

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 407 468**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

**A61K 47/18** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **18.04.2005 E 05738543 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.02.2013 EP 1871803**

54 Título: **Formulaciones de anticuerpos anti-hepatitis B (HBV) estabilizadas**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**12.06.2013**

73 Titular/es:

**YEDA RESEARCH AND DEVELOPMENT  
COMPANY LIMITED (100.0%)  
THE WEIZMANN INSTITUTE OF SCIENCE P.O.  
BOX 95  
76100 REHOVOT, IL**

72 Inventor/es:

**DAGAN, SHLOMO;  
EREN, RACHEL;  
MISRA, HEMANT KUMAR;  
GOWAN, WALTER G., JR. y  
O'CONNOR, SANDRA**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

ES 2 407 468 T3

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

**DESCRIPCIÓN**

Formulaciones de anticuerpos anti-hepatitis B (HBV) estabilizadas

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere a una formulación líquida de anticuerpos monoclonales humanos anti-HBsAg para el tratamiento o la prevención de una infección de hepatitis B.

**Antecedentes de la invención**

10 La infección por el virus de la hepatitis B (HBV) es un problema mundial de salud pública, con una tasa de mortalidad que lo coloca entre los diez principales organismos infecciosos letales. La Organización Mundial de la Salud calcula que 400 millones de personas son portadores del virus a nivel mundial. Se ha calculado que la enfermedad de HBV aguda conduce a 600.000 muertes anuales; las complicaciones de la enfermedad crónica, que incluyen cirrosis hepática y carcinoma hepatocelular inducidos por HBV, son responsables de aproximadamente 400.000 muertes anuales (El-Serag H.B. y Mason A.C., N. Engl. J. Med., 1999, 340(10):745-750).

15 Muchos pacientes que están infectados por el virus de la hepatitis B son incapaces de acabar con la infección y desarrollan HBV crónica, que puede conducir al deterioro de la función hepática, que incluye cirrosis y descompensación hepática y la posterior necesidad de trasplante. Aunque el hígado infectado se retira antes del trasplante, siguen quedando algunos virus en la circulación en el suero, y se cree que existen otros depósitos en otros compartimentos corporales. Por tanto, estos pacientes presentan un alto riesgo de reinfección por HBV de su hígado trasplantado.

20 La prevención de la infección por HBV puede lograrse con una inmunización activa o pasiva. La inmunización activa con vacunas de HBV recombinante puede evitar una infección por HBV si se administra antes de la exposición. Estas vacunas, fabricadas a partir de subunidades víricas no infecciosas, han demostrado ser seguras y eficaces y confieren una inmunidad a largo plazo.

25 La inmunización pasiva con anticuerpos específicos de la hepatitis B, administrados poco tiempo después de la exposición, puede disminuir la incidencia o la gravedad de la enfermedad. La inmunoglobulina de hepatitis B (HBIG) es una preparación policlonal procedente del plasma de anticuerpos contra el antígeno de la superficie de la hepatitis B (anti-HBs). Los anticuerpos se unen al antígeno de la superficie de la hepatitis que se encuentra sobre la superficie del virus y lo neutralizan, evitando así la infección.

30 La inmunización pasiva con HBIG es más eficaz si se administra cuando las titulaciones víricas son bajas y puede lograrse un exceso de anticuerpo. Por esta razón, HBIG ha sido eficaz para prevenir nuevas infecciones. También parece ser parcialmente eficaz cuando se emplea para evitar la reinfección después de un trasplante de hígado, cuando la carga vírica disminuye por la retirada del órgano infectado. Ha resultado ser especialmente eficaz en pacientes con bajas titulaciones víricas antes de la cirugía.

35 En la actualidad existen tres productos antivíricos disponibles para el tratamiento de la hepatitis B crónica: el interferón 2b (Intron® A, Schering), la lamivudina (Epivir HBV®, GlaxoSmithKline) y/o el adefovir dipivoxilo (Hepsera®, Gilead Sciences). Sin embargo, no existe ninguna terapia para curar las infecciones por HBV crónicas en todos los pacientes. La HBIG no ha resultado eficaz para tratar pacientes con hepatitis B crónica en que se producen niveles persistentes de virus, y no es posible producir un exceso de anticuerpos sin administraciones frecuentes del anticuerpo. La enfermedad hepática de etapa final relacionada con la hepatitis vírica crónica es la principal indicación para el trasplante de hígado ortotópico (OLT) a nivel mundial. El término "ortotópico" significa que el órgano enfermo se retira y el nuevo aloinjerto se implanta en la posición normal o habitual en el cuadrante superior derecho del abdomen. El OLT para la cirrosis y la insuficiencia de órganos debidas a infecciones por HBV supone del 5 % al 10 % de todos los trasplantes en adultos.

45 La protección del hígado trasplantado frente a la infección recurrente por HBV es fundamental para conservar la función del injerto. Probablemente sea necesario un tratamiento profiláctico para el HBV durante toda la vida, puesto que el virus permanece en varios otros compartimentos corporales (bazo, nódulos linfáticos, riñones, piel, tracto gastrointestinal, gónadas, ganglios nerviosos, y cerebro) después de la retirada del hígado infectado. La infección por hepatitis B del hígado vuelve a aparecer con rapidez cuando el paciente está inmunodeprimido después del trasplante, lo cual da como resultado la enfermedad progresiva, un fallo del injerto, y la muerte. Los pacientes con señales de replicación activa del HBV (HBeAg y/o altos niveles de ADN de HBV) en el momento del trasplante presentan un mayor riesgo. La recurrencia de la enfermedad aparece incluso con más rapidez después de repetir el trasplante (Rosen H.R. y Martin P., Infectious Disease Clinics of North America, septiembre 2002, 14(3):761-786).

50 En conjunto, el uso de anticuerpos policlonales derivados del plasma es limitado porque estas preparaciones tienen actividad variable, disponibilidad limitada, y representan un riesgo potencial para la transmisión de agentes

infecciosos.

Por el contrario, los anticuerpos monoclonales (mAb) pueden producirse de forma constante y no comportan los riesgos infecciosos asociados con los productos derivados del plasma.

5 En estudios previos, se han desarrollado dos anticuerpos monoclonales totalmente humanos dirigidos contra diferentes epitopos del antígeno de la superficie de la hepatitis B (HBsAg) (documentos WO/1997/047654 y WO/1199/047653). Una única administración de una mezcla de estos anticuerpos en chimpancés portadores con HBV crónica produjo una reducción inmediata en los niveles de HBsAg, seguido de una recurrencia hasta los niveles iniciales en unos pocos días (Eren et al., 2000, Hepatology, 32, 588-596).

10 Se realizó un estudio clínico de fase 1 usando una mezcla de estos anticuerpos monoclonales (denominada HBV-AB<sup>HTL</sup>, y ahora HEPEX B<sup>TM</sup>). En la parte A del estudio, los pacientes recibieron una única infusión intravenosa (IV) de anticuerpos, mientras que en la parte B los pacientes recibieron 4 infusiones semanales. La mezcla de anticuerpos resultó eficaz para reducir los niveles de HBsAg y de ADN de HBV.

15 HEPEX B<sup>TM</sup> para un uso IV se preparó inicialmente en forma de dos formulaciones líquidas distintas para cada uno de los anticuerpos (17 y 19) en disolución salina tamponada con fosfato (fosfato de sodio 65 mM, cloruro de sodio 80 mM, a pH 7,0). Los dos mAb se mezclaron antes de la administración en una proporción de aproximadamente 1:1 de unidades internacionales.

20 Es necesario desarrollar una formulación líquida de alta dosificación de HEPEX B que sea adecuada para la administración subcutánea y también intramuscular. Las preparaciones de anticuerpos líquidas anteriores tienen una caducidad baja y se puede perder la actividad biológica de los anticuerpos como resultado de inestabilidades químicas y físicas durante el almacenamiento. Así, es necesaria una formulación líquida estable para un anticuerpo anti-HBV que sea eficaz para prevenir la infección por HBV.

### **Sumario de la invención**

25 La presente invención se basa, en parte, en el desarrollo de formulaciones líquidas de alta concentración de anticuerpos, o de sus fragmentos, que se unen de modo específico a un antígeno de HBV, mostrando dicha formulación, en ausencia de sales inorgánicas pero en presencia de aminoácidos, un carbohidrato y un tensioactivo, una estabilidad y unos niveles de bajos a indetectables de fragmentación y/o agregación de los anticuerpos, y muy poca o ninguna pérdida de las actividades biológicas del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo durante la fabricación, la preparación, el transporte, y el almacenamiento. Las formulaciones líquidas de la presente invención facilitan la administración de anticuerpos, o de sus fragmentos, que se unen de modo específico a un antígeno de HBV para la prevención, el tratamiento, la gestión y/o la mejora de una infección por HBV, o de uno o más de sus síntomas. En particular, las formulaciones líquidas de la presente invención permiten administrar con rapidez una dosificación estéril de anticuerpos, o de sus fragmentos, que se unen de modo específico a un antígeno de HBV, sin tener que mezclar de forma precisa y aséptica los dos anticuerpos separados (17 y 19), o sus fragmentos, antes de la administración, según era necesario en la forma de dosificación previamente usada.

35 En la presente se describen formulaciones líquidas de anticuerpos anti-HBV, o de sus fragmentos, sustancialmente exentas de sales inorgánicas, comprendiendo dichas formulaciones un aminoácido, una sal orgánica, un tensioactivo, un carbohidrato y una concentración de aproximadamente 10 mg/ml o mayor de un anticuerpo, o de uno de sus fragmentos, que se une de modo específico a un antígeno de HBV, estando dichas formulaciones en un intervalo de pH de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 7,5, preferiblemente de aproximadamente 6,5.

40 También se describen formulaciones líquidas estables de un anticuerpo, o de uno de sus fragmentos, que se une de modo específico a un antígeno de HBV, mostrando dichas formulaciones niveles bajos a indetectables de agregación y/o fragmentación de los anticuerpos, con muy poca o ninguna pérdida de las actividades biológicas del anticuerpo, o del fragmento de anticuerpo, durante la fabricación, la preparación, el transporte, y largos periodos de almacenamiento. También se describen formulaciones líquidas estables de un anticuerpo, o de uno de sus fragmentos, que se une de modo específico a un antígeno de HBV, comprendiendo dicho anticuerpo, o fragmento de anticuerpo, un dominio de región variable pesada (VH) y de región variable ligera (VL) que tiene la secuencia de aminoácidos de cualquiera de los dominios VH y VL mostrados en la figura 1, y dichas formulaciones muestran unos niveles de bajos a indetectables de agregación y/o fragmentación de los anticuerpos, y muy poca o ninguna pérdida de las actividades biológicas de los anticuerpos, o de los fragmentos de anticuerpos.

50

**Descripción de los dibujos**

Figura 1: SDS-PAGE reducida con tinción con azul de Coomassie de muestras de una combinación de AB 17 + AB 19 en la formulación 3 que contiene T80 al 0,1 % a 4 °C, 25 °C y 40 °C. En el gel se observan las cadenas pesada y ligera.

5 Figura 2: SDS-PAGE reducida con tinción con azul de Coomassie de muestras de una combinación de AB 17 + AB 19 en la formulación 3 que contiene T80 al 0,01 % a 4 °C, 25 °C y 40 °C. En el gel se observan las cadenas pesada y ligera.

10 En la presente se describen formulaciones líquidas de anticuerpos, o de sus fragmentos, que se unen de modo específico a un antígeno de HBV, presentando dichas formulaciones estabilidad a 4 °C, según se evalúa midiendo la actividad específica (usando un inmunoensayo), la integridad y la pureza (usando SDS-PAGE, y cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (HPSEC)) de su aspecto (inspección visual) y la concentración de proteínas durante al menos 3 meses. La presente invención también incluye formulaciones líquidas de anticuerpos, o de sus fragmentos, que se unen de modo específico a un antígeno de HBV, teniendo dichas formulaciones unos niveles de bajos a indetectables de agregación de los anticuerpos, según se mide mediante HPSEC, y que además muestran poca o ninguna pérdida de las actividades biológicas de los anticuerpos, o de los fragmentos de anticuerpos, de la formulación, comparado con los anticuerpos de referencia, según se mide mediante ensayos de unión de anticuerpos tales como, por ejemplo, ELISA.

20 También se describen procedimientos para preparar formulaciones líquidas de un anticuerpo, o de uno de sus fragmentos, que se une de modo específico a un antígeno de HBV, comprendiendo dichos procedimientos concentrar una fracción que contiene el anticuerpo purificado, o un fragmento del anticuerpo purificado, hasta una concentración final de aproximadamente 10 mg/ml, aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml, aproximadamente 40 mg/ml, aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 60 mg/ml, aproximadamente 70 mg/ml, aproximadamente 80 mg/ml, aproximadamente 90 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 250 mg/ml, o aproximadamente 300 mg/ml, usando una membrana semipermeable con un límite de exclusión de peso molecular apropiado (por ejemplo, un límite de exclusión de 30 kD para moléculas de anticuerpo completas y fragmentos F(ab')<sub>2</sub>, y un límite de exclusión de 10 kD para fragmentos de anticuerpo, tales como un fragmento Fab), y filtrar la fracción de anticuerpos, o de fragmentos de anticuerpos, concentrada en el tampón de formulación usando la misma membrana.

30 En la presente se describen formulaciones que comprenden alanina a una concentración que varía de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM, o de aproximadamente 85 mM a aproximadamente 95 mM, y es más preferiblemente 90 mM.

También se describen en la presente formulaciones que comprenden además citrato de sodio a una concentración que varía de 10 mM a aproximadamente 30 mM, o de aproximadamente 15 mM a aproximadamente 25 mM, y es más preferiblemente 20 mM.

35 También se describen en la presente formulaciones que comprenden además Tween 80 a una concentración que varía de aproximadamente 0,05 % a aproximadamente 0,5 %, y es más preferiblemente de aproximadamente 0,1 %.

También se describen en la presente formulaciones que comprenden además trehalosa a una concentración que varía de aproximadamente 1 % a aproximadamente 5 %, o de aproximadamente 2 % al 4 %, y es más preferiblemente de 3 %.

40 Las formulaciones líquidas de la presente invención se preparan manteniendo los anticuerpos en una disolución acuosa en cualquier momento durante la preparación. En otras palabras, las formulaciones líquidas se preparan sin implicar ninguna etapa de secado de los anticuerpos o de las propias formulaciones, por ejemplo, mediante liofilización, secado al vacío, etc.

45 Las formulaciones líquidas de la presente invención pueden esterilizarse mediante una filtración estéril usando un filtro de 0,2 micrómetros. Las formulaciones líquidas esterilizadas de la presente invención pueden administrarse a un sujeto para prevenir, tratar, gestionar o mejorar una infección por HBV, o uno o más de sus síntomas.

50 También se describen en la presente kits que comprenden las formulaciones líquidas de anticuerpos, o sus fragmentos, que se unen de modo específico a un antígeno de HBV para su uso, por ejemplo, por un profesional sanitario o por el paciente. La presente invención proporciona además procedimientos para prevenir, tratar, gestionar o mejorar una infección por HBV, o uno o más de sus síntomas, mediante la administración de las formulaciones líquidas de la presente invención.

Se entiende que los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos también incluyen fragmentos Fab, fragmentos Fv, anticuerpos monocatenarios, diacuerpos y otras moléculas de unión que pueden sintetizarse o producirse basándose

en las propiedades de unión o CDR de los anticuerpos descritos en la presente.

Por consiguiente, la presente invención proporciona:

(1) Una formulación de anticuerpos que comprende:

- 5 a) al menos 10 mg/ml de un anticuerpo AB17 (que puede obtenerse a partir del hibridoma depositado en el ECACC con el nº de registro 96052169) o AB19 (que puede obtenerse a partir del hibridoma depositado en el ECACC con el nº de registro 96052168);
- b) alanina a una concentración de 85 mM a 95 mM, o 90 mM;
- c) citrato de sodio a una concentración de 10 mM a 30 mM, o 20 mM;
- d) Tween 80 a una concentración del 0,05 % al 0,5 %, o al 0,1 %; y
- 10 e) trehalosa a una concentración del 1 % al 10 %, o al 3 %;
- en un vehículo acuoso.

(2) La formulación de (1), en la que el vehículo acuoso es agua destilada.

(3) La formulación de (1), en la que la formulación es estéril.

(4) La formulación de (1), en la que la formulación es homogénea.

15 (5) La formulación de (1), en la que la formulación tiene un pH en el intervalo de 5,0 a 7,5.

(6) La formulación de (1), en la que el anticuerpo está a una concentración de al menos:

- a) 20 mg/ml,
- b) 40 mg/ml,
- c) 80 mg/ml, o
- 20 d) 100 mg/ml.

(7) La formulación de (1), en la que el anticuerpo es:

- a) estable a temperatura ambiente durante al menos 6 meses, según se determina mediante una cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (HPSEC), o
- b) estable a 4 °C durante al menos 2 años, según se determina mediante HPSEC.

25 (8) La formulación de (1), en la que menos del:

- a) 10 % del anticuerpo forma un agregado, según se mide mediante HPSEC, o
- b) 5 % del anticuerpo forma un agregado, según se mide mediante HPSEC.

(9) Una forma de dosificación unitaria farmacéutica adecuada para la administración parenteral a un ser humano, que comprende una formulación de anticuerpos (1) en un recipiente farmacéuticamente aceptable.

30 (10) La forma de dosificación unitaria farmacéutica de (9), en la que dicho anticuerpo tiene una concentración de:

- a) 10 mg/ml a 100 mg/ml en un volumen de 1 ml a 20 ml, o
- b) 80 mg/ml en un volumen de 1 ml.

(11) La forma de dosificación unitaria farmacéutica de (9), en la que dicha formulación de anticuerpos es adecuada para:

- 35 a) la administración subcutánea,
- b) la administración intravenosa, o
- c) la administración intramuscular.

(12) Un recipiente sellado que comprende una formulación de (1).

(13) El uso de la formulación de (1) para la fabricación de un medicamento para su uso en un procedimiento para el tratamiento de infecciones por HBV en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la administración de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de la formulación de (1).

5 (14) El uso de la formulación de (1) para la fabricación de un medicamento para su uso en un procedimiento para reducir la infección por HBV de un hígado transplantado, que comprende administrar a un individuo que lo necesita la formulación de (1).

10 (15) El uso de la formulación de (1) para la fabricación de un medicamento para su uso en un procedimiento para tratar a un individuo nacido de una madre infectada por HBV, que comprende administrar a dicho individuo una formulación de (1).

(16) El uso de la formulación de (1) para la fabricación de un medicamento para su uso en un procedimiento para tratar a un trabajador sanitario expuesto a HBV, que comprende administrar la formulación de (1) a dicho trabajador sanitario.

(17) El uso según una cualquiera de (13)-(16), en el que la formulación se administra:

- 15 a) por vía parenteral,  
b) por vía intramuscular,  
c) por vía intravenosa, o  
d) por vía subcutánea.

(18) Una formulación que comprende:

- 20 a) al menos 10 mg/ml de al menos dos anticuerpos que se unen de modo específico a un antígeno de HBV;  
b) alanina a una concentración de 85 mM a 95 mM, o 90 mM;  
c) citrato de sodio a una concentración de 10 mM a 30 mM, o 20 mM;  
d) Tween 80 a una concentración del 0,05 % al 0,5 %, o al 0,1 %; y  
e) trehalosa a una concentración del 1 % al 10 %, o al 3 %;

25 en un vehículo acuoso, en la que al menos uno de dichos anticuerpos es el anticuerpo AB17 (que puede obtenerse a partir del hibridoma depositado en el ECACC con el nº de registro 96052169) y al menos un segundo de dichos anticuerpos es el anticuerpo AB19 (que puede obtenerse a partir del hibridoma depositado en el ECACC con el nº de registro 96052168).

(19) Una formulación según (1) o (18) para su uso en:

- 30 a) el tratamiento del HBV,  
b) la reducción de la infección por HBV en un hígado transplantado,  
c) el tratamiento de un individuo nacido de una madre infectada por HBV, o  
d) el tratamiento de un trabajador sanitario expuesto a HBV.

**Descripción detallada de la invención**

35 PROCEDIMIENTOS

Secuencias de aminoácidos de los dominios VL y VH de AB 19 y AB 17:

AB 19 VL (SEQ ID NO:1)

**SYVLTQPPSV SVAPGKTARI SCGGNNIGTK NVHWYQQKPG QAPVLVYYAD**

**SDRPSGIPER FSGSNSGNTA TLTISRVEVG DEADYYCQVW DSVSYHVVF**

**GGTTLTVLG**

AB 19 VH (SEQ ID NO:2)

**QVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAPSGFVFR SYGMHWVVRQT PGKGLEWVSL  
IWHDGSNRFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAMYFCARER  
LIAAPAAFDL WGQGTLVTVS S**

AB 17 VL (SEQ ID NO:3)

**DIVMTQSPLS LSVTPGEPAS ISCRSSQSLL HRSGNNYLDW YLQKPGHSPQ  
LLIYVGSNRA SGVPDRFSGS GSGTEYTLKI SRVEAEDVGV YYCMQALQTP  
RTFGQGTKLE IK**

AB 17 VH (SEQ ID NO:4)

**QVQLVESGGG VVRPGRSLRL SCAASGF AFS DYSINWVRQA PGKGLEWVAI  
ISYDGRITYY RDSVKGRFTI SRDDSKNTLY LQMNSLR TED TAVYYCARQY  
YDFWSGSSVG RNYDGMDVWG LGTTVTVSS**

5

10

15

Para determinar la formulación que proporcione un alto grado de estabilidad para los anticuerpos AB 17 y AB19 se ensayaron diferentes excipientes estableciendo el perfil de la estabilidad estructural de los anticuerpos mientras sufren cambios (a lo largo del tiempo y del pH) y la exposición a condiciones de estrés (por ejemplo, estrés por cizallamiento y ciclos de congelación-descongelación lentos), incluyendo estudios de estabilidad acelerada mediante una incubación a 50 °C durante una o dos semanas. En diversos momentos del tiempo (por ejemplo,  $t_0$ ,  $t_7$ ,  $t_{14}$ ) se estudia la estabilidad de las moléculas con y sin estrés usando las siguientes herramientas: dispersión de luz de ángulo derecho (RALS), fluorescencia intrínseca y extrínseca (IF, EF) junto con procedimientos analíticos, tales como cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (HP-SEC).

20

La RALS se emplea para detectar y controlar los cambios sutiles en el comportamiento asociativo de la molécula, que pueden provocar la agregación y/o la precipitación. La RALS controla los cambios macroscópicos como transiciones de moléculas solubles a agregados insolubles. El ensayo de IF mide los cambios conformacionales inducidos por el estrés en proteínas, según se observa mediante cambios en el entorno del triptófano. La FE usa una sonda fluorescente sensible a la polaridad, no covalente y externa para estudiar la exposición aparente de la proteína a hendiduras hidrófobas y para controlar posibles cambios en este parámetro como una función de diversas condiciones y estrés ambientales.

#### CONGELACIÓN-DESCONGELACIÓN LENTA

25

Después de la lectura inicial de RALS o turbidez, aproximadamente 400  $\mu$ l de muestra se congelan lentamente en un tubo Eppendorf colocándolo en un congelador a -80 °C. Después de que se completase la congelación (mínimo de cuatro horas), todas las muestras se descongelaron sobre la mesa del laboratorio (temperatura ambiental). El procedimiento se repitió durante un total de 5 ciclos.

#### ESTRÉS POR CIZALLAMIENTO

30

Se sometieron a un estrés por cizallamiento a aproximadamente 750  $\mu$ l de la formulación ensayada en un vial de vidrio cónico usando una barra de agitación triangular. Las muestras se centrifugaron a 300 rpm (sin cavitación) durante 24 horas antes de retirar el agitador magnético para el análisis.

#### SDS-PAGE

35

Se realizó una electroforesis en gel de dodecilsulfato de sodio-poliacrilamida (SDS-PAGE) usando un gradiente de Bis-Tris al 4-12 %.

Se mezclaron 2 µg de la combinación de anticuerpos con un tampón de muestra nativo (InvitroGen) que contiene DTT 50 mM y se incubó durante 10 min a 100 °C antes de cargar.

5 Los geles se ensayaron a 200 V durante aproximadamente 30 min, y después se enjuagaron dos veces en DDW durante 3 min. Los geles después se tiñeron con azul de Coomassie (Gelcode, Pierce) mientras se agitaba durante una hora, y después se enjuagaron en DDW durante la noche.

Las fotografías de los geles se tomaron usando el programa Lis-cap en una cámara Renium.

### Ejemplo 1

10 Este ejemplo describe la selección de excipientes para una formulación líquida que comprende los anticuerpos anti-HBsAg humanos AB 19 y AB 17, teniendo AB 19 la secuencia de aminoácidos que aparece en la figura 1A (cadena ligera, SEQ ID NO:1) y 1B (cadena pesada, SEQ ID NO:2), y teniendo AB 17 la secuencia de aminoácidos que aparece en la figura 1C (cadena ligera, SEQ ID NO:3) y 1D (cadena pesada, SEQ ID NO:4).

15 AB 19 y AB 17 pueden ser producidos por células de dos hibridomas (depositados en el ECACC con el n° de registro 96052169 y 96052168), o pueden prepararse por procedimientos recombinantes muy conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante sistemas de expresión en CHO transfectadas con los genes que codifican la cadena pesada y ligera de cada anticuerpo.

#### Selección del tampón

20 Se compararon varios valores de pH para la formulación que varían de 5,0 a 7,5 generados usando diferentes tampones: citrato de sodio, histidina o ácido succínico. Se estudiaron AB 17 y AB 19 en los diferentes tampones mediante IF, RALS, EF y SEC-HPLC bajo diferentes condiciones: incubación a 50 °C durante siete y catorce días, exposición al estrés por cizallamiento y ciclos de congelación-descongelación lentos.

La formulación que contenía citrato a pH 6,5 mostró la mejor actuación en los ensayos y, por tanto, se eligió al citrato de sodio como tampón preferido para la formulación.

#### Evaluación de los aminoácidos como estabilizantes

25 Usando el citrato de sodio como tampón, se generó una serie de formulaciones que contenían diferentes aminoácidos a una concentración de 50 mM.

Estas formulaciones se estudiaron mediante IF, RALS, EF y SEC-HPLC, y se sometieron a estrés por cizallamiento y ciclos de congelación-descongelación lentos.

Las formulaciones que contenían ácido glutámico y prolina obtuvieron la puntuación más alta, seguidas de la formulación que contenía alanina.

30 Estos tres aminoácidos se analizaron después para establecer la viabilidad de concentrar los anticuerpos hasta 100 mg/ml.

35 La formulación que contiene alanina obtuvieron la mejor puntuación en los estudios de concentración. Puesto que el ácido glutámico había obtenido la mejor puntuación en el estudio previo, se eligieron estos dos aminoácidos como aminoácidos estabilizantes preferidos y se reestudiaron en un estudio de combinación que incluía más excipientes de la formulación, tal como se describirá a continuación.

#### Evaluación de los carbohidratos y los tensioactivos como estabilizantes

Los carbohidratos se usan generalmente como estabilizantes, ajustadores de la isotonicidad y/o agentes de carga (en el caso de la liofilización). Los tensioactivos se usan generalmente para proteger a las proteínas frente al estrés por cizallamiento.

40 Se generaron varias formulaciones que contenían cada una citrato de sodio 20 mM, ácido glutámico 50 mM y un carbohidrato o un tensioactivo diferente. Se estudiaron los siguientes excipientes: lactosa, manosa, manitol, sorbitol, sacarosa y trehalosa (al 3 %), PEG-3350 y PEG-4000 (al 1 %), Tween-20 y Tween-80 (al 0,1 %).

Todas las formulaciones se estudiaron mediante IF, RALS, EF y SEC-HPLCA, y se sometieron a un estrés por cizallamiento y congelación-descongelación lenta.

45 Las formulaciones que contenían trehalosa y sorbitol obtuvieron la mejor puntuación a lo largo del tiempo. Por tanto, ambos carbohidratos se eligieron como carbohidratos preferidos para la formulación de anticuerpos y se estudiarían posteriormente en el estudio de combinación.

La formulación que contenía Tween-80 (T80) obtuvo la mejor puntuación entre los tensioactivos, y por tanto se eligió T80 como tensioactivo preferido para la formulación de anticuerpos.

5 Por último, basándose en los datos descritos anteriormente, se prepararon varias formulaciones de los anticuerpos estudiando diferentes combinaciones de excipientes estabilizantes para determinar la combinación preferida. Estas combinaciones se ensayaron mediante IF, RALS, EF y SEC-HPLC.

Estos ensayos indicaron que el citrato de sodio a pH 6,5 proporciona la mayor estabilidad a AB 17 y AB 19. Los aminoácidos alanina y ácido glutámico se identificaron como principales estabilizantes para AB 17 y AB 19, y la trehalosa se seleccionó frente al otro estabilizante fuerte, el sorbitol. Se descubrió que el tensioactivo, Tween 80, reducía el estrés por cizallamiento de la molécula.

10 Basándose en estos descubrimientos, se evaluaron cuatro formulaciones líquidas que contenían los excipientes preferidos para la selección de una formulación clínica preferida para su uso en el tratamiento o la prevención de infecciones por HBV. Las formulaciones se muestran en la siguiente tabla 1.

Tabla 1

<b>Matriz de formulaciones preparada para este estudio</b>				
nº de formulación	Citrato de Na (mM)	Alanina (mM)	T80 (%)	Trehalosa (%)
1	20	20	0,1	5
2	20	50	0,1	4
3	20	90	0,1	3
4	20	20	0,05	5

15 Estas formulaciones se volvieron a estudiar usando los ensayos descritos anteriormente. Tras someterlas a estrés por temperatura, cizallamiento y congelación-descongelación, todas las formulaciones mantuvieron una alta pureza y recuperación. En conjunto, la formulación 3 tuvo una actuación ligeramente mejor a lo largo de un estudio de estabilidad de 28 días. Esto sugiere que una mayor concentración de alanina puede ayudar a estabilizar los anticuerpos.

## 20 **Ejemplo 2**

### **Preparación de una formulación de AB 17**

La disolución madre de AB 17 (en PBS) se diluyó 1:1 antes de concentrar con una disolución de citrato de sodio 20 mM, alanina 50 mM y NaCl 100 mM para proporcionar estabilidad mientras se concentraba. La proteína entonces se concentró hasta aproximadamente 89 mg/ml mediante filtración del flujo tangencial (TFF) a lo largo de 4 días. El AB 17 concentrado fue ligeramente turbio, y se obtuvo 80 % de recuperación del TFF.

Se intercambió el tampón del anticuerpo usando un tubo de diálisis (límite de exclusión de PM = 25.000) hacia la formulación preferida, según se describió anteriormente.

### **Ejemplo 3**

30 Este ejemplo describe los ensayos de estabilidad realizados sobre la combinación de anticuerpos AB 17 y AB 19 en la formulación 3. Los estudios de estabilidad se realizaron en muestras almacenadas bajo unas temperaturas controladas de 5 °C, 25 °C y 40 °C.

Se prepararon muestras de combinación que contenían 90 mg/ml de AB 17 + 30 mg/ml de AB 19 en 2 ml (concentración final 60 mg/ml) en la formulación 3 que contenía Tween 80 al 0,1 % o Tween 80 al 0,01 %. Las muestras se sometieron a SDS-PAGE bajo condiciones reducidas para comprobar la pureza de la muestra y la presencia de productos de la degradación.

35 Las figuras 2 y 3 muestran muestras de anticuerpos después de una incubación durante 4 semanas a diferentes temperaturas de almacenamiento (figura 2: formulación 3 que contiene T80 al 0,1 %; figura 3: formulación 3 que contiene T80 al 0,01 %). Las cadenas de los anticuerpos permanecen intactas a todas las temperaturas medidas, según se observa por las dos bandas diferenciadas que representan cada una la cadena pesada y ligera de los anticuerpos. No se detectaron impurezas ni productos de la degradación. Ambas concentraciones de Tween 80

## ES 2 407 468 T3

ensayadas (0,1 % y 0,01 %) fueron eficaces para estabilizar los anticuerpos.

5 Se midió una propiedad funcional de los anticuerpos, es decir, la unión a HBsAg, usando un inmunoensayo y se muestra en la tabla 3. Se midió la actividad específica (UI/mg) en el tiempo 0 ( $T_0$ ) al comienzo de la incubación y se comparó con la actividad específica 4 semanas ( $T_4$ ) después de una incubación a diferentes temperaturas. Tal como puede observarse en la tabla 3, la actividad específica de los anticuerpos no cambió significativamente después de 4 semanas de incubación, lo cual proporciona otro indicio de su estabilidad en las formulaciones ensayadas.

Tabla 2

Temperatura	Formulación 3 + T80 al 0,1 % $T_0$ (UI/mg)	Formulación 3 + T80 al 0,1 % $T_4$ (UI/mg)	Formulación 3 + T80 al 0,01 % $T_0$ (UI/mg)	Formulación 3 + T80 al 0,01 % $T_4$ (UI/mg)
5 °C	919,5	853,3	786	863,6
25 °C	919,5	909,5	786	883,74
40 °C	919,5	886,4	786	745,76

### Ejemplos 5-33

10 Se prepararon otros ejemplos tal como se describió anteriormente usando las siguientes formulaciones y se mantuvieron a 5 °C, 25 °C y 40 °C:

Ej.	mAb	Conc. (mg/ml)	Formulación	% de Tween 80	% de trehalosa	Prop. molar Tre:mAb
5	17	30 mg/ml	citrate de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	3	395
6	17	30 mg/ml	citrate de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,01 %	0,01	3	395
7	17	60 mg/ml	citrate de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	3	198
8	17	60 mg/ml	citrate de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,01 %	0,01	3	198
9	17	90 mg/ml	citrate de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	3	132
10	17	90 mg/ml	citrate de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,01 %	0,01	3	132
11	17	30 mg/ml	citrate de Na 20 mM, alanina 50 mM, trehalosa al 6 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	6	795

ES 2 407 468 T3

12	17	60 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 50 mM, trehalosa al 10 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	10	660
13	17	60 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 50 mM, trehalosa al 10 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	10	660
14	17	90 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 50 mM, trehalosa al 10 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	10	440
15	19	10 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	3	1196
16	19	10 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,01 %	0,01	3	1196
17	19	20 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	3	594
18	19	20 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,01 %	0,01	3	594
19	19	30 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	3	395
20	19	30 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,01 %	0,01	3	395
21	19	20 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 50 mM, trehalosa al 6 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	6	1195
22	19	20 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 50 mM, trehalosa al 6 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	6	1195
23	19	30 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 50 mM, trehalosa al 6 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	6	795
24	17 y 19	20 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %,	0,1	3	594

ES 2 407 468 T3

			Tween 80 al 0,1 %			
25	17 y 19	20 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,01 %	0,01	3	594
26	17 y 19	40 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	3	304
27	17 y 19	40 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,01 %	0,01	3	304
28	17 y 19	60 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	3	198
29	17 y 19	60 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 90 mM, trehalosa al 3 %, Tween 80 al 0,01 %	0,01	3	198
30	17 y 19	20 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 50 mM, trehalosa al 6 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	6	1195
31	17 y 19	20 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 50 mM, trehalosa al 6 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	6	1195
32	17 y 19	40 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 50 mM, trehalosa al 6 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	6	612
33	17 y 19	40 mg/ml	citrato de Na 20 mM, alanina 50 mM, trehalosa al 10 %, Tween 80 al 0,1 %	0,1	10	1015

Los resultados de la estabilidad de los ejemplos 4-32 después de 3 meses fueron los siguientes:

	% de integración manual de monómeros (12 semanas)	SDS-PAGE no reducida, % de banda o bandas principales (135-175 kDa)	SDS-PAGE no reducida (% de PM4 (pesada) + % de PM5 (ligera))
+++	> 88 %	> 86 %	> 95 %
++	86 %-88 %	81 %-86 %	89 %-95 %
+	< 86 %	< 81 %	< 89 %

Ej.	Temp. (°C)	% de integración manual de	SDS-PAGE NR (12	SDS-PAGE reducida (12
-----	------------	----------------------------	-----------------	-----------------------

ES 2 407 468 T3

		monómeros (12 semanas)	semanas) <sup>1</sup>	semanas) <sup>1</sup>
5	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	+++	++
6	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	+++	+++	+++
7	2	+++	++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	+	++
8	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	++	+
9	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	+	++	+++
10	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	+++	+++
11	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	+	++	+++
12	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	+	++	+++
13	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	+	+	+++
14	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	+	++	+++
15	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	+	+++	++

ES 2 407 468 T3

16	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	+++	++
17	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	++	++
18	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	+++	+
19	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	+	++	++
20	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	+++	+
21	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	+	++	++
22	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	+	++	++
23	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	+	+	+
24	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	+++	+	+++
25	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	+++	+	+++
26	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	+++	+++
27	2	+++	+++	+++

ES 2 407 468 T3

	25	+++	+++	+++
	40	+++	+	+++
28	2	+++	++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	+	+++
29	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	+	+++
30	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	+++	+++
31	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	+++	+++
32	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	++	+++
33	2	+++	+++	+++
	25	+++	+++	+++
	40	++	+	+++

Los anteriores datos de estabilidad a los tres meses demuestran que algunas formulaciones de 17 y 19 en combinación a 40 °C tuvieron una actuación buena o mejor que formulaciones similares de 17 o 19 individuales.

Tras el término “aproximadamente” usado para describir las cantidades en la presente, la cantidad precisa que sigue al término “aproximadamente” también se contempla en cada caso.

5

**REIVINDICACIONES**

- 1.- Una formulación de anticuerpos que comprende:
- 5 a) al menos 10 mg/ml de un anticuerpo AB17, que puede obtenerse a partir del hibridoma depositado en el ECACC con el nº de registro 96052169, o AB19, que puede obtenerse a partir del hibridoma depositado en el ECACC con el nº de registro 96052168;
- b) alanina a una concentración de 85 mM a 95 mM, o 90 mM;
- c) citrato de sodio a una concentración de 10 mM a 30 mM, o 20 mM;
- d) Tween 80 a una concentración del 0,05 % al 0,5 %, o al 0,1 %; y
- e) trehalosa a una concentración del 1 % al 10 %, o al 3 %;
- 10 en un vehículo acuoso.
- 2.- La formulación de la reivindicación 1, en la que el vehículo acuoso es agua destilada.
- 3.- La formulación de la reivindicación 1, en la que la formulación es estéril.
- 4.- La formulación de la reivindicación 1, en la que la formulación es homogénea.
- 5.- La formulación de la reivindicación 1, en la que la formulación tiene un pH en el intervalo de 5,0 a 7,5.
- 15 6.- La formulación de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo está a una concentración de al menos:
- a) 20 mg/ml,
- b) 40 mg/ml,
- c) 80 mg/ml, o
- d) 100 mg/ml.
- 20 7.- La formulación de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo es:
- a) estable a temperatura ambiente durante al menos 6 meses, según se determina mediante cromatografía de exclusión molecular de alto rendimiento (HPSEC), o
- b) estable a 4 °C durante al menos 2 años, según se determina mediante HPSEC.
- 8.- La formulación de la reivindicación 1, en la que menos del:
- 25 a) 10 % del anticuerpo forma un agregado, según se mide mediante HPSEC, o
- b) 5 % del anticuerpo forma un agregado, según se mide mediante HPSEC.
- 9.- Una forma de dosificación unitaria farmacéutica adecuada para la administración parenteral a un ser humano, que comprende una formulación de anticuerpos de la reivindicación 1 en un recipiente farmacéuticamente aceptable.
- 30 10.- La forma de dosificación unitaria farmacéutica de la reivindicación 9, en la que dicho anticuerpo tiene una concentración de:
- a) 10 mg/ml a 100 mg/ml en un volumen de 1 ml a 20 ml, o
- b) 80 mg/ml en un volumen de 1 ml.
- 11.- La forma de dosificación unitaria farmacéutica de la reivindicación 9, en la que dicha formulación de anticuerpos es adecuada para:
- 35 a) la administración subcutánea,
- b) la administración intravenosa, o
- c) la administración intramuscular.
- 12.- Un recipiente sellado que comprende una formulación de la reivindicación 1.

- 13.- Uso de la formulación de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para su uso en un procedimiento para el tratamiento de infecciones por HBV en un sujeto, comprendiendo dicho procedimiento la administración de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de la formulación de la reivindicación 1.
- 5 14.- Uso de la formulación de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para su uso en un procedimiento para reducir la infección por HBV de un hígado transplantado, que comprende administrar a un individuo que lo necesita la formulación de la reivindicación 1.
- 15.- Uso de la formulación de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para su uso en un procedimiento para tratar a un individuo nacido de una madre infectada por HBV, que comprende administrar a dicho individuo la formulación de la reivindicación 1.
- 10 16.- Uso de la formulación de la reivindicación 1 para la fabricación de un medicamento para su uso en un procedimiento para tratar a un trabajador sanitario expuesto a HBV, que comprende administrar la formulación de la reivindicación 1 a dicho trabajador sanitario.
- 17.- Uso según una cualquiera de las reivindicaciones 13-16, en el que la formulación se administra:
- a) por vía patenteral,
- 15 b) por vía intramuscular,
- c) por vía intravenosa, o
- d) por vía subcutánea.
- 18.- Una formulación que comprende:
- a) al menos 10 mg/ml de al menos dos anticuerpos que se unen de modo específico a un antígeno de HBV;
- 20 b) alanina a una concentración de 85 mM a 95 mM, o 90 mM;
- c) citrato de sodio a una concentración de 10 mM a 30 mM, o 20 mM;
- d) Tween 80 a una concentración del 0,05 % al 0,5 %, o al 0,1 %; y
- e) trehalosa a una concentración del 1 % al 10 %, o al 3 %;
- 25 en un vehículo acuoso, en la que al menos uno de dichos anticuerpos es el anticuerpo AB17, que puede obtenerse a partir del hibridoma depositado en el ECACC con el nº de registro 96052169, y al menos un segundo de dichos anticuerpos es el anticuerpo AB19, que puede obtenerse a partir del hibridoma depositado en el ECACC con el nº de registro 96052168.
- 19.- Una formulación según la reivindicación 1 o la reivindicación 18, para su uso en:
- a) el tratamiento del HBV,
- 30 b) la reducción de la infección por HBV en un hígado transplantado,
- c) el tratamiento de un individuo nacido de una madre infectada por HBV, o
- d) el tratamiento de un trabajador sanitario expuesto a HBV.

**Fig. 1**



- 1 - AB 17 y AB19, 4°C, 2 μg/carril
- 2 - AB 17 y AB19, 25°C, 2 μg/carril
- 3 - AB 17 y AB19, 40°C, 2 μg/carril

**Fig. 2**



- 1 - AB 17 y AB19, 4°C, 2 µg/carril
- 2 - AB 17 y AB19, 25°C, 2 µg/carril
- 3 - AB 17 y AB19, 40°C, 2 µg/carril