agregados y macropartículas en solución y de por sí, pueden requerir filtración antes de su uso para inyección intravenosa o subcutánea. La formación de agregados y macropartículas de proteínas ha sido un problema en el desarrollo de productos de inmunoglobulinas parenterales, especialmente cuando las inmunoglobulinas se formulan en altas concentraciones. Synagis™ (MedImmune) es un anticuerpo IgG1 monoclonal humanizado producido mediante tecnología de recombinación del ADN, dirigido a un epítipo en el sitio antigénico A de la proteína T del virus respiratorio sincitial (VRS). Synagis™ es una combinación de secuencias de anticuerpos humanos (90%) y murinos (10%). Synagis™ se suministra como un producto liofilizado estéril para reconstrucción con agua estéril para inyección. Synagis™ reconstituido se debe administrar únicamente por inyección intramuscular. Tras la reconstitución, Synagis™ contiene los excipientes siguientes: histidina 47 mM, glicina 3.0 mM, 5.6% de manitol y el principio activo, anticuerpo IgG1, a una concentración de 100 mg/vial. Synagis™ reconstituido se debe administrar en las 6 horas siguientes a su reconstitución.

35 WO 89/11297 da a conocer una formulación liofilizada de un anticuerpo monoclonal que consiste en una formulación liofilizada de 1-25 mg/ml de anticuerpo monoclonal IgG, 2-10% de maltosa y tampón de acetato, fosfato o citrato de sodio con un pH entre 3.0 y 6.0.

40 WO 97/45140 da a conocer una preparación acuosa de anticuerpo anti-CD4 concentrada hasta aproximadamente 100 mg/ml en citrato de sodio 100 mM, EDTA 0.05 mM, pH 6.0. La solicitud da a conocer un ligero aumento en la turbidez después de la concentración del anticuerpo, que probablemente refleje la agregación de la proteína. Eliminar esta agregación requiere la adición de polisorbato 80 y filtración aséptica.

45 WO 90/11091 da a conocer composiciones acuosas inyectables que contienen aproximadamente 5 mg/ml de IgM, 2.5-5% (p/v) de albúmina sérica humana, en tampón de fosfato 8-20 mM y cloruro de sodio 270 mM, pH 6.8-7.4.

La patente U.S. 6,171,586 da a conocer una formulación farmacéutica acuosa estable, que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo que no fue sometido a liofilización previa, un tampón de acetato de pH entre aproximadamente 4.8 y aproximadamente 5.5, un tensioactivo y un poliol, donde la formulación carece de una cantidad tonificante de cloruro de sodio.

55 La publicación de la solicitud de patente U.S. 2001/0014326A1 da a conocer una formulación de un anticuerpo pre-liofilizado que contiene 25 mg/ml de anticuerpo anti-IgE, histidina 5 mM de pH 6.0, sacarosa 85 mM y 0.01% de polisorbato 20.

La patente U.S. 5,744,132 da a conocer una composición que contiene 1-1000 µg/ml de anticuerpo IL-12, 2% de sacarosa, 4.15% de manitol, succinato de sodio 10 mM y aproximadamente 0.02% de Tween® 20, con un pH de aproximadamente 5.6.

60 La patente U.S. 6,267,958 da a conocer una formulación reconstituida de 100 mg/ml de rhuMab E25, en histidina 20 mM, pH 6.0, sacarosa 340 mM, 0.04% de polisorbato 20 y 0.9% de alcohol bencílico.

65 La patente U.S. 6,165,467 da a conocer un proceso para estabilizar una composición de un anticuerpo monoclonal humano producido por la línea celular hibridoma número de registro HB8307, que consiste en dializar el anticuerpo monoclonal humano en una solución de tampón de fosfato estabilizada con sal con un pH de 7.2 a 7.4, dicha solución contiene 1-20 mg de D-manitol por mg de dicho anticuerpo monoclonal, 0.005-0.2 milimol de glicina por mg

de dicho anticuerpo monoclonal y una cantidad sal de fosfato estabilizadora del pH para estabilizar el pH de dicha solución.

5 Existe la necesidad de una preparación líquida estable de un anticuerpo, donde la concentración de anticuerpo sea de 50 mg/ml o mayor; que dicha preparación sea adecuada para la administración parenteral, incluida la inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea a un ser humano.

Resumen de la invención.

10 Esta invención apunta a una formulación farmacéutica líquida estable, que contiene una alta concentración, por ejemplo, más de 50 mg/ml, de un anticuerpo en tampón de succinato 20-60 mM o tampón de histidina 30-70 mM (pH entre aproximadamente 5.5 y aproximadamente 6.5), un modificador de la tonicidad y aproximadamente 0.01-0.1% de polisorbato. Esta formulación conserva la estabilidad física, química y biológica del anticuerpo y evita que las inmunoglobulinas destinadas a la administración a sujetos humanos formen agregados y macropartículas en el  
15 producto final. Los anticuerpos preferidos de esta invención incluyen Daclizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-receptor de IL-2; HAIL-12, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-IL-12; y HuEP5C7, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-selectina L; y fontolizumab, un anticuerpo monoclonal humanizado anti-interferón gamma .

20 La formulación líquida del anticuerpo es estable a temperatura de refrigeración (2-8 °C) durante al menos 1 año y preferentemente 2 años. Esta formulación líquida también es estable a temperatura ambiente (23-27 °C) durante al menos seis meses. Esta formulación líquida es adecuada para inyección subcutánea.

Breve descripción de las figuras

25 La figura 1A muestra el porcentaje de formación de fragmentos, y la figura 1B muestra el porcentaje de agregados, a distintos niveles de pH tras una incubación de cuatro semanas de la muestra a 45 °C, evaluada por SEC-HPLC. La figura 2 muestra el porcentaje de degradación obtenido a distintos niveles de pH, evaluado por cIEF tras una incubación de cuatro semanas de la muestra a 45 °C.  
30 La figura 3 muestra el porcentaje de ácido iso-aspártico formado a distintos niveles de pH, evaluado con el kit de Promega IsoQuant tras una incubación de cuatro semanas de la muestra a 45 °C. La figura 4 muestra el efecto en el tiempo de diferentes tampones sobre la potencia tras la incubación a 37 °C.

Descripción detallada de la invención

35 I. Definición

En este documento, el término "tampón" abarca a aquellos agentes que mantienen el pH de la solución en un rango aceptable y puede incluir succinato (sodio), histidina, fosfato (sodio o potasio), Tris (tris (hidroximetil) aminometano), dietanolamina y análogos. El tampón de esta invención tiene un pH en el rango entre aproximadamente 5.5 y  
40 aproximadamente 6.5; y preferentemente tiene un pH de aproximadamente 6.0. Algunos ejemplos de tampones que controlarán el pH en este rango incluyen succinato (como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato fosfato y otros tampones de ácidos orgánicos.

45 "Excipientes farmacéuticamente aceptables" (vehículos, aditivos) son las sustancias inertes que pueden ser administradas razonablemente a un sujeto mamífero y proporcionan una dosis eficaz del principio activo empleado. Esas sustancias se agregan a una formulación para estabilizar la estructura física, química y biológica del anticuerpo. La expresión también se refiere a los aditivos que pueden ser necesarios para alcanzar una formulación isotónica, adecuada para el modo deseado de administración.

50 La expresión "formulación farmacéutica" se refiere a las preparaciones que son de tal forma que permiten que la actividad biológica de los principios activos sea inequívocamente eficaz, y que no contiene componentes adicionales que sean tóxicos para los sujetos a los que se administrará la formulación.

55 Una formulación "estable" es aquella en la cual la proteína conserva esencialmente la estabilidad física, la estabilidad química y la actividad biológica luego del almacenamiento. Se dispone en el área de diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas y se resumen 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). La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada durante un período determinado.

60 Una formulación líquida "estable" de un anticuerpo es una formulación líquida de un anticuerpo sin cambios significativos, observados a una temperatura de refrigeración (2-8 °C) durante al menos 12 meses, preferentemente 2 años y más preferentemente 3 años; o a temperatura ambiente (23-27 °C) durante al menos 3 meses, preferentemente 6 meses y más preferentemente 1 año. Los criterios de estabilidad son los siguientes. No más de  
65 10%, preferentemente 5% del monómero del anticuerpo se degrada según se mide por SEC-HPLC. La solución es incolora, o clara a ligeramente opalescente al análisis visual. La concentración, el pH y la osmolalidad de la

formulación no tienen más de +/-10% de cambio. La potencia es 70-130%, preferentemente 80-120% la del control. No se observa más de 10%, preferentemente 5% de fragmentación (hidrólisis). No se forma más de 10%, preferentemente 5% de agregación.

5 Un anticuerpo "conserva su estabilidad física" en una formulación farmacéutica si no se observa ningún aumento significativo de la agregación, precipitación y/o desnaturalización al examen visual de color y/o claridad, o cuando se mide mediante dispersión de la luz UV, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC) y dispersión dinámica de la luz. Además, la conformación de la proteína no se altera. Los cambios de conformación de la proteína se pueden evaluar por espectroscopia de fluorescencia, que determina la estructura terciaria de la proteína, y por espectroscopía FTIR, que determina la estructura secundaria de la proteína.

15 Un anticuerpo "conserva su estabilidad química" en una formulación farmacéutica, si no se observa ninguna alteración química significativa. La estabilidad química se puede evaluar mediante la detección y cuantificación de las formas de la proteína alteradas químicamente. Los procesos de degradación que suelen alterar la estructura química de las proteínas incluyen hidrólisis o fragmentación (evaluadas por métodos como cromatografía de exclusión por tamaño y SDS-PAGE), oxidación (evaluada por métodos como mapeo peptídico junto con espectroscopía de masas o MALDI/TOF/MS), desamidación (evaluada por métodos como cromatografía de intercambio iónico, enfoque isoeléctrico capilar, mapeo peptídico, medición de ácido isoaspártico) e isomerización (evaluada midiendo el contenido de ácido isoaspártico, mapeo peptídico, etc.).

20 Un anticuerpo "conserva su actividad biológica" en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado se encuentra dentro de un rango predeterminado de la actividad biológica exhibida en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica. La actividad biológica de un anticuerpo se puede determinar, por ejemplo, mediante un ensayo ELISA de unión al antígeno.

25 El término "isotónica" significa que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán generalmente una presión osmótica de aproximadamente 270-328 mOsm. Una presión osmótica ligeramente hipotónica es de 250-269 y una presión osmótica ligeramente hipertónica es de 328-350 mOsm. La presión osmótica se puede medir, por ejemplo, utilizando un osmómetro de presión de vapor o del tipo punto de congelación.

30 Los "modificadores de la tonicidad" son las sustancias inertes farmacéuticamente aceptables, que se pueden agregar a la formulación para proporcionar una isotonicidad de la formulación. Los modificadores de la tonicidad adecuados para esta invención comprenden sales y aminoácidos.

### 35 II. Métodos analíticos

Los criterios siguientes son importantes en el desarrollo de una formulación farmacéutica estable de un anticuerpo. La formulación del anticuerpo contiene excipientes farmacéuticamente aceptables. La formulación del anticuerpo se formula de modo que el anticuerpo conserve su actividad física, química y biológica. La formulación es preferentemente estable durante al menos 1 año a temperatura de refrigeración (2-8 °C) y 6 meses a temperatura ambiente (23-27 °C).

45 Los métodos analíticos para evaluar la estabilidad del producto incluyen cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC), prueba de dispersión dinámica de la luz (DLS), calorimetría diferencial de barrido (DSC), cuantificación de ácido iso-asp, potencia, UV a 340 nm y espectroscopía UV. SEC (J. Pharm. Scien., 83:1645-1650, (1994); Pharm. Res., 11:485 (1994); J. Pharm. Bio. Anal., 15:1928 (1997); J. Pharm. Bio. Anal., 14:1133-1140 (1986)) mide el porcentaje de monómero en el producto y da información sobre la cantidad de agregados y fragmentos solubles. DSC (Pharm. Res., 15:200 (1998); Pharm. Res., 9:109 (1982)) da información sobre la temperatura de desnaturalización de la proteína y la temperatura de transición vítrea. DLS (American Lab., Nov. (1991)) mide el coeficiente de difusión medio, y da información sobre la cantidad de agregados solubles e insolubles. UV a 340 nm mide la intensidad de la luz dispersada a 340nm y da información sobre la cantidad de agregados solubles e insolubles. La espectroscopía UV mide la absorbancia a 278 nm y da información sobre la concentración de proteínas.

55 El contenido de iso-Asp en las muestras se mide utilizando el kit de detección de isoaspartato IsoQuant (Promega). El kit utiliza la enzima Proteína Isoaspartil Metiltransferasa (PIMT) para detectar específicamente la presencia de residuos de ácido isoaspártico en una proteína diana. PIMT cataliza la transferencia de un grupo metilo de S-adenosil-L-metionina a ácido isoaspártico en la posición  $\alpha$ -carboxilo, generando S-adenosil-L-homocisteína (SAH) en el proceso. Esta es una molécula relativamente pequeña y se puede aislar y cuantificar generalmente por HPLC de fase reversa utilizando los patrones para HPLC de SAH incluidos en el kit.

60 La potencia o la bioactividad de un anticuerpo se puede medir por su capacidad para unirse a su antígeno. La unión específica de un anticuerpo a su antígeno se puede cuantificar por cualquier método conocido por los entendidos en la materia, por ejemplo, un inmunoanálisis, como ELISA (enzimoinmunoanálisis de absorción).

### 65 III. Preparación del anticuerpo

La presente invención se refiere a una formulación acuosa estable que contiene un anticuerpo. El anticuerpo de la formulación se prepara utilizando técnicas disponibles para generar anticuerpos, cuyos métodos de ejemplo se describen con más detalle en las secciones siguientes.

- 5 El anticuerpo se dirige contra un antígeno de interés. Preferentemente, el antígeno es un polipéptido biológicamente importante y la administración del anticuerpo a un mamífero puede prevenir o tratar un trastorno. Sin embargo, también se consideran los anticuerpos dirigidos contra antígenos que no son polipéptidos (como antígenos glucolípidos asociados a tumores; véase la patente U.S. 5,091,178).
- 10 Cuando el antígeno es un polipéptido, puede ser una molécula transmembrana (p. ej. receptor) o un ligando como un factor de crecimiento. Los ejemplos de antígenos incluyen moléculas como renina; una hormona del crecimiento, por ejemplo las hormonas del crecimiento humana y bovina; el factor liberador de la hormona del crecimiento; la hormona paratiroidea; la hormona estimulante de la tiroides; lipoproteínas; alfa-1-antitripsina; la cadena A de la insulina; la cadena B de la insulina; la proinsulina; la hormona estimulante del foliculo; la calcitonina; la hormona luteinizante; el glucagón; los factores de la coagulación como el factor VIIIc, el factor IX, el factor tisular y el factor de von Willebrands, los factores anticoagulantes como la proteína C; el factor natriurético atrial; el tensioactivo pulmonar; un activador del plasminógeno, como uroquinasa u orina humana o el activador tisular del plasminógeno (t-PA); la bombesina; la trombina; el factor de crecimiento hematopoyético; los factores de necrosis tumoral alfa y beta; la encefalina; el RANTES (regulador de la activación de las células T normalmente expresadas y secretadas); la proteína inflamatoria de macrófagos (MIP-1-alfa) humana; una seroalbúmina como la seroalbúmina humana; la sustancia inhibidora de Muellerian; la cadena A de la relaxina; la cadena B de la relaxina; la prorrelaxina; el péptido asociado a la gonadotropina de ratón; una proteína microbiana, como la beta-lactamasa; la DNasa; la IgE; un antígeno asociado al linfocito T citotóxico (CTLA), como CTLA-4; la inhibina; la activina; el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); los receptores para hormonas o factores del crecimiento; la proteína A o D; los factores reumatoídes; un factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), la neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT4, NT-5 o NT-6), un factor de crecimiento nervioso como NGF- $\beta$ ; el factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGF); el factor de crecimiento de los fibroblastos como aFGF y bFGF; el factor de crecimiento epidérmico (EGF); un factor de crecimiento transformante (TGF) como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , incluidos TGF- $\beta_1$ , TGF- $\beta_2$ , TGF- $\beta_3$ , TGF- $\beta_4$  o TGF- $\beta_5$ ; el factor de crecimiento semejante a la insulina I y II (IGF-I y IGF-II); des(1-3)-IGF-I (IGF-I cerebral), las proteínas de unión al factor de crecimiento semejante a la insulina; proteínas CD como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; la eritropoyetina; los factores osteoinductores; las inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón como interferón- $\alpha$ , - $\beta$  y - $\gamma$ ; los factores estimulantes de colonias (CSF), por ej., M-CSF, GM-CSF y G-CSF; las interleucinas (IL), por ej., IL-1 a IL-12; los receptores para interleucinas IL-1 a IL-12; las selectinas como selectina L, E y P; la superóxido dismutasa; los receptores de los linfocitos T; las proteínas superficiales de membrana; el factor acelerador de la descomposición; los antígenos virales como, por ejemplo, una porción de la envoltura del virus del sida; las proteínas de transporte; los receptores de asentamiento; las adresinas; las proteínas reguladoras; las integrinas como CD11a, CD11b, CD11c, CD18 un ICAM, VLA-4 y VCAM; un antígeno asociado a un tumor como los receptores HER2, HER3 o HER4; y los fragmentos de cualquiera de los polipéptidos mencionados precedentemente.
- 40 Cuando se utilizan técnicas recombinantes, el anticuerpo se puede producir intracelularmente, en el espacio periplásmico, o secretar directamente en el medio. Si el anticuerpo se produce intracelularmente, como primer paso, se eliminan los restos de macropartículas, las células del huésped o las células lisadas, por ejemplo, por centrifugación o ultrafiltración. Cuando el anticuerpo se secreta en el medio, los sobrenadantes de tales sistemas de expresión generalmente se concentran primero utilizando un filtro de concentración de proteínas comercial, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon. Se puede incluir un inhibidor de la proteasa como PMSF en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis y se pueden incluir antibióticos para evitar el crecimiento de contaminantes accidentales.
- 45 La composición del anticuerpo preparada a partir de las células se puede purificar mediante, por ejemplo, cromatografía con hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad, siendo la técnica de purificación preferida la cromatografía por afinidad. La idoneidad de la proteína A como ligando de afinidad depende de la especie y el isotipo de cualquier dominio Fc de la inmunoglobulina que esté presente en el anticuerpo. La proteína A se puede usar para purificar los anticuerpos basados en las cadenas pesadas  $Y_1$ ,  $Y_2$  o  $Y_4$  humanas (Lindmark et al., J. Immuno/. Meth. 62:1-13 (1983)). La proteína G se recomienda para todos los isotipos de ratón y para la  $Y_3$  humana (Guss et al., EMBO J. 5:1567-1575 (1986)). La matriz a la cual está unido el ligando de afinidad es a menudo agarosa, pero existen otras matrices. Las matrices mecánicamente estables como vidrio de poro controlado o de poli(estirenodivinil)benceno permiten velocidades de flujo mayores y tiempos de procesamiento más cortos que los que se pueden lograr con agarosa. Cuando el anticuerpo contiene un dominio  $C_{H3}$ , la resina de Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, N.J.) es útil para la purificación. También se dispone de otras técnicas de purificación de proteínas como el fraccionamiento en una columna de intercambio iónico, precipitación en etanol, HPLC de fase reversa, cromatografía en sílice, cromatografía en heparina SEPHAROSSET™, cromatografía en una resina de intercambio iónico o catiónico (por ejemplo, una columna de ácido poliaspártico), cromatografía en SDS-PAGE y precipitación en sulfato de amonio dependiendo del anticuerpo a recuperar.
- 60 Los anticuerpos preferidos comprendidos por la presente invención incluyen Daclizumab (USAN, nombres

adoptados por los Estados Unidos), un anticuerpo humanizado anti-receptor de IL-2. Daclizumab se comercializa como Zenapax® para la prevención del rechazo de órganos después del trasplante renal y se administra por vía intravenosa. Daclizumab también es útil para el tratamiento de la psoriasis, para la cual, la liberación subcutánea es la ruta preferida de administración. Para una liberación subcutánea del anticuerpo, se prefiere una elevada concentración del mismo. Daclizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante, de la subclase IgG1. La molécula se compone de dos subunidades idénticas de cadena pesada y dos de cadena ligera. Puentes disulfuro unen las cuatro cadenas. El monómero de Daclizumab tiene un peso molecular de aproximadamente 150 000 Dalton. Daclizumab se une a la subunidad p55 del receptor de IL-2 expresado en los linfocitos T activados. El objetivo del antígeno se denomina CD25. Daclizumab se produce a partir de una línea celular GS-NS0 que contiene los genes de las cadenas ligera y pesada, mediante cultivo de fermentación alimentado de manera semicontinua. Se procesan los productos del biorreactor para eliminar las células y los desechos y para purificarlos mediante una combinación de cromatografía de intercambio iónico y de filtración en gel, y una serie de técnicas de filtración y ultrafiltración para producir una sustancia farmacológica que contenga más de 95% de la especie monomérica.

Otro anticuerpo preferido es el anticuerpo anti-interleucina 12 (IL-12). IL-12 es una citocina sintetizada por células presentadoras de antígeno. Está compuesta por dos subunidades (p35 y p40), que ambas deben estar presentes para la actividad funcional. La IL-12 funcional también se denomina IL-12p70. Esta citocina actúa preferentemente sobre los linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1) y los linfocitos citolíticos naturales incrementando su velocidad de proliferación. Un efecto posterior es la secreción de interferón gamma (IFN $\gamma$ ) por las células Th1. Ambas funciones (proliferativa y producción de IFN $\gamma$ ) se pueden ensayar fácilmente y se fueron utilizadas para detectar la actividad de IL-12 en las muestras. Se ha demostrado que ciertos anticuerpos anti-IL-12 "neutralizan" las actividades mencionadas antes. Dado que se ha considerado que las células Th1 tienen un papel crucial en diversas enfermedades, un anticuerpo con características neutralizantes tendría un posible valor terapéutico. 16G2 (Hoffman La Roche) es un anticuerpo murino contra IL-12p70. Se ha demostrado que 16G2 actúa en cantidades casi estequiométricas para IL-12 en un ensayo funcional, la inhibición de la proliferación de linfocitos T activados de sangre periférica humana. Esta es una característica importante porque existen dímeros p40 de IL-12 en el suero y se necesita utilizar cantidades en exceso de anticuerpos contra la subunidad p40 para neutralizar la capacidad proliferativa de una cantidad dada de IL-12. 16G2 fue humanizado en Protein Design Labs. (Fremont, CA) contra HAIL-12 (anti-IL-12 humanizado, un anticuerpo IgG1).

Otro anticuerpo preferido es el anticuerpo anti-selectina L. Se encontró que las selectinas, como las selectinas L, E y P se asocian a daño tisular durante el curso de isquemia y reperfusión. Los neutrófilos tienen un papel importante en este sentido. Se supone que la selectina es necesaria para el reclutamiento de neutrófilos. La L-selectina es importante para el desarrollo completo del daño en el músculo esquelético, así como en el pulmón (Seekamp, et al., Am. J. Pathol. 11:592-598 (1994). Mulligan, et al., J. Immunol. 151:832-840 (1994). HuEP5C7 (SMART Anti-selectina L) es un anticuerpo monoclonal anti-selectina L humanizado, que contiene IgG2 Fc mutante, y tiene reacción cruzada con los antígenos humanos selectina E y P. Actualmente está siendo desarrollado por Protein Design Labs, Inc. para diversas indicaciones tales como asma, accidente cerebrovascular, trauma y ciertas enfermedades autoinmunitarias.

Otro anticuerpo preferido es Fontolizumab, un anticuerpo anti-interferón gamma. Fontolizumab es un anticuerpo monoclonal IgG1 humanizado desarrollado por Protein Design Labs, Inc. para el tratamiento de trastornos inmunitarios mediados por el interferón gamma (IFN-g), una citocina proinflamatoria. IFN-g induce la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase I y/o de los antígenos (HLA-DR) clase II, mejora la actividad citolítica de los linfocitos citolíticos naturales, activa los macrófagos y modula el perfil isotípico de la inmunoglobulina de la respuesta humoral. Como linfocina, IFN-g también mejora el desarrollo de los linfocitos T cooperadores tipo 1 (Th1), en tanto suprime el desarrollo de los linfocitos T cooperadores tipo 2 (Th2). Las aberraciones en la proporción de Th1/Th2 han sido implicadas en diversas afecciones autoinmunitarias.

#### IV. Preparación de la formulación

Una vez preparado el anticuerpo de interés como se describió antes, se prepara una formulación farmacéutica que contenga el anticuerpo. El método de desarrollo de la formulación es el siguiente: se selecciona el pH óptimo de la solución, se selecciona el tipo de tampón y la concentración, se evalúa el efecto de diversos excipientes sobre la estabilidad del líquido y se optimiza la concentración de los excipientes ensayados utilizando un diseño experimental óptimo (Statistics for Experimenters: An Introduction to Design, Data Analysis, and Model Building, Box, George E.P. et al., John Wiley and Sons, Inc., 1978).

Las composiciones de esta invención minimizan la formación de agregados y macropartículas del anticuerpo y aseguran que el anticuerpo conserve su bioactividad en el tiempo. La composición es una formulación líquida farmacéuticamente aceptable que contiene una alta concentración de un anticuerpo en un tampón que tiene un pH neutro o ligeramente ácido (pH 5.5-6.5), un tensioactivo y un modificador de la tonicidad.

El anticuerpo tiene una alta concentración en la composición de 50 mg/ml o mayor, preferentemente de 100 mg/ml o mayor. Una composición preferida de esta invención contiene Daclizumab, un anticuerpo anti-receptor de IL2 humanizado; HAIL12, un anticuerpo anti-IL-12 humanizado; HaEP5C7, un anticuerpo anti-selectina L humanizado; y

Fontolizumab, un anticuerpo anti-interferón gamma humanizado.

Se utiliza un tampón de pH 5.5-6.5 en la composición. Se prefiere un tampón de pH 6.0-6.5. Algunos ejemplos de tampones que controlan el pH en ese rango incluyen succinato (como succinato de sodio), gluconato, histidina, citrato, fosfato y otros tampones de ácidos orgánicos. Se prefiere el tampón de succinato (pKa 5.63) para la inyección subcutánea. La histidina (pK 5,97) se prefiere menos debido a su susceptibilidad a la oxidación, aunque dicha oxidación se puede enlentecer sustituyendo el espacio de cabeza del vial con N<sub>2</sub> o agregando un antioxidante. Los tampones de citrato y fosfato se prefieren mucho menos porque provocan una reacción dolorosa cuando se inyectan por vía subcutánea. Un tampón preferido contiene aproximadamente succinato de sodio 20-60 mM. Otro tampón preferido es el tampón de histidina 30-70 mM recubierto con una capa de N<sub>2</sub>.

También se agrega un tensioactivo a la formulación del anticuerpo. Los ejemplos de tensioactivos incluyen tensioactivos no iónicos como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20, 80, como Tween® 20, Tween® 80) o poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188). La cantidad de tensioactivo añadida es tal que reduce la agregación del anticuerpo formulado y/o minimiza la formación de macropartículas en la formulación y/o reduce la adsorción. El tensioactivo puede estar presente en la formulación en una cantidad entre aproximadamente 0.005% y aproximadamente 0.5%, preferentemente entre aproximadamente 0.01% y 0.1%, más preferentemente entre aproximadamente 0.01% y 0.05% y muy preferentemente entre aproximadamente 0.02% y 0.04%. Se agrega a la composición un modificador de la tonicidad, que contribuye a la isotonicidad de las formulaciones. El modificador de la tonicidad útil para la presente invención comprende sales y aminoácidos. Las sales que son farmacéuticamente aceptables y adecuadas para esta invención incluyen cloruro de sodio, succinato de sodio, sulfato de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio y cloruro de calcio. Las sales preferidas para esta invención son NaCl y MgCl<sub>2</sub>. El MgCl<sub>2</sub> también puede mejorar la estabilidad del anticuerpo, protegiendo a la proteína de la desamidación. Una concentración preferida de NaCl es de aproximadamente 75-150 mM. Una concentración preferida de MgCl<sub>2</sub> es de aproximadamente 1-100 mM. Los aminoácidos que son farmacéuticamente aceptables y adecuados para esta invención incluyen prolina, alanina, L-arginina, asparagina, ácido L-aspártico, glicina, serina, lisina e histidina. Un aminoácido preferido para esta invención es prolina. Una concentración preferida de prolina es de 200 mM.

El EDTA, que comúnmente se utiliza para estabilizar una formulación de proteína, también puede estar incluido en la formulación. El EDTA, como agente quelante, puede inhibir la oxidación catalizada por metal de los grupos sulfhidrilo, reduciendo así la formación de agregados unidos por disulfuro. Una concentración preferida de EDTA es de 0.01-0.2%.

Los ejemplos de composiciones líquidas son formulaciones que contienen un anticuerpo en aproximadamente 100 mg/ml o más, succinato de sodio aproximadamente 20-60 mM (pH 6), aproximadamente 0.01-0.1% de polisorbato 20 o 80 y NaCl aproximadamente 75-150 mM. Esta formulación mantiene la estabilidad de la actividad biológica del anticuerpo monoclonal y evita en las inmunoglobulinas destinadas a la administración a sujetos humanos la degradación física, química y biológica en el producto final.

La formulación líquida del anticuerpo de esta invención es adecuada para la administración parenteral, como inyección intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea; especialmente adecuada para inyección subcutánea.

La invención se ilustra en mayor profundidad mediante los ejemplos siguientes, que no deben interpretarse como limitantes de la invención en el alcance de los procedimientos específicos descritos en ellos.

## Ejemplos

### Ejemplo 1: Optimización del pH

Para identificar la formulación óptima para el rango de pH e identificar las principales vías de degradación, se realizó un estudio de perfil del pH. Las formulaciones de muestra contenían 5.0 mg/ml de anticuerpo anti-receptor de IL2 (Daclizumab) en uno de los tres tampones: tampón de acetato de sodio 50 mM a pH 4.0 o 5.0, histidina 50 mM a pH 5.5, 6.0 o 6.5, o tampón de fosfato de sodio 50 mM a pH 7.0 u 8.5. Se incubaron formulaciones independientes a 5 °C o 45 °C con agitación de 100 RPM durante 4 semanas. Se evaluó la estabilidad física y química de cada muestra a las 0 y 4 semanas por métodos analíticos, incluidos: pH y análisis visual, espectroscopía UV a 340 nm, cromatografía de exclusión por tamaño (SEC-HPLC), espectroscopía de fluorescencia, dispersión dinámica de la luz (DLS), calorimetría diferencial de barrido (DSC), ensayo IsoQuant de Promega, enfoque isoeléctrico capilar (cIEF), SDS-PAGE (reducido y no reducido) y evaluaciones de la bioactividad (ELISA).

La cromatografía SEC-HPLC realizada sobre las muestras tras cuatro semanas de incubación a 45 °C demostró que la fragmentación es una vía de degradación importante para la formulación líquida, como se muestra en la figura 1A mediante el porcentaje de fragmentos recuperados a distintos niveles de pH con SEC. Tanto el porcentaje de fragmentos como el porcentaje de agregados (Figura 1B), determinados por SEC se redujeron a los valores de pH de rango medio de 5.5 a 6.5.

La figura 2 muestra el porcentaje de degradación obtenido a distintos niveles de pH, evaluado mediante cIEF tras una incubación de cuatro semanas de la muestra a 45 °C. La degradación mínima se obtuvo a un valor de pH de aproximadamente 5.5.

5 La figura 3 muestra el porcentaje de ácido isoaspártico formado a diversos niveles de pH, evaluado mediante el kit IsoQuant de Promega tras una incubación de cuatro semanas de la muestra a 45 °C. La formación de ácido isoaspártico (desamidación) se minimizó a valores de pH de 6 y 6.5, y aumentó abruptamente a pH 8.0.

10 Los resultados de este experimento indican que los pH de 5.5 a 6.5 y preferentemente los pH de 6.0 a 6.5, son los pH óptimos que minimizan la degradación y agregación del anticuerpo.

#### Ejemplo 2: Optimización de los tampones

15 En este experimento, las formulaciones independientes contenían 5.0 mg/ml de anticuerpo Daclizumab en succinato de sodio 50 mM de pH 6.0; e histidina 50 mM de pH 6.0, con y sin burbujeo de N<sub>2</sub>. No se incluyó el tampón de citrato de sodio por informes de dolor provocado por la inyección subcutánea. La bioactividad (potencia) en el tiempo 0 y después de 4, 8 y 12 semanas de incubación a 37 °C se midió por ELISA utilizando microplacas recubiertas con antígeno (II, sR $\alpha$ -2) del receptor de IL2 alfa humano recombinante, y conjugado de anti-IgG humana de cabra-HRP (peroxidasa de rábano).

20 La figura 4 muestra el efecto en el tiempo de diferentes tampones sobre la potencia tras la incubación a 37 °C. La mayor estabilidad de la formulación de anticuerpo se logra a lo largo de 8 semanas con tampón de succinato de sodio 50 mM a pH 6.0. Las formulaciones en histidina sola pierden rápidamente (en menos de 8 semanas) su potencia a medida que el tampón se oxida. La potencia de la formulación permaneció en más del 80% durante al menos 12 semanas tanto en tampón de succinato de sodio como en tampón de histidina gasificado con N<sub>2</sub> para evitar la oxidación.

#### Ejemplo 3: Evaluación selectiva de los excipientes

##### 30 Objetivos

Este estudio se llevó a cabo para hacer una evaluación selectiva de los excipientes para la formulación del anticuerpo Daclizumab a una concentración de 50 mg/ml. Del estudio de optimización del pH realizado previamente (ejemplo 1), la estabilidad de la formulación se maximizó en el rango de pH 6.0-6.5. Por consiguiente en este estudio, los excipientes se probaron en 2 tampones, fosfato 50 mM de pH 6.5 y succinato 50 mM de pH 6.0. La estabilidad del anticuerpo se controló en ambos tampones durante 3 semanas a 5 °C y 45 °C con agitación a 100 RPM a una concentración de 50 mg/ml. Los excipientes examinados incluyeron: tensioactivos (Tween 80® y Tween 20®), sales (NaCl y MgCl<sub>2</sub>), antioxidantes (EDTA y metionina), aminoácidos (glicina, lisina, serina y prolina) y cosolventes (glicerol y etanol). Se utilizaron diversas técnicas analíticas (claridad, pH, SEC-HPLC, UV-Vis y cIEF) para caracterizar las formulaciones que contenían el excipiente.

##### Preparación de la muestra

45 El anticuerpo Daclizumab estuvo en una formulación de fosfato de sodio 67 mM (sin TWEEN® 80) a una concentración de 6.6 mg/mL. Este material se concentró hasta aproximadamente 30 mg/mL en la unidad Pellicon II (Millipore), y posteriormente, se cambió el tampón a dos tampones seleccionados (fosfato de sodio 50 mM de pH 6.5 y succinato de sodio 50 mM de pH 6.0) utilizando la celda de agitación amicon 50 mL (Millipore). Durante el tercer y el último paso de cambio de tampón, el material también se concentró hasta una concentración final de ~125 mg/mL. Finalmente, el anticuerpo se filtró a través de una membrana de 0.8  $\mu$ m (Uniflo). Se determinó que la concentración de proteína luego de la filtración era de aproximadamente 100 mg/ml para la muestra de tampón de fosfato y de 97 mg/ml para la muestra de tampón de succinato.

55 La concentración deseada de los excipientes a la cual se los evaluó se muestra en la tabla 1. Las formulaciones se prepararon o bien pesando la cantidad requerida de los excipientes directamente en el vial (por ejemplo todos los aminoácidos) o bien preparando soluciones madre concentradas de los excipientes. Los excipientes se agregaron a 0.5 ml de la solución del tampón adecuado y el pH se ajustó al valor deseado con HCl 1 N o NaOH al 10%. A continuación, se agregó 0.5 ml de la solución concentrada de anticuerpo en el tampón adecuado (~100 mg/mL) para lograr la concentración deseada de 50 mg/ml. Este procedimiento se adoptó para evitar la degradación de la proteína debido al contacto directo con los excipientes concentrados. El mililitro de solución se dividió en dos viales llenándolos con 0.5 ml cada uno. Se utilizó un vial para el análisis inicial a T = 0 y después se almacenó a 2-8 °C para el análisis correspondiente al tiempo de 3 semanas a 2-8 °C. El otro vial se incubó a 45 °C con agitación a 100 RPM durante 3 semanas y se analizó al final del período.



Tabla 1: Lista de los excipientes y de las concentraciones usadas en el estudio.

Nº	Excipiente	Conc. deseada
1	Tween 80	0.05%
2	EDTA	0.05%
3	NaCl	150 mM
4	Metionina	100 mM
5	Glicina	200 mM
6	Serina	200 mM
7	Prolina	200 mM
8	Lisina	200 mM
9	MgCl <sub>2</sub>	100 mM
10	Tween 20	0.05%
11	Glicerol	5.0%
12	Etanol	5.0%

## Métodos analíticos

5 En cada uno de los dos tiempos, las muestras se analizaron usando diversas técnicas analíticas. La claridad de la solución se examinó visualmente sosteniendo los viales de muestra contra un fondo negro bajo iluminación fluorescente. La solución se inspeccionó en busca de especies insolubles y se registraron los cambios de color. Se realizó una cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una unidad de HPLC Perkin Elmer con detección por arreglo de diodos y dos columnas Tosohaas conectadas en serie. Las muestras se diluyeron aproximadamente 5 veces con el tampón correspondiente para llevar la concentración a aproximadamente 1 mg/mL y se inyectaron 100  $\mu$ L de la muestra en la columna. Se midió la concentración de la muestra por espectroscopía UV utilizando el espectrofotómetro Perkin Elmer Lambda Bio 40.

15 Se analizaron las muestras del tiempo correspondiente a 3 semanas por enfoque isoeléctrico capilar en el sistema BioRAD CE (3000 BioFocus). Todas las muestras se diluyeron hasta 0.25 mg/mL con agua y se preparó una dilución 1:1 (hasta una concentración final de 0.125 mg/mL) con solución pharmalyte que contenía TEMED y dos marcadores pI internos, 8.4 y 10.1. El capilar utilizado fue un eCAP con recubrimiento neutro (Beckmann, 56 cm de longitud, 50  $\mu$ m de DI).

20 La potencia de las muestras formuladas en el tampón de succinato con los excipientes, Tween 80, EDTA, NaCl y MgCl<sub>2</sub> se analizó tras 3 semanas de incubación a 5 y 45 °C. Fue un bioensayo con células KIT-225-K6.

## Resultados

25 Hubo 24 muestras en el tiempo T = 0 porque se controlaron 12 excipientes diferentes en dos tampones diferentes. En el tiempo correspondiente a las 3 semanas, hubo 48 muestras para ser analizadas (12 excipientes diferentes x 2 temperaturas x 2 tampones = 48). Los ensayos realizados incluyeron la determinación de la concentración por UV-Vis, pH, claridad, SEC-HPLC y CIEF.

30 (a) Claridad de la muestra

35 El aspecto de la muestra se indica en la tabla 2. Todas las muestras fueron claras en ambos tampones en el tiempo inicial T = 0. En el tiempo correspondiente a 3 semanas, todas las muestras en el tampón de fosfato excepto las que contenían lisina fueron claras a 5 °C. En el mismo tampón, a 45 °C, las muestras que contenían aminoácidos (glicina, serina, prolina y lisina) parecían claras pero tenían algunos hilillos flotantes en los viales. En la muestra con MgCl<sub>2</sub> hubo cristales claros sedimentados en el fondo del vial.

40 En el tampón de succinato, todas las muestras excepto las formulaciones que contenían aminoácidos fueron claras tras 3 semanas de incubación a 5 °C. Las muestras con prolina y lisina fueron las más turbias. A 45 °C, todas las muestras en tampón de succinato fueron claras en el tiempo correspondiente a 3 semanas.

Tabla 2: Claridad de la muestra determinada por luz fluorescente a T = 0 y T = 4 semanas a 5 y 45 °C en los tampones de Na-succinato (pH 6.0) y de Na-fosfato (pH 6.5).

Muestra	Fosfato T = 0 claridad	Fosfato T = 3 sem. claridad, 5 °C	Fosfato T = 3 sem. claridad, 45 °C	Succinato T = 0 claridad	Succinato T = 3 sem. claridad, 5 °C	Succinato T = 3 sem. claridad, 45 °C
Tween 80	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara
EDTA	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara
NaCl	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara
Metionina	Clara	Clara	Clara	Clara	Túrbida	Clara
Glicina	Clara	Clara	Clara	Clara	Túrbida	Clara
Serina	Clara	Clara	Clara	Clara	Túrbida	Clara
Prolina	Clara	Clara	Clara	Clara	Túrbida	Clara
Lisina	Clara	Túrbida	Clara	Clara	Túrbida	Clara
MgCl <sub>2</sub>	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara
Tween-20	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara
Glicerol	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara
Etanol	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara	Clara

(b) SEC-HPLC

5 Los resultados de la cromatografía SEC-HPLC están tabulados en la tabla 3(A-C). La tabla 3A indica el porcentaje de monómero para todas las muestras investigadas en este estudio. El % de monómero a T = 0 para todas las muestras fue  $\geq 99\%$ . En el tiempo correspondiente a tres semanas, no se observó ningún cambio significativo en el % de monómero para las muestras a 5 °C en ambos tampones. Sin embargo, a 45 °C, todas las muestras presentaron una ligera caída en el % de monómero (<5%). Para las muestras formuladas en el tampón de fosfato, el % de monómero varió desde 94.08 (metionina) hasta 97.29 (prolina), mientras que para las muestras formuladas en el tampón de succinato, el % de monómero varió de 95.86 (metionina) a 97.55 (Tween 80). En ambos tampones, se observó que las formulaciones que contenían metionina y glicina presentaron la caída más significativa en el % de monómero. La disminución en el % de monómero fue principalmente debida a la formación de fragmentos.

15 La tabla 3B lista el % de formación de agregados en todas las muestras investigadas en este estudio. Es evidente a partir de estos resultados que el aumento en la formación de agregados en el transcurso de 3 semanas es mínimo para todas las muestras a 5 °C en ambos tampones. Tras 3 semanas de incubación a 45 °C, las muestras en el tampón de fosfato presentaron un aumento en el % de agregados que varió desde 0.40% (EDTA) hasta 2.40% (glicina). En el tampón de succinato la formación de agregados fue ligeramente inferior; y varió desde 0.7% (metionina) hasta 1.09% (glicina) tras el período de incubación de 3 semanas. Una de las hipótesis que respalda estos resultados es que si la formación de agregados se debe a la oxidación, se puede enlentecer en el tampón de succinato debido a las propiedades quelantes del metal que tiene el dicho tampón.

25 La tabla 3C lista el % de formación de fragmentos en todas las muestras investigadas en este estudio. En el tiempo inicial, el % de fragmentos varió de ~0.2-0.4 % en todas las muestras. Para todas las muestras incubadas a 5 °C, el % de aumento en los fragmentos fue insignificante en el transcurso del periodo de 3 semanas. A 45 °C, se observó un significativo aumento en la velocidad de formación de fragmentos. Para las muestras formuladas en el tampón de fosfato, el % de fragmentos varió de 4.74 (metionina) a 1.5% (prolina, glicerol y etanol), mientras que en el tampón de succinato, el rango fue de 1.48% (Tween-80) a 3.44 (metionina). En general, se observó un aumento en la formación de fragmentos en las fórmulas que contenían aminoácidos. Además, la velocidad de formación de fragmentos parece ser mayor en el tampón de fosfato. Esto se puede atribuir a la diferencia de pH de los tampones de Na-succinato y Na-fosfato (pH 6.0 y 6.5, respectivamente), lo que indica que la hidrólisis catalizada por bases es la principal razón para la formación de fragmentos.

35 Tabla 3A: % de monómero determinado por SEC a T = 0 y 3 semanas a 5 °C y 45 °C en tampones de Na-succinato (pH 6.0) y Na-fosfato (pH 6.5).

Muestra	Fosfato T = 0 % de monóm.	Fosfato T = 3 sem. % de monóm., 5 °C	Fosfato T = 3 sem. % de monóm., 45 °C	Succinato T = 0 % monóm.	Succinato T = 3 sem. % de monóm., 5 °C	Succinato T = 3 sem. % de monóm., 45 °C
Tween 80	99.36	99.48	96.71	99.43	99.51	97.55
EDTA	99.37	99.42	96.43	99.42	99.53	97.51

Muestra	Fosfato T = 0 % de monóm.	Fosfato T = 3 sem. % de monóm., 5 °C	Fosfato T = 3 sem. % de monóm., 45 °C	Succinato T = 0 % monóm.	Succinato T = 3 sem. % de monóm., 5 °C	Succinato T = 3 sem. % de monóm., 45 °C
NaCl	99.37	99.41	96.84	99.42	99.53	97.31
Metionina	99.42	99.42	94.08	99.47	99.53	95.86
Glicina	99.41	99.42	95.90	99.46	99.53	96.46
Serina	99.41	99.45	96.15	99.45	99.53	97.29
Prolina	99.40	99.43	97.29	99.45	99.52	97.06
Lisina	99.34	99.62	95.45	99.45	99.57	96.28
MgCl <sub>2</sub>	99.37	99.44	97.12	99.47	99.53	96.62
Tween-20	99.17	99.53	96.33	99.44	99.53	97.27
Glicerol	99.41	99.59	96.32	99.43	99.48	97.46
Etanol	99.41	99.42	97.24	99.31	99.19	97.42

Tabla 3B: % de agregados determinado por SEC a T = 0 y 3 semanas a 5 °C y 45 °C en tampones de Na-succinato (pH 6.0) y Na-fosfato (pH 6.5).

Muestra	Fosfato T = 0 % de agreg.	Fosfato T = 3 sem. % de agreg., 5 °C	Fosfato T = 3 sem. % de agreg., 45 °C	Succinato T = 0 % de agreg.	Succinato T = 3 sem. % de agreg., 5 °C	Succinato T = 3 sem. % de agreg., 45 °C
Tween 80	0.41	0.00	1.61	0.36	0.36	0.96
EDTA	0.39	0.43	0.40	0.35	0.35	0.96
NaCl	0.40	0.43	1.23	0.33	0.34	0.85
Metionina	0.36	0.41	1.18	0.32	0.34	0.70
Glicina	0.38	0.42	2.40	0.33	0.35	1.09
Serina	0.38	0.40	2.15	0.32	0.33	0.91
Prolina	0.38	0.41	1.14	0.35	0.34	0.86
Lisina	0.39	0.36	1.50	0.32	0.30	0.64
MgCl <sub>2</sub>	0.38	0.42	0.60	0.32	0.34	0.82
Tween-20	0.40	0.44	1.55	0.34	0.34	1.00
Glicerol	0.37	0.40	2.13	0.35	0.32	0.94
Etanol	0.37	0.43	1.26	0.28	0.38	0.91

5 Tabla 3C: % de fragmentación determinado por SEC a T = 0 y 3 semanas a 5 °C y 45 °C en tampones de Na-succinato (pH 6.0) y Na-fosfato (pH 6.5).

Muestra	Fosfato T = 0 % de fragmentos	Fosfato T = 3 sem. % de fragmentos, 5 °C	Fosfato T = 3 sem. % de fragmentos, 45 °C	Succinato T = 0 % de fragmentos	Succinato T = 3 sem. % de fragmentos, 5 °C	Succinato T = 3 sem. % de fragmentos, 45 °C
Tween 80	0.21	0.52	1.67	0.22	0.11	1.48
EDTA	0.22	0.15	2.00	0.22	0.12	1.53
NaCl	0.24	0.16	1.93	0.21	0.12	1.85
Metionina	0.21	0.16	4.74	0.21	0.13	3.44
Glicina	0.20	0.15	1.70	0.21	0.12	2.41
Serina	0.21	0.14	1.69	0.23	0.12	1.81
Prolina	0.22	0.16	1.58	0.21	0.13	2.08
Lisina	0.24	0.02	3.05	0.23	0.12	3.09

Muestra	Fosfato T = 0 % de fragmentos	Fosfato T = 3 sem. % de fragmentos, 5 °C	Fosfato T = 3 sem. % de fragmentos, 45 °C	Succinato T = 0 % de fragmentos	Succinato T = 3 sem. % de fragmentos, 5 °C	Succinato T = 3 sem. % de fragmentos, 45 °C
MgCl <sub>2</sub>	0.21	0.14	2.28	0.21	0.13	2.55
Tween 20	0.44	0.03	2.12	0.22	0.11	1.73
Glicerol	0.23	0.01	1.54	0.22	0.20	1.61
Etanol	0.22	0.14	1.51	0.41	0.40	1.67

## (c) Electroforesis capilar

5 Todas las muestras de este estudio se analizaron por electroforesis capilar (cIEF) en el sistema BioRAD. Un perfil típico de cIEF para Daclizumab muestra cuatro picos. Normalmente en el envejecimiento acelerado a altas temperaturas, el área del pico de la isoforma principal disminuye seguido de un aumento en los picos de la otra isoforma, lo que indica la conversión de una isoforma en la otra isoforma. El % de degradación se calcula por disminución porcentual en el área del pico de la isoforma principal:

$$10 \quad \% \text{ de Degradación} = \frac{[\text{Área del pico a T} = 0 - \text{Área del pico a 45 °C}] \times 100\%}{[\text{Área del pico a T} = 0]}$$

15 Nuestros resultados indican que las muestras a 45 °C están más degradadas en el tampón de fosfato (pH 6.5) en comparación con muestras similares en el tampón de succinato (pH 6.0). Los mejores electroferogramas fueron los de los excipientes, EDTA, NaCl, lisina y MgCl<sub>2</sub>. El % de degradación después de 3 semanas para las muestras a 5 °C frente a las de 45 °C no se pudo calcular para las muestras que contenían Tween 80, Tween 20, serina y prolina porque sus electroferogramas estaban muy colapsados y los picos eran indistinguibles.

## (d) Potencia

20 Basándose en los resultados de este estudio, el tampón de Na-succinato parece ser más prometedor que el tampón de Na-fosfato. Por consiguiente, se realizaron las evaluaciones de potencia para los excipientes más estabilizadores sólo en el tampón de Na-succinato. Esto incluyó las formulaciones que contenían Tween 80, EDTA, NaCl y MgCl<sub>2</sub>, sometidas a tres semanas de incubación a 5 y 45 °C. Los resultados (tabla 4) mostraron que la potencia de todas las formulaciones estuvo dentro de las especificaciones, lo que indica que los procesos de degradación física y química subyacentes no están alterando significativamente la actividad de la proteína.

25 Tabla 4: Resultados de potencia de las formulaciones seleccionadas en tampón de succinato a T = 3 semanas, a 5 y 45 °C.

Muestra	pH	% de potencia
Tween 80, 5 °C	6.0	105
Tween 80, 45 °C	6.0	80
EDTA, 5 °C	6.0	103
EDTA, 45 °C	6.0	74
NaCl, 5 °C	6.0	105
NaCl, 45 °C	6.0	98
MgCl <sub>2</sub> , 5 °C	6.0	112
MgCl <sub>2</sub> , 45 °C	6.0	96

## 30 Discusión

35 Basándose en los resultados de este estudio, la estabilidad de la formulación fue mayor en el tampón de Na-succinato a pH 6.0, en comparación con el tampón de Na-fosfato a pH 6.5. Esto se debe principalmente a la hidrólisis catalizada por base que se acelera al pH superior, 6.5, causando un aumento en la velocidad de formación de fragmentos. Por lo tanto, el tampón de Na-succinato a pH 6.0 es el tampón de elección para todos los estudios futuros. Los resultados de este estudio también indican claramente que en ambos tampones, los aminoácidos (glicina, lisina, serina, prolina y metionina) no tuvieron un efecto estabilizador de la proteína. Como lo demuestran los datos sobre la claridad de las muestras, todas las formulaciones que contenían aminoácidos presentaron formación de agregados insolubles a 45 °C.

5 En este estudio se seleccionó el excipiente  $MgCl_2$  basándose en la hipótesis de que podría proteger a la proteína contra la desamidación. Si bien el  $MgCl_2$  precipitó en el tampón de Na-fosfato; en el tampón de Na-succinato, basándose en los datos del cIEF, el  $MgCl_2$  tiene un efecto estabilizador de la proteína. También se incluyó etanol como excipiente para probar si estabilizaba a la proteína contra la desamidación, al bajar la constante dieléctrica de la solución. Los resultados, sin embargo, no respaldan esta hipótesis. Finalmente, Tween 80, EDTA y NaCl, los excipientes más comúnmente utilizados para estabilizar las formulaciones de proteínas, no presentaron ningún efecto desestabilizador de la proteína en ningún tampón.

10 Se llevaron a cabo otros experimentos en el tampón de Na-succinato a pH 6.0; se examinó en mayor profundidad el efecto de los excipientes ( $MgCl_2$ , Tween 80, NaCl y EDTA) sobre la estabilidad de las proteínas. Los resultados indican que para formular un anticuerpo a 100 mg/mL con NaCl 100 mM, la concentración óptima de Tween 80 se encuentra en el rango de 0.02-0.03%. Los resultados también indican que el aumento de la concentración de sal (100-150 mM) podría estabilizar aún más la formulación. Por consiguiente, la concentración de NaCl debería maximizarse manteniendo simultáneamente los requerimientos de tonicidad. Los resultados también indican que la estabilidad de la formulación que contiene Tween 80 y NaCl podría mejorarse agregando EDTA en el rango de concentración de 0.35-0.5%. La adición de  $MgCl_2$  en el rango de concentración de 0-50 mM también podría tener un efecto favorable. Los resultados también indican que las concentraciones de excipientes para la formulación más estable son: NaCl 150 mM, Tween 80 0.05%, EDTA 0.03-0.04% y  $MgCl_2$  60-70 mM, sin embargo, estas condiciones no son prácticas porque no proporcionan condiciones isotónicas.

20 Ejemplo 4: Datos de estabilidad de dos formulaciones de anticuerpo Daclizumab en tampón de succinato

Las formulaciones 1 y 2 se prepararon según el ejemplo 3.

25 Formulación 1: 100 mg/ml de anticuerpo Daclizumab, succinato de sodio 30 mM (pH 6.0), NaCl 100 mM y 0.03% de Tween @ 80.

Formulación 2: igual que la formulación 1, más 0.05% de EDTA.

30 Los resultados de estabilidad de las formulaciones 1 y 2 a T = 0, 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas y 12 semanas se muestran como sigue a 5, 25 y 37 °C (Tabla 5).

Tabla 5: Resultados de estabilidad de las formulaciones 1 y 2.

T = 0					
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
F1	Clara	98.27	0.77	0.96	100
F2	Clara	98.27	0.77	0.96	90
T = 2 semanas					
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
F1-5C	Clara	98.31	0.73	0.95	NA
F1-25C	Clara	98.03	0.82	1.14	NA
F1-37C	Clara	97.11	1.21	1.69	NA
F2-5C	Clara	98.20	0.92	0.90	NA
F2-25C	Clara	97.90	1.09	1.06	NA
T = 4 semanas					
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
F1-5C	Clara	98.30	0.74	0.96	93
F1-25C	Clara	97.80	0.92	1.28	88
F1-37C	Clara	96.20	1.77	2.03	84
F2-5C	Clara	98.30	0.77	0.93	94
F2-25C	Clara	97.85	0.95	1.20	92
F2-37C	Clara	96.30	1.83	1.87	80
T = 8 semanas					
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia

ES 2 392 073 T3

T = 4 semanas					
F1-5C	Clara	98.24	0.73	0.95	96
F1-25C	Clara	97.51	0.82	1.14	96
F1-37C	Clara	94.76	1.21	1.69	90
F2-5C	Clara	98.34	0.78	0.88	90
F2-25C	Clara	97.42	1.20	1.38	90
F2-37C	Clara	94.63	3.06	2.31	85
T = 12 semanas					
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
F1-5C	Clara	98.25	0.73	1.02	98
F1-25C	Clara	97.07	1.26	1.62	90
F1-37C	Clara	93.31	3.88	2.81	84
F2-5C	Clara	98.30	0.70	1.00	94
F2-25C	Clara	97.22	1.30	1.48	88
F2-37C	Clara	92.88	4.05	1.54	82

Ejemplo 5: Datos de estabilidad de dos formulaciones de Daclizumab en tampón de histidina

5

Las formulaciones 3 y 4 se prepararon según el ejemplo 3.

Formulación 3: 100 mg/ml de anticuerpo Daclizumab, histidina 50 mM (pH 6.0), NaCl 115 mM, 0.03% de Tween ® 80, purgada con nitrógeno.

10

Formulación 4: igual que la formulación 3, más 0.05% de EDTA.

Los resultados de estabilidad de las formulaciones de 3 y 4 a T = 0, 2 semanas, 4 semanas, 8 semanas y 12 semanas se muestran como sigue a 5, 25 y 37 °C (Tabla 6).

15

Tabla 6: Resultados de estabilidad de las formulaciones 3 y 4.

T = 0					
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
F3	Clara	99.24	0.43	0.33	79
F4	Clara	99.01	0.68	0.32	89
T = 2 semanas					
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
F3-5C	Clara	99.24	0.38	0.38	ND
F3-25C	Clara	99.09	0.47	0.44	ND
F3-37C	Clara	98.32	1.01	0.67	ND
F4-5C	Clara	99.19	0.44	0.37	ND
F4-25C	Clara	99.11	0.47	0.42	ND
F4-37C	Clara	98.41	0.93	0.66	ND
T = 4 semanas					
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
F3-5C	Clara	99.26	0.37	0.35	91
F3-25C	Clara	98.99	0.56	0.45	76
F3-37C	Clara	97.96	1.42	0.62	83
F4-5C	Clara	99.28	0.38	0.34	81

T = 4 semanas					
F4-25C	Clara	99.00	0.56	0.44	85
F4-37C	Clara	97.94	1.44	0.63	79
T = 8 semanas	pH 6.0				
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
F3-5C	Clara	99.24	0.38	0.38	86
F3-25C	Clara	98.74	0.72	0.54	82
F3-37C	Clara	96.87	2.37	0.76	75
F4-5C	Clara	99.23	0.39	0.38	97
F4-25C	Clara	98.71	0.75	0.54	92
F4-37C	Clara	96.90	2.34	0.76	86
T = 12 semanas	pH 6.0				
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
F3-5C	Clara	98.89	0.63	0.49	99
F3-25C	Clara	98.04	1.21	0.75	96
F3-37C	Clara	94.79	4.06	1.17	90
F4-5C	Clara	98.92	0.60	0.48	91
F4-25C	Clara	98.06	1.23	0.72	87
F4-37C	Clara	95.02	3.83	1.15	78

Ejemplo 6 Datos de estabilidad de la formulación de Daclizumab a temperatura ambiente durante un año

- 5 Se analizó la estabilidad de una formulación líquida de anticuerpo de 100 mg/ml de Daclizumab en succinato de sodio 30 mM, pH 6, NaCl 100 mM y 0.03% de Tween® 80, tras el almacenamiento de un año a 25 °C. Los resultados de estabilidad indican que la formulación es estable durante al menos un año a 25 °C (Tabla 7).

Tabla 7 Resultados de la estabilidad de la formulación de Daclizumab tras un año de almacenamiento a 25 °C.

Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
T = 0	Clara	98.27	0.77	0.96	100
T = 1 año	Clara	94.32	3.14	2.53	86

- 10 Ejemplo 7. Datos de estabilidad de la formulación de Daclizumab a 5 °C durante 18 meses
- 15 Se incubó una formulación líquida de anticuerpo de 100 mg/ml de Daclizumab en succinato de sodio 30 mM, pH 6, NaCl 100 mM y 0.03% de Tween® 80 a 5 °C (2-8 °C) y se analizó su estabilidad en diferentes momentos. Los resultados de estabilidad indican que la formulación es estable durante al menos 18 meses a temperatura de refrigeración (Tabla 8).

Tabla 8. Resultados estabilidad de Daclizumab a 5 °C.

Tiempo (meses)	% de monómero	% de agregados
0	99.0	N/A
3	99.1	0.2%
6	99.1	0.2%
9	98.8	0.2%
12	98.9	0.2%
18	98.6	0.2%

- 20 Ejemplo 8. Datos de estabilidad de HAIL-12 (tampón de histidina)

Se formuló HAIL-12 (anticuerpo anti-IL12, 50 mg/mL) en tampón de histidina 50 mM, cloruro de sodio 120 mM, 0.03% de Tween 80, pH 6.0. La prueba de estabilidad en curso indica que la formulación es estable a 5 °C durante

al menos 9 meses (Tabla 9).

Tabla 9. Resultados de estabilidad de HAIL-12 a 5 °C.

Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
T = 0	Clara	99.47	0.18	0.35	95
T = 7 meses	Clara	98.90	0.65	0.45	----
T = 8 meses	----	----	----	----	100
T = 9 meses	----	98.52	----	----	----

5 Ejemplo 9. Datos de estabilidad de HAIL-12 (tampón de succinato)

Se formuló HAIL-12 (50 y 100 mg/mL) en tampón de Na-succinato 40 mM, NaCl 100 mM y 0.03% de Tween 80, pH 6.0. La prueba de estabilidad en curso indica que la formulación es estable a 5, 25 y 37 °C durante al menos 12 semanas (Tablas 10 y 11).

10

Tabla 10. Resultados de estabilidad de HAIL-12 (50 mg/mL) a diversas temperaturas.

T = 0					
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
5 °C	Clara	99.27	0.27	0.47	99
T = 12 semanas					
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
5 °C	Clara	99.00	0.34	0.67	109
25 °C	Clara	98.05	0.92	1.04	76
37 °C	Clara	93.86	4.25	1.90	75
T = 6 meses					
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
5 °C	Clara	98.63	0.61	0.76	97
25 °C	Clara	97.1	1.67	1.22	78

Tabla 11. Resultados de estabilidad de HAIL-12 (100 mg/ml) a diversas temperaturas.

T = 0				
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados
5 °C	Clara	99.2	0.31	0.49
T = 12 semanas				
Muestra	Claridad	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados
5 °C	Clara	98.9	0.31	0.78
25 °C	Clara	97.67	0.95	1.38
37 °C	Clara	93.26	4.14	2.6

15

Ejemplo 11. Datos de estabilidad de HuEP5C7.

Se formuló HuEP5C7 (anticuerpo anti-selectina L, 50 y 100 mg/mL) en tampón de histidina 50 mM, cloruro de sodio 125 mM y 0.01% de Tween 80, pH 6.0. La prueba de estabilidad en curso indica que la formulación es estable durante tres meses a 25 °C y 45 °C, y durante al menos 9 meses a 5 °C. Los resultados de la prueba de estabilidad de 9 meses a 5 °C se muestran en la tabla 12. Los resultados de la prueba de estabilidad acelerada de 3 meses se muestran en la tabla 13.

20



Tabla 12. Resultados de estabilidad de HuEP5C7 a 5 °C.

50 mg/mL				
Muestra	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
T = 0	98.54	0.30	1.17	83
T = 9 meses	99.08	0	0.91	99
100 mg/mL				
Muestra	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
T = 0	98.56	0.23	1.21	79
T = 9 meses	98.05	0.03	1.47	90

Tabla 13. Resultados de estabilidad de HuEP5C7 a diversas temperaturas.

T = 3 meses				
Muestra	% de monómero	% de fragmentos	% de agregados	% de potencia
50 mg/mL - 5 °C	99.48	0.14	0.39	121
50 mg/mL - 25 °C	98.81	0.31	0.88	72
50 mg/mL - 45 °C	98.26	0.99	0.76	107
100 mg/mL - 5 °C	99.03	0	0.97	93
100 mg/mL - 25 °C	98.56	0.40	1.06	78
100 mg/mL - 45 °C	97.88	0.92	1.20	91

- 5 La invención, y la manera y el proceso de para prepararla y usarla, están descritos en términos tan completos, claros, concisos y exactos que permiten a cualquier persona experta en el área a la cual pertenece, prepararla y usarla. Se debe comprender que lo precedente describe las realizaciones preferidas de la presente invención y que se les pueden hacer modificaciones sin apartarse del ámbito de aplicación de la presente invención como se divulga en las reivindicaciones. Para señalar particularmente y reivindicar indiscutiblemente el tema considerado como
- 10 invención, las reivindicaciones siguientes concluyen esta especificación.

**REIVINDICACIONES**

1. Una formulación farmacéutica líquida estable que contiene:  
5        tampón de succinato 20-60 mM con un pH de 5.5 a 6.5,  
          0.02% - 0.04% de polisorbato,  
          cloruro de sodio 75-150 mM, y  
10        un anticuerpo en una concentración de 50 mg/ml o más, donde el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante de la subclase IgG1 denominado "Daclizumab" que se une a la subunidad p55 del receptor de IL-2 expresado en los linfocitos T activados y que tiene un peso monomérico de aproximadamente 150000 Dalton.
2. La formulación farmacéutica líquida estable de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho anticuerpo tiene una concentración de 100 mg/ml o más.
- 15    3. La formulación farmacéutica líquida estable de acuerdo con la reivindicación 1, donde dicho tampón de succinato es succinato de sodio.
4. La formulación farmacéutica líquida estable de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicha formulación es apta para administración parenteral.
- 20    5. La formulación farmacéutica líquida estable de acuerdo con la reivindicación 3, donde dicha formulación es apta para administración subcutánea.

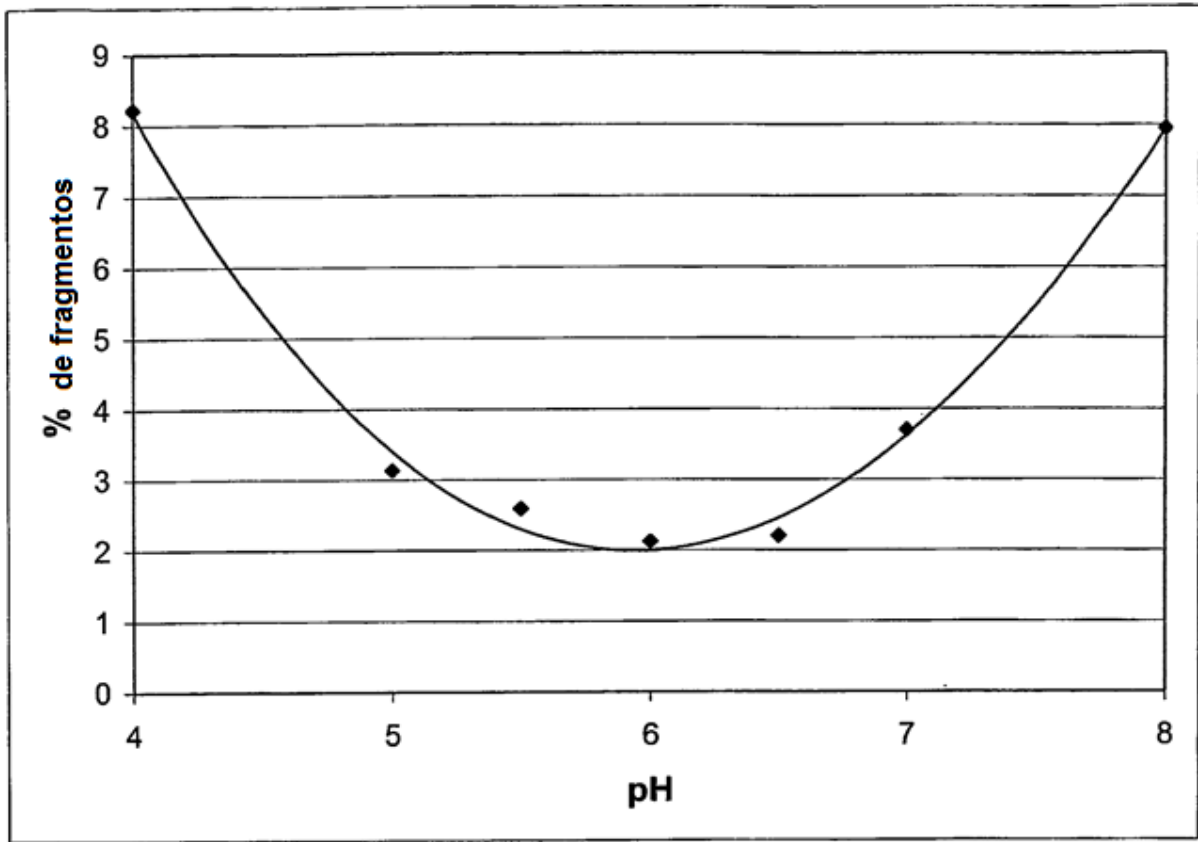
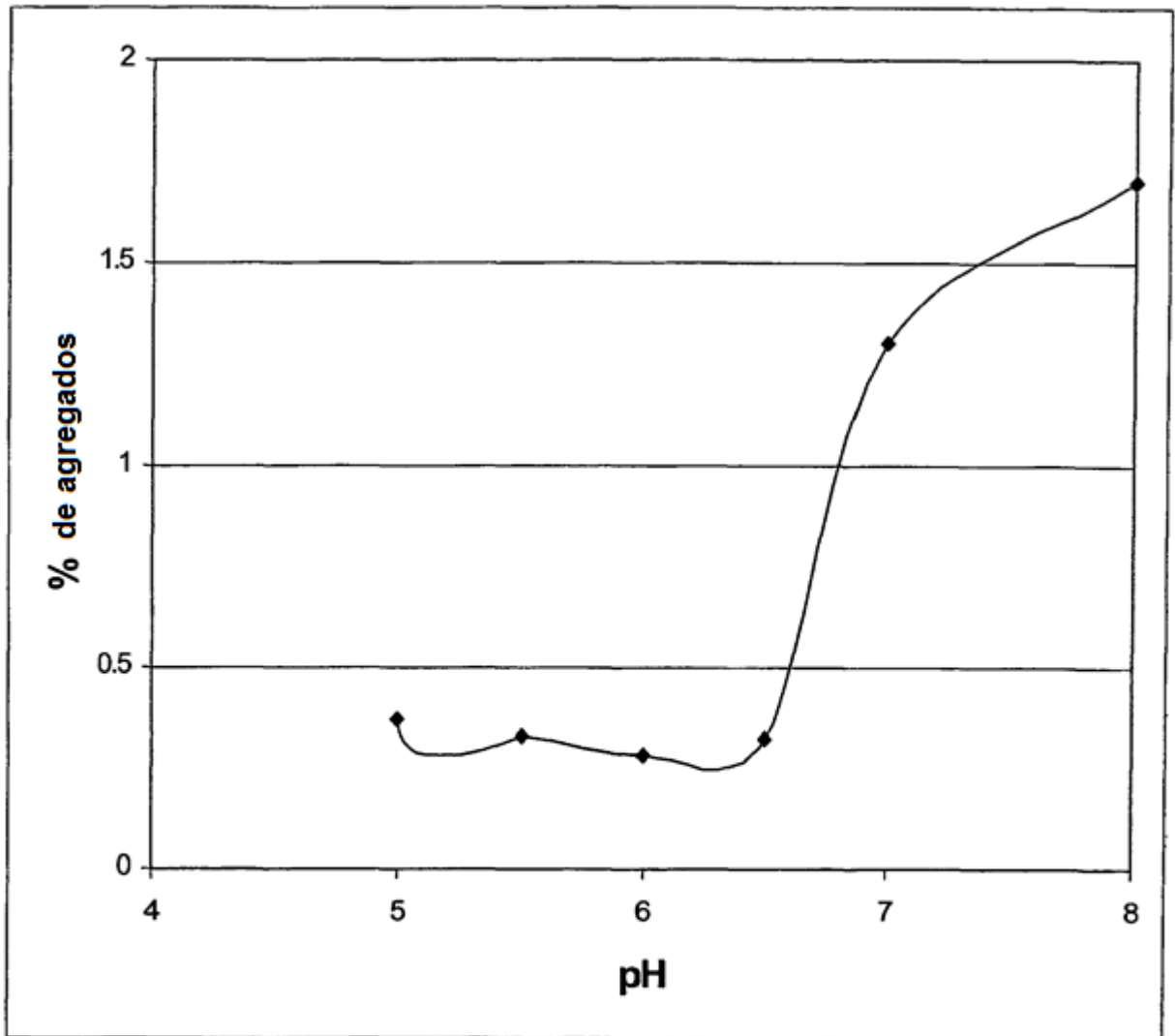
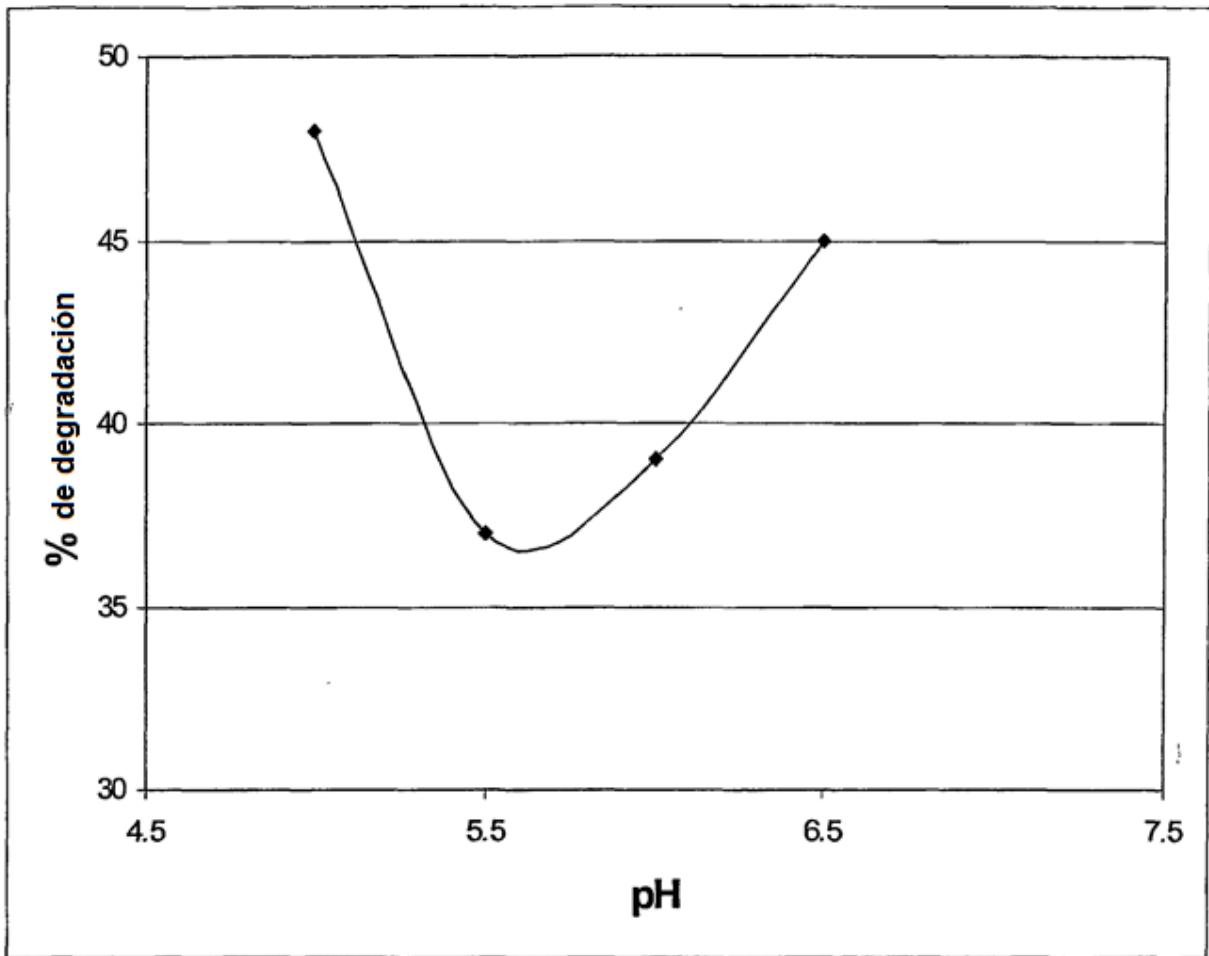


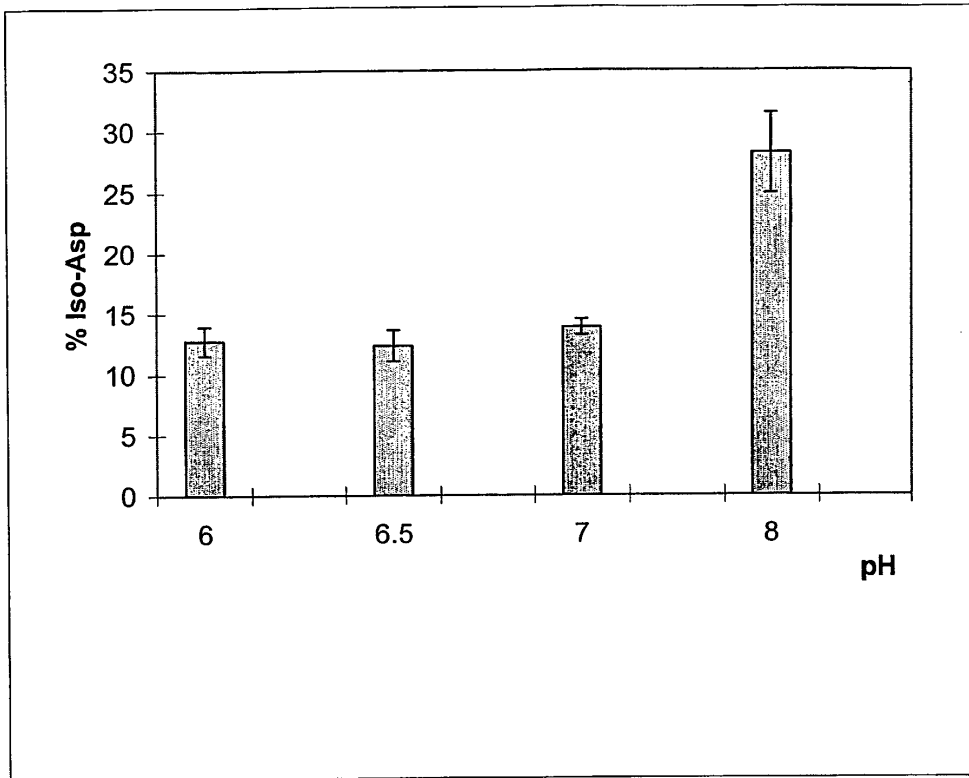
FIG. 1A



**FIG. 1B**



**FIG. 2**



**FIG. 3**

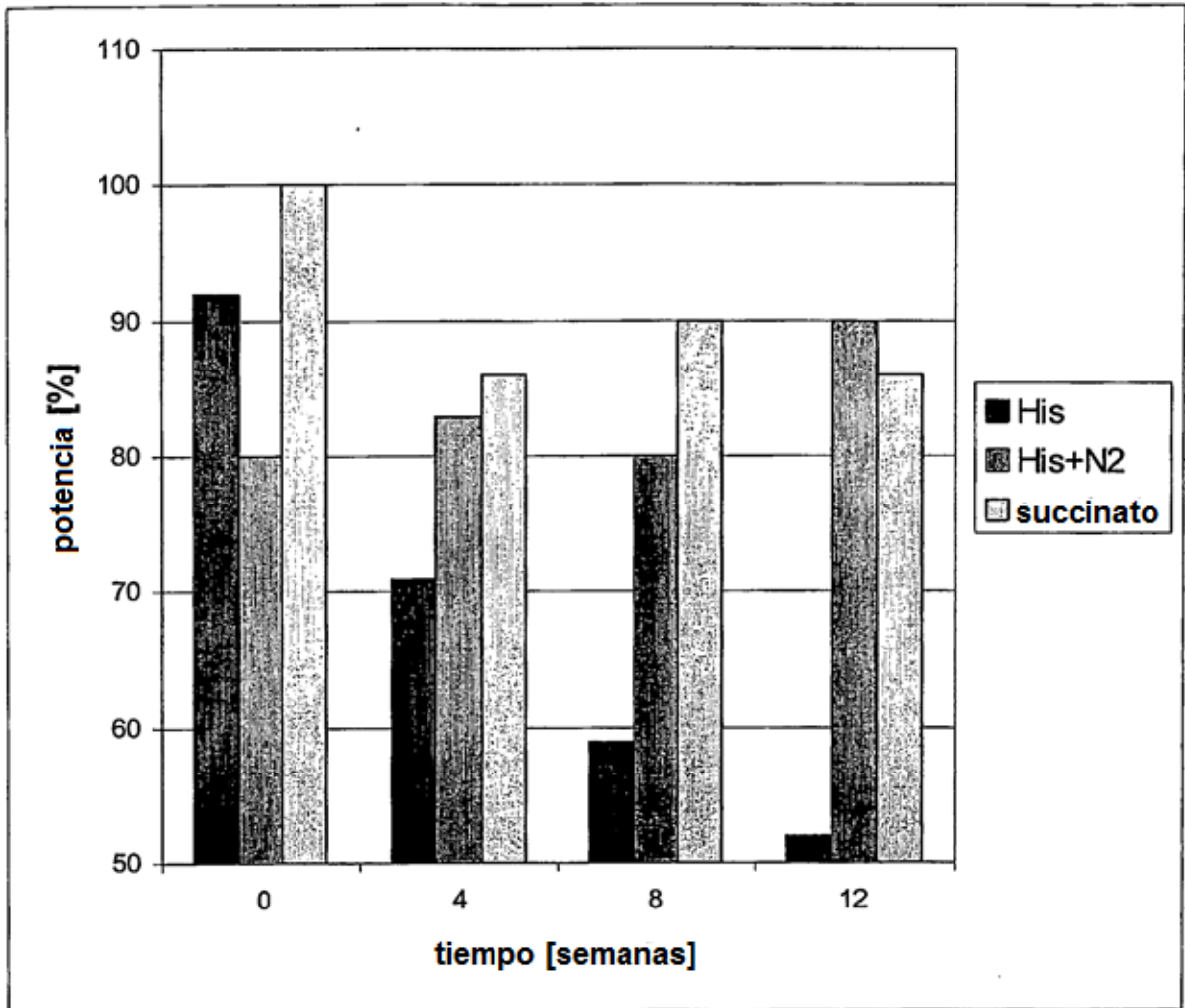


FIG. 4