

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 435 462**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 39/395** (2006.01)

**C07K 1/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.07.1996 E 10178416 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.09.2013 EP 2275119**

54 Título: **Formulación de proteína liofilizada isotónica estable**

30 Prioridad:

**27.07.1995 US 508014**

**14.03.1996 US 615369**

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

**19.12.2013**

73 Titular/es:

**GENENTECH, INC. (100.0%)**

**1 DNA Way**

**South San Francisco, CA 94080-4990, US**

72 Inventor/es:

**ANDYA, JAMES;**

**CLELAND, JEFFREY, L.;**

**HSU, CHUNG, C.;**

**LAM, XANTHE, M.;**

**OVERCASHIER, DAVID, E.;**

**SHIRE, STEVEN, J.;**

**YANG, JANET, YU-FENG y**

**WU, SYLVIA, SAU-YAN**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

ES 2 435 462 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 de proteína liofilizada isotónica estable

**5 Antecedentes de la invención****Campo de la invención**

10 **[0001]** La presente invención se refiere a una formulación de proteína liofilizada. En particular, se refiere a una formulación de proteína liofilizada estable que se puede reconstituir con un diluyente para generar una formulación reconstituida estable adecuada para la administración subcutánea.

**Descripción de documentos relacionados**

15 **[0002]** En los últimos diez años, los avances en biotecnología han posibilitado producir un conjunto de proteínas para aplicaciones farmacéuticas utilizando técnicas de ADN recombinante. Dado que las proteínas son más grandes y más complejas que los fármacos orgánicos e inorgánicos tradicionales (es decir, poseen múltiples grupos funcionales además de estructuras tridimensionales complejas), la formulación de dichas proteínas plantea problemas especiales. Para que una proteína permanezca biológicamente activa, una formulación debe conservar  
20 intacta la integridad conformacional de por lo menos una secuencia central de los aminoácidos de la proteína, a la vez que protege los múltiples grupos funcionales de la proteína de la degradación. Los mecanismos de degradación para las proteínas pueden implicar la inestabilidad química (es decir, cualquier proceso que implica la modificación de la proteína mediante la formación de enlaces o la escisión que dan lugar a una nueva entidad química) o inestabilidad física (es decir, cambios en la estructura de orden superior de la proteína). La inestabilidad química  
25 puede resultar de la desamidación, racemización, hidrólisis; oxidación, beta eliminación o intercambio de enlaces disulfuro. La inestabilidad física puede resultar de la desnaturalización, agregación, precipitación o adsorción, por ejemplo. Los tres mecanismos de degradación de proteínas más comunes son la agregación, desamidación y oxidación de proteínas. Cleland et al. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4): 307-377 (1993).

30 **[0003]** La liofilización es una técnica utilizada habitualmente para conservar proteínas que sirve para extraer el agua de la preparación de proteína de interés. El secado por congelación, o liofilización, es un proceso por el cual el material a secar primero se congela y a continuación se extrae el hielo o el disolvente congelado mediante sublimación en un medio de vacío. Se puede incluir un excipiente en formulaciones preliofilizadas para aumentar la estabilidad durante el proceso de liofilizado y/o para mejorar la estabilidad del producto liofilizado tras el  
35 almacenamiento. Pikal, M. *Biopharm.* 3(9)26-30 (1990) y Arakawa et al. *Pharm. Res.* 8(3): 285-291 (1991).

**[0004]** El documento EP-A-661060 está dirigido a formulaciones de inmunoglobulina tolerables IV estables que tienen un contenido de Ig de 13,5-17,5% p/v, con una osmolaridad de 250-600 mOs/l, y una viscosidad no superior a 9 cP. Se indica que se puede utilizar como una preparación altamente concentrada sin una viscosidad  
40 excesivamente elevada, que es un problema para la administración IV. El problema es por tanto la viscosidad de la formulación resultante y no con la fabricación de la propia formulación. Aunque se menciona la posibilidad de liofilización, no se ejemplifica, y no se reconoce ningún problema que se pueda asociar con la misma.

**[0005]** Un objetivo de la presente invención es proporcionar una formulación de proteína liofilizada que es estable tras el almacenamiento y la liberación. Se describe en el presente documento una formulación de proteína reconstituida estable que sea adecuada para la administración subcutánea. En ciertas realizaciones, un objetivo es proporcionar una formulación con múltiples usos que sea estable durante por lo menos el tiempo durante el cual se administrará a un paciente.

**50 Descripción resumida de la invención**

**[0006]** La presente invención se basa en el descubrimiento de que se puede preparar una formulación de proteína liofilizada estable utilizando un lioprotector (preferiblemente un azúcar, tal como sacarosa o trehalosa), cuya formulación liofilizada se puede reconstituir para generar una formulación reconstituida estable que tiene una  
55 concentración de proteína que es significativamente superior (por ejemplo, de aproximadamente 2-40 veces superior, preferiblemente 3-10 veces superior y los más preferiblemente 3-6 veces superior) que la concentración de proteína en la formulación preliofilizada. En particular, aunque la concentración de proteína en la formulación preliofilizada puede ser 5 mg/ml o menos, la concentración de proteína en la formulación reconstituida es generalmente 50 mg/ml o más. Dichas concentraciones elevadas de proteína en la formulación reconstituida se consideran particularmente útiles cuando la formulación está destinada a administración subcutánea. A pesar de la  
60 concentración muy elevada de proteína en la formulación reconstituida, se ha observado que la formulación reconstituida es estable (es decir, no muestra niveles significativos o inaceptables de inestabilidad química o física de la proteína) a 2-8°C durante por lo menos aproximadamente 30 días. En ciertas realizaciones, la formulación reconstituida es isotónica. A pesar del uso de concentraciones más bajas del lioprotector para conseguir dichas formulaciones isotónicas tras la reconstitución, se descubrió en el presente documento que la proteína en la formulación liofilizada mantiene esencialmente su estabilidad física y química y la integridad tras la liofilización y el  
65

almacenamiento.

5 **[0007]** Cuando se reconstituye con un diluyente que comprende un conservante (tal como agua bacteriostática para inyección, BWFI), la formulación reconstituida se puede utilizar como una formulación de múltiples usos. Dicha formulación es útil, por ejemplo, cuando el paciente requiere administraciones subcutáneas frecuentes de la proteína para tratar una afección médica crónica. La ventaja de una formulación de múltiples usos es que facilita el uso para el paciente, reduce pérdidas al permitir el uso completo del contenido de viales, y da lugar a un ahorro de costes significativo para el fabricante ya que varias dosis están empaquetadas en un único vial (menos costes de relleno y transporte).

10 **[0008]** Se describe en el presente documento una formulación reconstituida isotónica que comprende una proteína en una cantidad de por lo menos aproximadamente 50 mg/ml y un diluyente, cuya formulación reconstituida se ha preparado a partir de una mezcla liofilizada de una proteína y un lioprotector, en la que la concentración de proteína en la formulación reconstituida es aproximadamente 2-40 veces superior a la concentración de proteína en la mezcla antes de la liofilización.

15 **[0009]** Se describe en el presente documento una formulación reconstituida estable que comprende un anticuerpo en una cantidad de por lo menos aproximadamente 50 mg/ml y un diluyente, cuya formulación reconstituida se ha preparado a partir de una mezcla liofilizada de un anticuerpo y un lioprotector, en la que la concentración de anticuerpo en la formulación reconstituida es aproximadamente 2-40 veces superior a la concentración de anticuerpo en la mezcla antes de la liofilización.

20 **[0010]** La proporción de lioprotector:proteína en la formulación liofilizada de los párrafos anteriores depende, por ejemplo, de la proteína y el lioprotector de elección, así como de la concentración de proteína y la isotonicidad de la formulación reconstituida deseada. En el caso de un anticuerpo de longitud completa (como la proteína) y trehalosa o sacarosa (como el lioprotector) para generar una formulación reconstituida isotónica de concentración de proteína elevada, la proporción puede ser, por ejemplo, 200-600 moles de trehalosa:1 mol de anticuerpo.

25 **[0011]** En general, la formulación preliofilizada de la proteína y el lioprotector incluirá además un tampón que proporciona a la formulación un pH adecuado, dependiendo de la proteína en la formulación. Para este objetivo, se ha encontrado que es deseable utilizar un tampón de histidina ya que, tal como se demuestra a continuación, éste parece tener propiedades lioprotectoras.

30 **[0012]** La formulación puede incluir además un tensoactivo (por ejemplo, un polisorbato) ya que se ha observado en el presente documento que éste puede reducir la agregación de la proteína reconstituida y/o reducir la formación de partículas en la formulación reconstituida. El tensoactivo se puede añadir, según se desee, a la formulación preliofilizada, la formulación liofilizada y/o la formulación reconstituida (pero preferiblemente la formulación preliofilizada).

35 **[0013]** Se describe en el presente documento un método de preparación de una formulación reconstituida isotónica estable que comprende reconstituir una mezcla liofilizada de una proteína y un lioprotector en un diluyente, de manera que la concentración de proteína en la formulación reconstituida es por lo menos de 50 mg/ml, en el que la concentración de proteína en la formulación reconstituida es aproximadamente 2-40 veces superior a la concentración de proteína en la mezcla antes de la liofilización.

40 **[0014]** Se describe en el presente documento un método para la preparación de una formulación que comprende las etapas de: (a) liofilizar una mezcla de una proteína y un lioprotector; y (b) reconstituir la mezcla liofilizada de la etapa (a) en un diluyente, de manera que la formulación reconstituida es isotónica y estable y tiene una concentración de proteína de por lo menos aproximadamente 50 mg/ml. Por ejemplo, la concentración de proteína en la formulación reconstituida puede ser de aproximadamente 80 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml. En general, la concentración de proteína en la formulación reconstituida es aproximadamente 2-40 veces mayor que la concentración de proteína en la mezcla antes de la liofilización.

45 **[0015]** En el presente documento también se describe un artículo de fabricación que comprende: (a) un recipiente que contiene una mezcla liofilizada de una proteína y un lioprotector; y (b) instrucciones para reconstituir la mezcla liofilizada con un diluyente hasta una concentración de proteína en la formulación reconstituida de por lo menos aproximadamente 50 mg/ml. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que contiene un diluyente (por ejemplo, agua bacteriostática para inyección (BWFI) que comprende un alcohol aromático).

50 **[0016]** Se describe en el presente documento un método de tratamiento de un mamífero que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de una formulación reconstituida. Se describe en el presente documento para un mamífero, en el que el mamífero tiene un trastorno que requiere el tratamiento con la proteína de la formulación. Por ejemplo, la formulación se puede administrar subcutáneamente.

55 **[0017]** Se observó que una formulación preliofilizada de anticuerpo anti-HER2 útil descubierta en los experimentos

detallados a continuación comprendía anti-HER2 en una cantidad de aproximadamente 5-40 mg/ml (por ejemplo, 20-30 mg/ml) y sacarosa o trehalosa en una cantidad de aproximadamente 10-100 mM (por ejemplo, 40-80 mM), un tampón (por ejemplo, histidina, pH 6 o succinato, pH 5) y un tensoactivo (por ejemplo, un polisorbato). Se halló que la formulación liofilizada era estable a 40°C durante por lo menos 3 meses y era estable a 30°C durante por lo menos 6 meses. Esta formulación anti-HER2 se puede reconstituir con un diluyente para generar una formulación adecuada para administración intravenosa que comprende anti-HER2 en una cantidad de aproximadamente 10-30 mg/ml que es estable a 2-8°C durante por lo menos a aproximadamente 30 días. Cuando se desean concentraciones superiores del anticuerpo anti-HER2 (por ejemplo, cuando la administración subcutánea del anticuerpo es el modo de administración pretendido al paciente), la formulación liofilizada se puede reconstituir para producir una formulación reconstituida estable que tiene una concentración de proteínas de 50 mg/ml o más.

**[0018]** Una formulación preliofilizada de anticuerpo anti-IgE deseable descubierta en el presente documento tiene una anti-IgE en una cantidad de aproximadamente 5-40 mg/ml (por ejemplo, 20-30 mg/ml) y sacarosa o trehalosa en una cantidad de aproximadamente 60-300 mM (por ejemplo, 80-170 mM), un tampón (preferiblemente, histidina, pH 6) y un tensoactivo (tal como polisorbato). La formulación anti-IgE liofilizada es estable a 30°C durante por lo menos 1 año. Esta formulación se puede reconstituir para producir una formulación que comprende anti-IgE en una cantidad de aproximadamente 15-45 mg/ml (por ejemplo, 15-25 mg/ml) adecuada para la administración intravenosa que es estable a 2-8°C durante por lo menos 1 año. Alternativamente, cuando se desean concentraciones más elevadas de anti-IgE en la formulación, la formulación liofilizada se puede reconstituir a efectos de generar una formulación estable que tenga una concentración anti-IgE de  $\geq 50$  mg/ml.

### Breve descripción de los dibujos

#### **[0019]**

La figura 1 muestra el efecto del volumen de reconstitución en la estabilidad de rhuMAb HER2 liofilizado. La formulación liofilizada se preparó a partir de una formulación de preliofilización que comprende proteína 25 mg/ml, trehalosa 60 mM, succinato de sodio 5 mM, pH 5,0, y Tween 20™ al 0,01%. La torta liofilizada se incubó a 40°C y a continuación se reconstituyó con 4,0 (o) o 20,0 ml (●) de BWFI. La fracción de proteína intacta en la formulación reconstituida se midió mediante cromatografía de exclusión por tamaño para la proteína nativa y se definió como el área del pico de la proteína nativa en relación con el área de pico total que incluía agregados.

La figura 2 ilustra el efecto de la concentración de trehalosa en la estabilidad de rhuMAb HER2 liofilizado. La proteína se liofilizó a 25 mg/ml en succinato de sodio 5 mM, pH 5,0 (círculos) o histidina 5 mM, pH 6,0 (cuadrados) y concentraciones de trehalosa que variaban de 60 mM (proporción molar de 360) a 200 mM (proporción molar de 1200). La proteína liofilizada se incubó a 40°C durante 30 días (símbolos en negro) o 91 días (símbolos en blanco). La cantidad de proteína intacta se midió después de la reconstitución de la proteína liofilizada con 20 ml de BWFI.

La figura 3 demuestra el efecto de la concentración de trehalosa en la estabilidad a largo plazo de rhuMAb HER2 liofilizado a 40°C. La proteína se liofilizó a 25 mg/ml en succinato de sodio 5 mM, pH 5,0, Tween 20™ al 0,01%, y trehalosa 60 mM (■) o histidina 5 mM, pH 6,0, Tween 20™ al 0,01%, y trehalosa 60 mM (□) o 21 mg/ml en succinato de sodio 10 mM, pH 5,0, Tween 20™ al 0,2% y trehalosa 250 mM (●). La proteína liofilizada se incubó a 40°C y a continuación se reconstituyó con 20 ml de BWFI. La cantidad de proteína intacta se midió después de la reconstitución.

La figura 4 muestra la estabilidad de rhuMAb HER2 liofilizado en manitol 38,4 mM (7 mg/ml), sacarosa 20,4 mM (7 mg/ml), histidina 5 mM, pH 6,0, Tween 20™ al 0,01%. La proteína liofilizada se incubó a 40°C y a continuación se reconstituyó con 4,0 ml (o) o 20 ml (●) de BWFI. La cantidad de proteína intacta se midió después de la reconstitución.

La figura 5 demuestra la estabilidad de rhuMAb HER2 liofilizado reconstituido en succinato de sodio 5 mM, pH 5,0, trehalosa 60 mM, Tween 20™ al 0,01%. Las muestras se reconstituyeron con 4,0 ml (cuadrados) o 20,0 ml (círculos) de BWFI (20 ml:alcohol bencílico al 0,9%; 4 ml:alcohol bencílico al 1,1%) y a continuación se almacenaron a 5°C (símbolos en negro) o 25°C (símbolos en blanco). El % de proteína nativa se definió como el área de pico de la proteína nativa (no degradada) en relación con el área de pico total medida mediante cromatografía de intercambio catiónico.

La figura 6 muestra la estabilidad de rhuMAb HER2 liofilizado reconstituido en histidina 5 mM, pH 6,0, trehalosa 60 mM, Tween 20™ al 0,01%. Las muestras se reconstituyeron con 4,0 ml (cuadrados) o 20,0 ml (círculos) de BWFI (20 ml:alcohol bencílico al 0,9%; 4 ml:alcohol bencílico al 1,1%) y a continuación se almacenaron a 5°C (símbolos en negro) o 25°C (símbolos en blanco). El % de proteína nativa se definió como el área de pico de la proteína nativa (no degradada) en relación con el área de pico total medida mediante cromatografía de intercambio catiónico.

La figura 7 revela la estabilidad de rhuMAb HER2 liofilizado reconstituido en histidina 5 mM, pH 6,0, manitol 38,4 mM, sacarosa 20,4 mM, Tween 20™ al 0,01%. Las muestras se reconstituyeron con 4,0 ml (cuadrados) o 20,0 ml (círculos) de BWFI (20 ml:alcohol bencílico al 0,9%; 4 ml:alcohol bencílico al 1,1%) y a continuación se almacenaron a 5°C (símbolos en negro) o 25°C (símbolos en blanco). El % de proteína nativa se definió como el área de pico de

la proteína nativa (no degradada) en relación con el área de pico total medida mediante cromatografía de intercambio catiónico.

5 La figura 8 muestra la estabilidad de rhuMAb HER2 liofilizado reconstituido en succinato de sodio 10 mM, pH 5,0, trehalosa 250 mM, Tween 20™ al 0,2%. Las muestras se reconstituyeron con 20,0 ml de BWFI (alcohol bencílico al 0,9%) y a continuación se almacenaron a 5°C (●) o 25°C (○). El % de proteína nativa se definió como el área de pico de la proteína nativa (no degradada) en relación con el área de pico total medida mediante cromatografía de intercambio catiónico.

10 La figura 9 muestra la agregación de rhuMAb E25 formulado en tampones que varían de pH 5 a pH 7 a una concentración de tampón de 10 mM y una concentración de anticuerpo 5 mg/ml. Las muestras se liofilizaron y se analizaron a tiempo cero y después de 4 semanas, 8 semanas y 52 semanas de almacenamiento a 2-8°C. Los tampones fueron: fosfato de potasio pH 7,0 (○); fosfato de sodio pH 7,0 (□); histidina pH 7,0 (◇); succinato de sodio pH 6,5 (●); succinato de sodio pH 6,0 (■); succinato de sodio pH 5,5 (◆); y succinato de sodio pH 5,0 (▲).

15 La figura 10 representa la agregación de rhuMAb E25 liofilizado en tampón de histidina 5 mM a pH 6 y pH 7 y analizado después del almacenamiento siguiente. El tampón fue a: pH 6,0 almacenado a 2-8°C (○); pH 6 almacenado a 25°C (□); pH 6 almacenado a 40°C (◇); pH 7 almacenado a 2-8°C (●); pH 7 almacenado a 25°C (■); y pH 7 almacenado a 40°C (◆).

20 La figura 11 ilustra la agregación de rhuMAb E25 5 mg/ml formulado en succinato de sodio 10 mM a pH 5,0 con lioprotector añadido a una concentración de 275 mM (isotónica). Los lioprotectores fueron: control, sin lioprotector (○); manitol (□); lactosa (◇); maltosa (●); trehalosa (■); y sacarosa (◆). Las muestras se liofilizaron y analizaron a tiempo cero y después de 4 semanas, 8 semanas y 52 semanas de almacenamiento a 2-8°C.

25 La figura 12 muestra la agregación de rhuMAb E25 5 mg/ml formulado en succinato de sodio 10 mM a pH 5,0 con lioprotector añadido a una concentración de 275 mM (isotónica). Los lioprotectores fueron: control, sin lioprotector (○); manitol (□); lactosa (◇); maltosa (●); trehalosa (■); y sacarosa (◆). Las muestras se liofilizaron y analizaron a tiempo cero y después de 4 semanas, 8 semanas y 52 semanas de almacenamiento a 40°C.

30 La figura 13 representa la cromatografía de interacción hidrofóbica de rhuMAb E25 20 mg/ml liofilizado en tampón de histidina a pH 6 con una concentración isotónica (es decir, 275 mM) de lactosa almacenado durante 24 semanas a 2-8, 25 ó 40°C y reconstituido hasta 20 mg/ml.

35 La figura 14 muestra la cromatografía de interacción hidrofóbica de rhuMAb E25 20 mg/ml liofilizado en tampón de histidina a pH 6 almacenado durante 24 semanas a 2-8, 25 ó 40°C y reconstituido hasta 20 mg/ml.

40 La figura 15 ilustra la cromatografía de interacción hidrofóbica de rhuMAb E25 20 mg/ml liofilizado en tampón de histidina a pH 6 con una concentración isotónica (es decir, 275 mM) de sacarosa almacenado durante 24 semanas a 2-8, 25 ó 40°C y reconstituido hasta 20 mg/ml.

45 La figura 16 ilustra el efecto de la concentración de azúcar sobre el rhuMAb E25 formulado a 20 mg/ml en histidina 5 mM a pH 6,0. Se añadieron sacarosa (●) y trehalosa (□) a la formulación a proporciones molares que variaban de 0 a 2010 (isotónica) (véase la tabla 1 siguiente). Las muestras se liofilizaron y se analizaron después de 12 semanas de almacenamiento a 50°C.

TABLA 1

Moles de azúcar: Anticuerpo E25	Concentración de azúcar (mM)
0	0
260	34,4
380	51,6
510	68,8
760	103,1
1020	137,5
1530	206,3
2010	275

50 La figura 17 revela la agregación de rhuMAb E25 formulado a 25 mg/ml en histidina 5 mM a pH 6 con sacarosa 85 mM (○); trehalosa 85 mM (□); sacarosa 161 mM (◆) o trehalosa 161 mM (▲). Las muestras se liofilizaron y almacenaron a 2-8°C, seguido de reconstitución con alcohol bencílico al 0,9% hasta 100 mg/ml de anticuerpo en histidina 20 mM a pH 6 con concentración de azúcar isotónica (340 mM) e hipertónica (644 mM).

55 La figura 18 muestra la agregación de rhuMAb E25 formulado a 25 mg/ml en histidina 5 mM a pH 6 con sacarosa 85 mM (○); trehalosa 85 mM (□); sacarosa 161 mM (◆) o trehalosa 161 mM (▲). Las muestras se liofilizaron y

almacenaron a 30°C, seguido de reconstitución con alcohol bencílico al 0,9% hasta 100 mg/ml de anticuerpo en histidina 20 mM a pH 6 con concentración de azúcar isotónica (340 mM) e hipertónica (644 mM).

La figura 19 ilustra la agregación de rhuMAb E25 formulado a 25 mg/ml en histidina 5 mM a pH 6 con sacarosa 85 mM (O); trehalosa 85 mM (□); sacarosa 161 mM (♦) o trehalosa 161 mM (▲). Las muestras se liofilizaron y almacenaron a 50°C, seguido de reconstitución con alcohol bencílico al 0,9% hasta 100 mg/ml de anticuerpo en histidina 20 mM a pH 6 con concentración de azúcar isotónica (340 mM) e hipertónica (644 mM).

## Descripción detallada de las realizaciones preferidas

### I. Definiciones

[0020] Por “proteína” se entiende una secuencia de aminoácidos para la que la longitud de cadena es suficiente para producir los niveles más elevados de estructura terciaria/cuaternaria. Esto es para distinguirse de los “péptidos” u otros fármacos de peso molecular pequeño que no presentan dicha estructura. Habitualmente, la proteína del presente documento tendrá un peso molecular de por lo menos aproximadamente 15-20 kD, preferiblemente por lo menos aproximadamente 20 kD.

[0021] Los ejemplos de proteínas abarcadas dentro de la definición en el presente documento incluyen proteínas de mamíferos, tales como, por ejemplo, hormona del crecimiento, incluyendo la hormona de crecimiento humana y la hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona de crecimiento; hormona paratiroidea; hormona estimuladora del tiroides; lipoproteínas;  $\alpha$ -1-antitripsina; cadena A de la insulina; cadena B de insulina; proinsulina; hormona estimuladora del foliculo; calcitonina; hormona luteinizante; glucagón; factores de coagulación, tales como el factor VIIIc, factor IX, factor tisular, y factor de von Willebrands; factores anticoagulantes, tales como Proteína C; factor natriurético atrial; tensoactivo pulmonar, un activador del plasminógeno, tal como uroquinasa o activador del plasminógeno de tipo tisular (t-PA); bombazina; trombina, factor  $\alpha$  y  $\beta$  de necrosis tumoral; encefalinasa; RANTES (célula T expresada y segregada normalmente regulada en la activación); proteína inflamatoria de macrófagos humanos (MIP-1- $\alpha$ ); albúmina de suero, tal como albúmina de suero humano; sustancia inhibidora mulleriana; cadena A de la relaxina; cadena B de la relaxina; prorelaxina; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; ADNasa; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); receptores de hormonas o factores de crecimiento; una integrina; proteína A o D; factores reumatoides; un factor neurotrófico, tal como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), neurotrofina 3, 4, 5, ó 6 (NT-3, NT-4, NT-5, o NT-6), o un factor de crecimiento nervioso, tal como NGF- $\beta$ ; factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF); factor de crecimiento de los fibroblastos, tal como aFGF y bFGF; factor de crecimiento epidérmico (EGF); factor de crecimiento transformante (TGF), tal como TGF- $\alpha$  y TGF- $\beta$ , incluyendo TGF- $\beta$ 1, TGF- $\beta$ 2, TGF- $\beta$ 3, TGF- $\beta$ 4, o TGF- $\beta$ 5; factor I y II de crecimiento tipo insulina (IGF-I e IGF-II); des(1-3)-IGF-1(IGF-I de cerebro); proteínas de unión al factor de crecimiento tipo insulina; proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19 y CD20; eritropoyetina (EPO); trombopoyetina (TPO); factores osteoinductivos; inmunotoxinas; una proteína morfogenética ósea (BMP); un interferón, tal como interferón  $\alpha$ ,  $\beta$ , y  $\gamma$ ; factores estimuladores de colonias (CSF), por ejemplo, M-CSF, GM-CSF, y G-CSF; interleucinas (IL), por ejemplo, IL-1 a IL-10; superóxido dismutasa; receptores de células T; proteínas de membrana de la superficie; factor acelerador de la descomposición (DAF); un antígeno vírico tal como, por ejemplo, una parte de la envoltura del virus del SIDA; proteínas de transporte; receptores localizadores; adresinas; proteínas reguladoras; inmunoadhesinas; anticuerpos; y fragmentos o variantes biológicamente activas de cualquiera de los polipéptidos anteriormente mencionados.

[0022] La proteína que se formula es preferiblemente esencialmente pura y de manera deseable esencialmente homogénea (es decir, libre de proteínas contaminantes, etc.). Proteína “esencialmente pura” significa una composición que comprende por lo menos aproximadamente el 90% en peso de la proteína, en base al peso total de la composición, preferiblemente por lo menos aproximadamente el 95% en peso. Proteína “esencialmente homogénea” significa una composición que comprende por lo menos aproximadamente el 99% en peso de proteína, en base al peso total de la composición.

[0023] La proteína puede ser un anticuerpo. El anticuerpo se puede unir a cualquiera de las moléculas mencionadas anteriormente, por ejemplo. Las dianas moleculares de ejemplo para los anticuerpos incluyen proteínas CD, tales como CD3, CD4, CD8, CD19, CD20 y CD34; miembros de la familia de receptores HER, tales como el receptor EGF, receptor HER2, HER3 o HER4; moléculas de adhesión celular, tales como LFA-1, Mol, p150,95, VLA-4, ICAM-1, VCAM e integrina  $\alpha$ v/ $\beta$ 3 que incluyen subunidades  $\alpha$  o  $\beta$  de la misma (por ejemplo, anticuerpos anti-CD11a, anti-CD18 o anti-CD11b); factores de crecimiento, tales como VEGF; IgE; antígenos de grupo sanguíneo; receptor flk2/flt3; receptor de obesidad (OB); proteína C etc.

[0024] El término “anticuerpo” se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos de longitud completa que tienen una región Fc de inmunoglobulina), composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica, anticuerpos biespecíficos y moléculas de cadena sencilla, así como fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, F(ab)<sub>2</sub>, y Fv).

[0025] El término “anticuerpo monoclonal”, tal como se utiliza aquí, se refiere a un anticuerpo obtenido de una

población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en pequeñas cantidades. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, estando dirigidos contra un único sitio antigénico. Además, a diferencia de preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales) que habitualmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes diferentes (epítomos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un único determinante en el antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales son ventajosos en que se sintetizan mediante el cultivo de hibridoma, no contaminado por otras inmunoglobulinas. El modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo al obtenerse de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no debe interpretarse que se requiere la producción del anticuerpo por algún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar según la presente invención se pueden producir mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature*, 256: 495 (1975), o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (véase, por ejemplo, patente de Estados Unidos No. 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" también se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos de fagos utilizando las técnicas descritas en Clackson et al., *Nature*, 352:624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991), por ejemplo.

**[0026]** Los anticuerpos monoclonales en el presente documento incluyen específicamente anticuerpos (inmunoglobulinas) "quiméricos" en que una parte de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las correspondientes secuencias en anticuerpos derivados de una especie particular o que pertenecen a un tipo o subtipo de anticuerpo particular, mientras que el resto de la cadena o cadenas son idénticas u homólogas a las correspondientes secuencias en los anticuerpos derivados de otras especies o que pertenecen a otro tipo o subtipo de anticuerpo, así como los fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que presenten la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos N° 4.816.567; Morrison et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81: 6851-6855 (1984)).

**[0027]** Las formas "humanizadas" de anticuerpos no humanos (por ejemplo, murinos) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulinas o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> u otras secuencias de unión a antígeno de anticuerpos) que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región determinante de complementariedad (CDR) del receptor se sustituyen por residuos de una CDR de una especie no humana (anticuerpo dador), tal como ratón, rata, conejo o conejo, que tiene la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región armazón ("framework") (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR o secuencias armazón importadas. Estas modificaciones se realizan para refinar adicionalmente y optimizar la acción del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de por lo menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en que todas o sustancialmente todas las regiones de CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado también comprenderá de manera óptima por lo menos una parte de una región constante (Fc) de inmunoglobulina, habitualmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986), Reichmann et al., *Nature* 332: 323-329 (1988); y Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2: 593-596 (1992). El anticuerpo humanizado incluye un anticuerpo Primatized™ en el que la región de unión a antígeno del anticuerpo deriva de un anticuerpo producido mediante la inmunización de monos macacos con el antígeno de interés.

**[0028]** Una formulación "estable" es aquella en la que la proteína en la misma retiene esencialmente su estabilidad física y química e integridad tras almacenamiento. Están disponibles en la técnica algunas técnicas analíticas para medir la estabilidad de la proteína y se revisan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Nueva York, Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993). Se puede medir la estabilidad a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. Para un cribado rápido, se puede mantener la formulación a 40° C durante 2 semanas hasta 1 mes, en cuyo momento se mide la estabilidad. Cuando la formulación es para almacenarse a 2-8° C, generalmente, la formulación debería ser estable a 30°C o 40°C durante por lo menos 1 mes y/o estable a 2-8° C durante por lo menos 2 años. Cuando la formulación es para almacenarse a 30°C, generalmente la formulación debería ser estable durante por lo menos 2 años a 30°C y/o estable a 40°C durante por lo menos 6 meses. Por ejemplo, se puede usar el grado de agregación después de la liofilización y el almacenamiento como un indicador de la estabilidad de la proteína (véanse los ejemplos en el presente documento). Por ejemplo, una formulación "estable" puede ser aquella en la que menos de aproximadamente un 10 % y preferiblemente menos de aproximadamente un 5 % de la proteína está presente como un agregado en la formulación. En otras realizaciones, se puede determinar cualquier incremento en la formación de un agregado después de la liofilización y el almacenamiento de la formulación liofilizada. Por ejemplo, una formulación liofilizada "estable" puede ser aquella en la que el incremento en los agregados en la formulación liofilizada es menor de aproximadamente un 5 % y preferiblemente menor de aproximadamente un 3 %, cuando la formulación liofilizada se almacena a 2-8°C durante por lo menos un año. En otras realizaciones, la estabilidad de la formulación de proteína se puede medir utilizando un ensayo de actividad biológica (véase, por ejemplo, el ejemplo 2 a continuación).

**[0029]** Una formulación "reconstituída" es aquella que se ha preparado disolviendo una formulación de proteína

liofilizada en un diluyente de manera que la proteína se dispersa en la formulación reconstituida. La formulación reconstituida es adecuada para la administración (por ejemplo, administración parenteral) a un paciente que se va a tratar con la proteína de interés y puede ser aquella que sea adecuada para la administración subcutánea.

5 [0030] Por "isotónica" se entiende que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas tendrán generalmente una presión osmótica entre aproximadamente 250 y 350 mOsm. La isotonicidad se puede medir usando, por ejemplo, un osmómetro de presión de vapor o de tipo criocongelación.

10 [0031] Un "lioprotector" es una molécula que, cuando se combina con una proteína de interés, evita o reduce significativamente la inestabilidad química y/o física de la proteína tras la liofilización y el posterior almacenamiento. Los lioprotectores a modo de ejemplo incluyen azúcares, tales como sacarosa o trehalosa; un aminoácido, tal como glutamato monosódico o histidina; una metilamina, tal como betaína; una sal liotrópica, tal como sulfato de magnesio; un poliol, tal como alcoholes de azúcar trihidricos o superiores, por ejemplo, glicerina, eritritol, glicerol, arabitol, xilitol, sorbitol, y manitol; propilenglicol; polietilenglicol; Pluronic; y combinaciones de los mismos. El lioprotector preferido es un azúcar no reductor, tal como trehalosa o sacarosa.

15 [0032] El lioprotector se añade a la formulación preliofilizada en una "cantidad lioprotectora" lo que significa que, tras la liofilización de la proteína en presencia de la cantidad lioprotectora de lioprotector, la proteína retiene esencialmente su estabilidad física y química e integridad tras la liofilización y el almacenamiento.

20 [0033] El diluyente de interés en el presente documento es el que es farmacéuticamente aceptable (seguro y no tóxico para la administración a un ser humano) y es útil para la preparación de una formulación reconstituida. Los diluyentes a modo de ejemplo incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución de pH tamponado (por ejemplo, solución salina tamponada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. En una realización alternativa, los diluyentes pueden incluir, disoluciones acuosas de sales y/o tampones.

25 [0034] Un "conservante" es un compuesto que se puede añadir al diluyente para reducir la actividad bacteriana en la formulación reconstituida, facilitando así, por ejemplo, la producción de una formulación reconstituida multiuso. Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetildibencil amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de benzalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en los que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquil parabenos tales como metil o propil parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y *m*-cresol. El conservante más preferido en el presente documento es el alcohol bencílico.

30 [0035] Un "agente de relleno" es un compuesto que añade masa a la mezcla liofilizada y contribuye a la estructura física de la torta liofilizada (por ejemplo, facilita la producción de una torta liofilizada esencialmente uniforme que mantiene una estructura de poro abierto). Ejemplos de agentes de relleno incluyen manitol, glicina, polietilenglicol y sorbitol.

35 [0036] "Tratamiento" se refiere a tratamiento terapéutico y medidas profilácticas o preventivas. Aquellos con necesidad de tratamiento incluyen los que ya padecen el trastorno así como aquellos en los que se debe evitar el trastorno.

40 [0037] "Mamífero" para los objetivos del tratamiento se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo los seres humanos, animales domésticos y de granja, y de zoológico, deportes, o mascotas, tales como perros, caballos, gatos, vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un ser humano.

45 [0038] Un "trastorno" es cualquier dolencia que se beneficiaría del tratamiento con la proteína. Este incluye los trastornos o enfermedades crónicas y agudas que incluyen las dolencias patológicas que predisponen al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de trastornos que se van a tratar en el presente documento incluyen carcinomas y alergias.

## 50 II. Modos para llevar a cabo la invención

### A. Preparación de proteínas

55 [0039] La proteína a formular se prepara utilizando técnicas que están bien establecidas en la técnica, incluyendo técnicas sintéticas (tales como técnicas recombinantes y síntesis de péptidos o una combinación de estas técnicas) o se puede aislar de una fuente endógena de la proteína. La proteína de elección es un anticuerpo. Las técnicas para la producción de anticuerpos se indican a continuación.

(i) *Anticuerpo policlonales.*

60 [0040] Los anticuerpos policlonales se desarrollan generalmente en animales mediante inyecciones múltiples



subcutáneas (sc) o intraperitoneales (ip) del antígeno pertinente y un adyuvante. Puede ser útil conjugar el antígeno pertinente a una proteína que es inmunogénica en las especies a inmunizar, por ejemplo, la hemocianina de la lapa californiana, albúmina de suero, tiroglobulina bovina o inhibidor de tripsina de soja utilizando un agente bifuncional o derivatizante, por ejemplo, éster de maleimidobenzoil sulfosuccinimida (conjugación a través de residuos de cisteína), N-hidroxisuccinimida (a través de residuos de lisina), glutaraldehído, anhídrido succínico,  $\text{SOCl}_2$ , o  $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ , donde R y  $\text{R}^1$  son grupos alquilo diferentes.

**[0041]** Los animales se inmunizan contra el antígeno, conjugados inmunogénicos o derivados mediante la combinación de 1 mg o 1  $\mu\text{g}$  del péptido o conjugado (para conejos o ratones, respectivamente) con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund. Un mes más tarde, los animales se refuerzan con 1/5 a 1/10 de la cantidad original de péptido o conjugado en adyuvante completo de Freund mediante inyección subcutánea en múltiples sitios. De siete a catorce días más tarde los animales sangran y el suero se analiza para el título de anticuerpo. Los animales se refuerzan hasta que el título se estabiliza. Preferiblemente, el animal se refuerza con el conjugado del mismo antígeno, pero conjugado a una proteína diferente y/o a través de un reactivo de reticulación diferente. Los conjugados también se pueden producir en cultivos de células recombinantes como fusiones de proteínas. Además, los agentes de agregación, tales como el alumbre, se utilizan de forma adecuada para potenciar la respuesta inmune.

(ii) *Anticuerpos monoclonales*

**[0042]** Los anticuerpos monoclonales se obtienen de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos a excepción de posibles mutaciones naturales que pueden estar presentes en cantidades menores. De este modo, el modificador "monoclonal" indica que el carácter del anticuerpo no es una mezcla de anticuerpos discretos.

**[0043]** Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales se pueden producir utilizando el método del hibridoma descrito por primera vez por Kohler et al., *Nature* 256:495 (1975) o se pueden producir mediante métodos de ADN recombinante (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567).

**[0044]** En el método del hibridoma, un ratón u otro animal huésped apropiado, tal como un hámster, se inmuniza como se ha descrito anteriormente para conseguir linfocitos que producen o son capaces de producir anticuerpos que se unirán específicamente a la proteína utilizada para la inmunización. Alternativamente, los linfocitos se pueden inmunizar *in vitro*. A continuación, los linfocitos se fusionan con células de mieloma utilizando un agente de fusión adecuado, tal como polietilenglicol, para formar una célula de hibridoma (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press. 1986)).

**[0045]** Las células de hibridoma preparadas de esta manera se siembran y se desarrollan en un medio de cultivo adecuado que contiene preferiblemente una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Por ejemplo, si las células de mieloma parentales carecen de la enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa (HGPRT o HPRT), el medio de cultivo para los hibridomas incluirán habitualmente hipoxantina, aminopterina y timidina (medio HAT), cuyas sustancias evitan el crecimiento de células deficientes en HGPRT.

**[0046]** Las células de mieloma preferidas son aquellas que se fusionan de manera eficaz, contribuyen a una producción estable a un nivel elevado de anticuerpo por las células productoras de anticuerpos seleccionadas, y son sensibles a un medio, tal como medio HAT. Entre éstas, las líneas de células de mieloma preferidas son líneas de mieloma murinas, tales como las derivadas de tumores de ratón MOPC-21 y MPC-11 disponibles en el Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California Estados Unidos, y las células SP-2 disponibles en la American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, Estados Unidos. También se han descrito líneas de células de mieloma humano y de heteromieloma de ratón-humano para la producción de anticuerpos monoclonales humanos (Kozbor, *J. Immunol.* 133: 3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, páginas 51-63 (Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1987)).

**[0047]** Se analiza el medio de cultivo en el que las células de hibridoma están en crecimiento para la producción de anticuerpos monoclonales dirigidos contra el antígeno. Preferiblemente, la especificidad de unión de anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante la inmunoprecipitación o mediante un ensayo de unión *in vitro*, tal como radioinmunoensayo (RIA) o ensayo inmunoabsorbente unido a enzima (ELISA).

**[0048]** La afinidad de unión del anticuerpo monoclonal se pueden determinar, por ejemplo, mediante análisis Scatchard de Muuson et al., *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980).

**[0049]** Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y se pueden desarrollar mediante métodos estándar (Coding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, páginas 59-103 (Academia Press, 1986)). Entre los medios de cultivo adecuados para este objetivo se incluyen, por ejemplo, medio D-MEM o medio RPM1-1640. Además, las células de hibridoma se pueden desarrollar *in vivo* como tumores

ascíticos en un animal.

**[0050]** Los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se separan de forma adecuada del medio de cultivo, fluido ascítico, o suero mediante procedimientos de purificación de inmunoglobulinas convencionales, tales como, por ejemplo, proteína A-Sefarosa, cromatografía de hidroxilapatita, electroforesis en gel, diálisis o cromatografía de afinidad.

**[0051]** El ADN que codifica los anticuerpos monoclonales se aísla fácilmente y se secuencia utilizando procedimientos convencionales (por ejemplo, utilizando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesada y ligera de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Una vez aislado, el ADN se puede colocar en vectores de expresión, que a continuación se transfectan en células huésped, tales como células *E. coli*, células COS de simios, células de ovario de hámster chino (CHO), o células de mieloma que de ningún otro modo producen proteína inmunoglobulina, para obtener la síntesis de anticuerpos monoclonales en las células huésped recombinantes. Entre los artículos de revisión sobre la expresión recombinante en bacterias de ADN que codifican el anticuerpo se incluyen Skerra et al., *Curr. Opinión in Immunol.*, 5:256-262 (1993) y Plückthun, *Immunol Revs.*, 130:151-188 (1992).

**[0052]** Los anticuerpos se pueden aislar de bibliotecas de anticuerpos en fagos generados utilizando las técnicas descritas en McCafferty et al., *Nature*, 348: 552-554 (1990). Clackson et al., *Nature*, 352: 624-628 (1991) y Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222: 581-597 (1991) describen el aislamiento de anticuerpos murinos y humanos, respectivamente, utilizando bibliotecas de fagos. Las posteriores publicaciones describen la producción de anticuerpos humanos de afinidad elevada (rango de nM) mediante intercambio de cadenas (Marks et al., *Biol. Technology*, 10:779-783 (1992)), así como la infección combinatoria y la recombinación *in vivo* como estrategia para construir bibliotecas de fagos muy grandes (Waterhouse et al., *Nuc. Acids. Res.*, 21: 2265-2266 (1993)). De este modo, estas técnicas son alternativas viables a las técnicas convencionales de hibridomas de anticuerpos monoclonales para el aislamiento de anticuerpos monoclonales.

**[0053]** El ADN también se puede modificar, por ejemplo, mediante la sustitución de la secuencia codificante para los dominios constantes de cadena pesada y cadena ligera humanos en lugar de las secuencias murinas homólogas (patente de Estados Unidos No. 4.816.567; Morrison, et al., *Proc. Natl Acad Sci. USA*, 81:6851 (1984)), o mediante unión covalente a la secuencia codificante de inmunoglobulina de toda o parte de la secuencia codificante para un polipéptido que no es inmunoglobulina.

**[0054]** Habitualmente, dichos polipéptidos que no son inmunoglobulinas se sustituyen por los dominios constantes de un anticuerpo o se sustituyen por los dominios variables de un sitio de combinación a antígeno de un anticuerpo para crear un anticuerpo divalente quimérico que comprende un sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno y otro sitio de combinación a antígeno que tiene especificidad por un antígeno diferente.

**[0055]** Los anticuerpos quiméricos o híbridos también se pueden preparar *in vitro* utilizando métodos conocidos en la química sintética de proteínas, incluyendo los que implican agentes reticulantes. Por ejemplo, se pueden construir inmunotoxinas utilizando una reacción de intercambio de disulfuro o mediante la formación de un enlace tioéter. Ejemplos de reactivos adecuados para este objetivo incluyen iminotiolato y metil-4-mercaptopbutirimidato.

(iii) *Anticuerpos humanizados y humanos.*

**[0056]** Los métodos para humanizar anticuerpos no humanos son conocidos en la técnica. Generalmente, un anticuerpo humanizado tiene uno o más residuos de aminoácidos introducidos en el mismo a partir de una fuente que es no humana. Estos residuos de aminoácidos no humanos se denominan frecuentemente como residuos "importados", que habitualmente se sacan de un dominio variable "importado". La humanización se puede realizar esencialmente siguiendo el método de Winter y colaboradores (Jones et al., *Nature*, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988)), mediante la sustitución de secuencias de CDR de roedor por las secuencias correspondientes de un anticuerpo humano. Por consiguiente, dichos anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos (Patente de Estados Unidos No. 4.816.567) en los que sustancialmente menos de un dominio variable humano intacto se ha sustituido por la secuencia correspondiente de una especie no humana. En la práctica, los anticuerpos humanizados son habitualmente anticuerpos humanos en los que algunos residuos de CDR y posiblemente algunos residuos de FR se sustituyen por residuos de sitios análogos en anticuerpos de roedores.

**[0057]** La elección de dominios variables humanos, tanto de cadena ligera como pesada, para utilizar en la fabricación de los anticuerpos humanizados es muy importante para reducir la antigenicidad. Según el método denominado "mejor-ajuste", la secuencia del dominio variable de un anticuerpo de roedor se criba frente a toda la biblioteca de secuencias de dominios variables humanos conocidos. A continuación, la secuencia humana que está más próxima a la del roedor se acepta como la región armazón (FR) humana para el anticuerpo humanizado (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J. Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Otro método utiliza una región armazón particular derivado de la secuencia de consenso de todos los anticuerpos humanos de un subgrupo

particular de cadenas ligeras o pesadas. El mismo armazón se puede utilizar para varios anticuerpos humanizados diferentes (Carter et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J. Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

[0058] Es también importante que los anticuerpos se humanicen manteniendo una afinidad elevada por el antígeno y otras propiedades biológicas favorables. Para conseguir este objetivo, según un método preferido, los anticuerpos humanizados se preparan mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptuales humanizados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias parentales y humanizadas. Los modelos tridimensionales de inmunoglobulinas están disponibles normalmente y son familiares para los expertos en la materia. Existen programas informáticos disponibles que muestran y visualizan probables estructuras conformaciones tridimensionales de secuencias de inmunoglobulinas candidatas seleccionadas. La observación de estas visualizaciones permite el análisis de la probable función de los residuos en el funcionamiento de la secuencia de inmunoglobulina candidata, es decir, el análisis de residuos que influyen en la capacidad de la inmunoglobulina candidata para unirse a su antígeno. De esta manera, los residuos de FR se pueden seleccionar y combinar de las secuencias del receptor e importación, de manera que se consigue la característica del anticuerpo deseado, tal como una mayor afinidad por el antígeno o antígenos diana. En general, los residuos de CDR están directamente y más sustancialmente implicados en la influencia sobre la unión al antígeno.

[0059] Como alternativa, ahora es posible producir animales transgénicos (por ejemplo ratones) que son capaces, tras inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de inmunoglobulina endógena. Por ejemplo, se ha descrito que la eliminación homocigótica del gen la región de unión ( $J_H$ ) de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y en la línea germinal da lugar a la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia del grupo de genes de inmunoglobulina de línea germinal humana en estos ratones mutantes en la línea germinal dará lugar a la producción de anticuerpos humanos tras la estimulación con antígenos. Ver, por ejemplo Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7:33 (1993). Los anticuerpos humanos también pueden derivar de bibliotecas de expresión en fagos (Hoogenboom et al., *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222:581-597 (1991)).

(iv) *Anticuerpos biespecíficos*

[0060] Los anticuerpos biespecíficos (BsAbs) son anticuerpos que presentan especificidades de unión para por lo menos dos epítopos diferentes. Dichos anticuerpos pueden derivarse de anticuerpos de longitud completa o fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos  $F(ab')_2$ ).

[0061] Los procedimientos para realizar anticuerpos biespecíficos son conocidos en la técnica. La producción habitual de anticuerpos biespecíficos de longitud completa se basa en la coexpresión de dos pares de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina, donde las dos cadenas tienen diferentes especificidades (Milstein et al., *Nature*, 305:537-539 (1983)). Debido a la variedad aleatoria de cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina, estos hibridomas (cuadromas) producen una mezcla potencial de 10 moléculas de anticuerpos diferentes, de las cuales sólo una tiene la estructura biespecífica correcta. La purificación de la molécula correcta, que se realiza habitualmente mediante etapas de cromatografía de afinidad, es bastante incómoda y los rendimientos de producto son bajos. En WO 93/08829 y en Truanecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659 (1991) se describen procesos similares.

[0062] Según una estrategia diferente, los dominios variables de anticuerpo con las especificidades de unión deseadas (sitios de combinación anticuerpo-antígeno) se fusionan a secuencias del dominio constante de inmunoglobulina. La fusión se produce preferiblemente con un dominio constante de cadena pesada de la inmunoglobulina, que comprende por lo menos parte de las regiones bisagra, CH2 y CH3. Se prefiere que la primera región constante de cadena pesada (CH1) contenga el sitio necesario para la unión a cadena ligera, presente en por lo menos una de las fusiones. Los ADNs que codifican las fusiones de la cadena pesada de inmunoglobulina y, si se desea, la cadena ligera de inmunoglobulina, se insertan en vectores de expresión separados y se cotransfectan en un organismo huésped adecuado. Esto proporciona una gran flexibilidad en el ajuste de las proporciones mutuas de los tres fragmentos de polipéptido en realizaciones en las que las proporciones desiguales de las tres cadenas de polipéptido utilizadas en la construcción proporcionan los rendimientos óptimos. Sin embargo, es posible insertar las secuencias codificantes de dos o las tres cadenas de polipéptido en un vector de expresión cuando la expresión de por lo menos dos cadenas de polipéptido en proporciones iguales da lugar a rendimientos elevados o cuando las proporciones no tienen particular importancia.

[0063] En un ejemplo preferido de esta estrategia, los anticuerpos biespecíficos están compuestos de una cadena pesada de inmunoglobulina híbrida con una primera especificidad de unión en un brazo, y una pareja de cadena pesada-cadena ligera de inmunoglobulina híbrida (que proporciona una segunda especificidad de unión) en el otro brazo. Se observó que esta estructura asimétrica facilita la separación del compuesto biespecífico deseado a partir de combinaciones de cadenas de inmunoglobulinas no deseadas, ya que la presencia de una cadena ligera de inmunoglobulina en sólo una mitad de la molécula biespecífica proporciona un modo sencillo de separación. Esta estrategia se describe en WO 94/04690, publicada el 3 de marzo de 1994. Para más detalles sobre la generación de anticuerpos biespecíficos véase, por ejemplo, Suresh et al., *Methods in Enzymology* 121:210 (1986).

[0064] Los anticuerpos biespecíficos incluyen anticuerpos reticulados o “heteroconjugados”. Por ejemplo, uno de los anticuerpos en el heteroconjugado se puede acoplar a avidina, el otro a biotina. Dichos anticuerpos se han propuesto, por ejemplo, para dirigir células del sistema inmunitario a células no deseadas (patente de Estados Unidos No. 4,676,980), y para el tratamiento de la infección por VIH (WO 91/00360, WO 92/200373). Los anticuerpos heteroconjugados se pueden fabricar utilizando cualquier método de reticulación conveniente. Los agentes de reticulación adecuados son conocidos en la técnica y se describen en la patente de Estados Unidos No. 4.676.980, junto con un conjunto de técnicas de reticulación.

[0065] Las técnicas para generar anticuerpos biespecíficos a partir de fragmentos de anticuerpos también se han descrito en la literatura. Las siguientes técnicas también se pueden utilizar para la producción de fragmentos de anticuerpos bivalentes que no son necesariamente específicos. Por ejemplo, los fragmentos Fab' recuperados de *E. coli* se pueden acoplar químicamente *in vitro* para formar anticuerpos bivalentes. Véase, Shalaby et al., *J. Exp. Med.*, 175:217-225 (1992).

[0066] Se han descrito también varias técnicas para fabricar y aislar fragmentos de anticuerpos bivalentes directamente a partir de cultivos de células recombinantes. Por ejemplo, se han producido heterodímeros bivalentes utilizando cremalleras de leucina. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Los péptidos de cremallera de leucina de las proteínas Fos y Jun se unieron a las partes de Fab' de dos anticuerpos diferentes mediante fusión génica. Los homodímeros del anticuerpo se redujeron en la región bisagra para formar monómeros y, a continuación, se reoxidaron para formar los heterodímeros de anticuerpo. La tecnología de “diacuerpo” descrita por Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ha proporcionado un mecanismo alternativo para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos/bivalentes. Los fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada ( $V_H$ ) conectado a un dominio variable de cadena ligera ( $V_L$ ) mediante un enlazador que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios en la misma cadena. Por consiguiente, los dominios  $V_H$  y  $V_L$  de un fragmento se fuerzan a emparejarse con los dominios  $V_L$  y  $V_H$  complementarios de otro fragmento, formando así dos sitios de unión a antígeno. También se ha descrito otra estrategia para fabricar fragmentos de anticuerpos biespecíficos/bivalentes mediante la utilización de dímeros de Fv de cadena única (sFv). Véase Gruber et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

## B. Preparación de la formulación liofilizada

[0067] Después de la preparación de la proteína de interés tal como se ha descrito anteriormente, se produce una “formulación preliofilizada”. La cantidad de proteína presente en la formulación preliofilizada se determina teniendo en cuenta los volúmenes deseados de dosis, la vía o vías de administración, etc. Cuando la proteína de elección es un anticuerpo intacto (tal como un anticuerpo anti-IgE o anti-HER2), de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml, preferiblemente de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 40 mg/ml y lo más preferiblemente de aproximadamente 20-30 mg/ml es una concentración de partida de ejemplo de la proteína. La proteína está generalmente presente en solución. Por ejemplo, la proteína puede estar presente en una solución tamponada de pH a un pH de aproximadamente 4-8, y preferiblemente de aproximadamente 5-7. Los tampones de ejemplo incluyen histidina, fosfato, Tris, citrato, succinato y otros ácidos orgánicos. La concentración de tampón puede ser de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 20 mM, o de aproximadamente 3 mM a aproximadamente 15 mM, dependiendo, por ejemplo, del tampón y la isotonicidad deseada de la formulación (por ejemplo, de la formulación reconstituida). El tampón preferido es histidina porque, tal como se demuestra a continuación, puede tener propiedades lioprotectoras. Se observó que el succinato era otro tampón útil.

[0068] El lioprotector se añade a la formulación preliofilizada. En realizaciones preferentes, el lioprotector es un azúcar no reductor, tal como sacarosa o trehalosa. La cantidad de lioprotector en la formulación preliofilizada es generalmente tal que, tras la reconstitución, la formulación resultante será isotónica. Sin embargo, también pueden ser adecuadas formulaciones reconstituidas hipertónicas. Además, la cantidad de lioprotector no debe ser demasiado baja, de manera que tenga lugar una cantidad inaceptable de degradación/agregación de la proteína tras la liofilización. Cuando el lioprotector es un azúcar (tal como sacarosa o trehalosa) y la proteína es un anticuerpo, las concentraciones de ejemplo del lioprotector en la formulación preliofilizada son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM, y preferiblemente de aproximadamente 30 mM a aproximadamente 300 mM, y lo más preferiblemente de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 100 mM.

[0069] La relación de proteína a lioprotector se selecciona para cada combinación de proteína y lioprotector. En el caso de un anticuerpo como proteína de elección y un azúcar (por ejemplo, sacarosa o trehalosa) como lioprotector para generar una formulación reconstituida isotónica con una elevada concentración de proteína, la relación molar de lioprotector a anticuerpo es de 200 a 600 moles de lioprotector por 1 mol de anticuerpo.

[0070] Se ha observado que es deseable añadir un tensoactivo a la formulación preliofilizada. Alternativa, o adicionalmente, se puede añadir el tensoactivo a la formulación liofilizada y/o a la formulación reconstituida. Los tensoactivos a modo de ejemplo incluyen tensoactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo polisorbatos 20 u 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Triton; dodecilsulfato sódico (SDS); laurilsulfato sódico; octil glicósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil-, o estearil-sulfobetaína; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil-, o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocoamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil-, o

isosteamidopropil-betaína (por ejemplo, lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil-, o isosteamidopropil-dimetilamina; metil cocoilaurato de sodio o metil oleilaurato de sodio; y la serie de MONAQUA™ (Mona Industries, Inc., Paterson, Nueva Jersey), polietilglicol, polipropilglicol, y los copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, Pluronic, PF68, etc.). La cantidad de tensoactivo añadido es tal que reduce la agregación de la proteína reconstituida y minimiza la formación de partículas tras la reconstitución. Por ejemplo, el tensoactivo puede estar presente en la formulación preliofilizada en una cantidad de entre aproximadamente 0,001 y 0,5 %, y preferiblemente entre aproximadamente 0,005 y 0,05 %.

[0071] En ciertas realizaciones de la invención, se utiliza una mezcla del lioprotector (tal como, sacarosa o trehalosa) y un agente de relleno (por ejemplo, manitol o glicina) en la preparación de la formulación de preliofilización. El agente de relleno puede facilitar la producción de una torta liofilizada uniforme sin excesivas bolsas en la misma, etc.

[0072] Se pueden incluir otros vehículos, excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, tales como los descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980) en la formulación preliofilizada (y/o la formulación liofilizada y/o la formulación reconstituida), con la condición de que no afecten de manera adversa las características deseadas de la formulación. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosificaciones y concentraciones empleadas e incluyen; agentes tamponantes adicionales; conservantes; codisolventes; antioxidantes que incluyen ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes tales como EDTA; complejos metálicos (por ejemplo, complejos Zn-proteína); polímeros biodegradables tales como poliésteres; y/o contraiones formadores de sales tales como sodio.

[0073] La formulación en el presente documento puede contener también más de una proteína, según sea necesario, para la afección particular que se está tratando, preferiblemente aquellas con actividades complementarias que no afecten de manera adversa a la otra proteína. Por ejemplo, puede ser deseable proporcionar dos o más anticuerpos que se unan al receptor HER2 o IgE en una única formulación. Además, los anticuerpos anti-HER2 y anti-VEGF se pueden combinar en una formulación. Dichas proteínas están presentes de manera adecuada en combinación en cantidades que son eficaces para el objetivo pretendido.

[0074] Las formulaciones para utilizar para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se puede realizar fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o después, de la liofilización y reconstitución. Alternativamente, la esterilidad de la mezcla completa se puede realizar mediante autoclave con los ingredientes, excepto la proteína, a aproximadamente 120°C durante aproximadamente 30 minutos, por ejemplo.

[0075] Después de mezclar conjuntamente la proteína, el lioprotector y los otros componentes opcionales, se liofiliza la formulación. Para este objetivo existen muchos liofilizadores diferentes, tales como los liofilizadores Hull150™ (Hull, EE.UU.) o GT20™ (Leybold-Heraeus, Alemania). La liofilización se lleva a cabo congelando la formulación y posteriormente sublimando el hielo del contenido congelado a una temperatura adecuada para un secado primario. En estas condiciones, la temperatura del producto está por debajo del punto eutéctico o la temperatura de colapso de la formulación. Normalmente, la temperatura de almacenamiento para el secado primario oscilará entre aproximadamente -30 y 25° C (con la condición de que el producto permanezca congelado durante el secado primario) a una presión adecuada, que variará normalmente entre aproximadamente 50 y 250 mTorr. La formulación, el tamaño y el tipo del recipiente que contiene la muestra (por ejemplo, un vial de vidrio) y el volumen del líquido dictarán principalmente el tiempo requerido para el secado, que puede variar entre unas pocas horas y algunos días (por ejemplo, 40-60 horas). Se puede llevar a cabo una etapa de secado secundario a aproximadamente 0-40°C, dependiendo principalmente del tipo y tamaño del recipiente y el tipo de proteína utilizada. Sin embargo, en el presente documento se observó que una etapa de secado secundario puede no ser necesaria. Por ejemplo, la temperatura de almacenamiento a lo largo de la fase de eliminación completa del agua de la liofilización puede ser de aproximadamente 15-30° C (por ejemplo, aproximadamente 20° C). El tiempo y la presión requerida para el secado secundario será el que produzca una torta liofilizada adecuada, dependiente, por ejemplo, de la temperatura y de otros parámetros. El tiempo de secado secundario viene dictado por el nivel de humedad residual deseado en el producto y normalmente dura por lo menos aproximadamente 5 horas (por ejemplo, 10-15 horas). La presión puede ser la misma que la empleada durante la etapa de secado primario. Se pueden variar las condiciones de liofilización dependiendo de la formulación y del tamaño del vial.

[0076] En algunos casos, puede ser deseable liofilizar la formulación de proteína en el recipiente en que debe llevarse a cabo la reconstitución de la proteína a efectos de evitar una etapa de transferencia. El recipiente en este caso puede ser, por ejemplo, un vial de 3, 5, 10, 20, 50 ó 100 cc.

[0077] Como proposición general, la liofilización dará lugar a una formulación liofilizada en la que el contenido de humedad de la misma sea inferior a aproximadamente el 5%, y preferiblemente inferior a aproximadamente el 3%.

### C. Reconstitución de la formulación liofilizada

[0078] En la etapa deseada, habitualmente cuando es el momento de administrar la proteína al paciente, la formulación liofilizada se puede reconstituir con un diluyente de manera que la concentración de proteína en la formulación reconstituida sea por lo menos de aproximadamente 50 mg/ml, por ejemplo entre aproximadamente 50

mg/ml y aproximadamente 400 mg/ml, más preferiblemente entre aproximadamente 80 mg/ml y aproximadamente 300 mg/ml, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 90 mg/ml y aproximadamente 150 mg/ml. Dichas concentraciones elevadas de proteína en la formulación se consideran que son particularmente útiles cuando se pretende la administración subcutánea de la formulación reconstituida. Sin embargo, para otras rutas de administración, tales como la administración intravenosa, se pueden desear concentraciones más bajas de la proteína en la formulación reconstituida (por ejemplo, entre aproximadamente 5-50 mg/ml, o entre aproximadamente 10-40 mg/ml de proteína en la formulación reconstituida). En algunas realizaciones, la concentración de proteína en la formulación reconstituida es significativamente mayor que la de la formulación preliofilizada. Por ejemplo, la concentración de proteína en la formulación reconstituida puede ser aproximadamente 2-40 veces, preferiblemente 3-10 veces y lo más preferiblemente 3-6 veces (por ejemplo, por lo menos tres veces o por lo menos cuatro veces) que la de la formulación preliofilizada.

[0079] La reconstitución tiene lugar generalmente a un temperatura de aproximadamente 25° C para asegurar la completa hidratación, aunque se pueden emplear otras temperaturas según se desee. El tiempo requerido para la reconstitución dependerá, por ejemplo, del tipo de diluyente, la cantidad de excipiente(s) y la proteína. Los diluyentes a modo de ejemplo incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWEI), una disolución a pH tamponado (por ejemplo, disolución salina tamponada con fosfato), disolución salina estéril, disolución de Ringer o disolución de dextrosa. El diluyente contiene opcionalmente un conservante. Anteriormente se han descrito conservantes de ejemplo, siendo los conservantes preferidos los alcoholes aromáticos tales como alcohol bencílico o fenólico. La cantidad de conservante empleado se determina evaluando las concentraciones diferentes de conservante para la compatibilidad con la proteína y el ensayo de la eficacia del conservante. Por ejemplo, si el conservante es un alcohol aromático (tal como alcohol bencílico), puede estar presente en una cantidad entre aproximadamente un 0,1-2,0 % y preferiblemente entre aproximadamente un 0,5-1,5 %, pero lo más preferible aproximadamente un 1,0-1,2 %.

[0080] Preferiblemente, la formulación reconstituida tiene por lo menos 6000 partículas por vial que tienen 10 µm de tamaño.

#### D. Administración de la formulación reconstituida

[0081] La formulación reconstituida se administra a un mamífero en necesidad de tratamiento con la proteína, preferiblemente un ser humano, según los procedimientos conocidos, tales como la administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o mediante inhalación.

[0082] La formulación reconstituyente se puede administrar al mamífero mediante administración subcutánea (es decir, debajo de la piel). A dicho objeto, se puede inyectar la formulación usando una jeringuilla. Sin embargo, están disponibles otros dispositivos para la administración de la formulación, tales como dispositivos de inyección (por ejemplo, los dispositivos Inject-ease™ y Genject™); plumas inyectoras (tales como GenPen™); dispositivos sin aguja (por ejemplo, MediJector™ y BioJector™); y sistemas de administración mediante parches subcutáneos.

[0083] La dosificación apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") de la proteína dependerá, por ejemplo, de la dolencia que se va tratar, la gravedad y la evolución de la dolencia, de si se administra la proteína con objetivos preventivos o terapéuticos, de la terapia previa, el historial clínico del paciente y la respuesta a la proteína, el tipo de proteína usada, y de la discreción del especialista médico que atiende la enfermedad. La proteína se administra adecuadamente al paciente de una vez o en una serie de tratamientos y se puede administrar al paciente en cualquier momento del diagnóstico progresivo. Se puede administrar la proteína como un único tratamiento o en conjunción con otros fármacos o terapias útiles en el tratamiento de la dolencia en cuestión.

[0084] Cuando la proteína de elección es un anticuerpo, de aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg es una dosis candidata inicial para la administración al paciente, ya sea, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas. Sin embargo, pueden ser útiles otras pautas de dosificación. El progreso de esta terapia se monitoriza fácilmente mediante técnicas convencionales.

[0085] En el caso de un anticuerpo anti-HER2, se puede administrar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo para tratar o prevenir un cáncer caracterizado por la sobreexpresión del receptor HER2. Se contempla que se puede utilizar una formulación reconstituida del anticuerpo anti-HER2 para tratar el cáncer de mama, ovario, estómago, endometrio, glándula salivar, pulmón, riñón, colon y/o vejiga. Por ejemplo, el anticuerpo anti-HER2 se puede utilizar para tratar el carcinoma ductal in situ (DCIS). Las dosificaciones de ejemplo del anticuerpo anti-HER2 están en el intervalo de 1-10 mg/kg mediante una o más administraciones separadas.

[0086] Los usos para una formulación anti-IgE incluyen el tratamiento o profilaxis de enfermedades alérgicas mediadas por IgE, infecciones parasitarias, cistitis intersticial y asma, por ejemplo. Dependiendo de la enfermedad o el trastorno a tratar, se administra al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz (por ejemplo, de aproximadamente 1-15 mg/kg) del anticuerpo anti-IgE.

## E. Artículos de fabricación

[0087] Se describe un artículo de fabricación que contiene la formulación liofilizada de la presente invención y se proporcionan instrucciones para su reconstitución y/o uso. El artículo de fabricación comprende un recipiente. Los recipientes adecuados incluyen, por ejemplo, botellas, viales (por ejemplo, viales de doble cámara), jeringuillas (tales como jeringuillas de doble cámara) y tubos de ensayo. El recipiente puede estar formado por una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente contiene la formulación liofilizada y la etiqueta en, o asociada con, el recipiente puede indicar directrices para la reconstitución y/o el uso. Por ejemplo, la etiqueta puede indicar que la formulación liofilizada se reconstituye hasta las concentraciones de proteína descritas anteriormente. La etiqueta puede indicar además que la formulación es útil o pretendida para la administración subcutánea. El recipiente que contiene la formulación puede ser un vial multiusos, que permite administraciones repetidas (por ejemplo, entre 2-6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede comprender además un segundo recipiente que comprende un diluyente adecuados (por ejemplo, BWFI). Tras mezclar el diluyente y la formulación liofilizada, la concentración final de proteína en la formulación reconstituida será generalmente por lo menos de 50 mg/ml. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringuillas, y prospectos con instrucciones para el uso.

[0088] La presente invención se entenderá de forma más completa en referencia a los siguientes ejemplos. No obstante, no deben interpretarse como limitativos del alcance de la invención

### EJEMPLO 1

#### FORMULACIÓN ANTI-HER2

[0089] La sobreexpresión del producto proto-oncogén *HER2* (p185<sup>HER2</sup>) se ha asociado con un conjunto de tumores malignos humanos agresivos. El anticuerpo monoclonal murino conocido como muMAB4D5 está dirigido contra el dominio extracelular (ECD) de p185<sup>HER2</sup>. La molécula muMAB4D5 se ha humanizado en un intento de mejorar su eficacia clínica mediante la reducción de la inmunogenicidad y permitiendo que ayude en las funciones efectoras humanas (véase WO 92/22653). Este ejemplo describe el desarrollo de una formulación liofilizada que comprende el anticuerpo humanizado de longitud completa huMAB4D5-8 descrito en WO 92/22653.

[0090] En el desarrollo de una formulación liofilizada, se criban inicialmente los excipientes y tampones midiendo la estabilidad de la proteína después de la liofilización y reconstitución. La proteína liofilizada en cada formulación también se somete a estudios de estabilidad acelerada para determinar la estabilidad potencial de la proteína sobre su vida útil. Estos estudios acelerados se realizan habitualmente a temperaturas por encima de las condiciones de almacenamiento propuestas y a continuación se utilizan los datos para estimar la energía de activación para las reacciones de degradación asumiendo una cinética de Arrhenius (Cleland et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems* 10(4): 307-377 (1993)). A continuación, se utiliza la energía de activación para calcular la vida útil esperada de la formulación de proteína en las condiciones de almacenamiento propuesta.

[0091] En estudios de cribado iniciales, se investigó la estabilidad de varias formulaciones liofilizadas de anticuerpo anti-HER2 recombinante humanizado (rhu-MAB HER2) después de la incubación a 5°C (condición de almacenamiento propuesta) y 40°C (condición de estabilidad acelerada). En estado líquido, se observó que rhuMAB HER2 se degradaba mediante desamidación (30Asn de cadena ligera) y la formación de isoaspartato a través de un intermedio de imida cíclica, succinimida (102Asp de cadena pesada). La desamidación se minimizó a pH 5,0 dando lugar a la degradación principalmente en la succinimida. A pH 6,0, se observó una desamidación ligeramente superior en la formulación de proteína líquida. Por tanto, se estudiaron las formulaciones liofilizadas con: (a) tampón succinato 5 ó 10 mM, pH 5,0 o (b) tampón histidina 5 ó 10 mM, pH 6,0. Ambos tampones contenían el tensoactivo, polisorbato 20 (Tween 20™), que se utilizaba para reducir el potencial para la agregación de la proteína reconstituida y para minimizar la formación de partículas después de la reconstitución. Estos tampones se utilizaron con y sin varios azúcares. La proteína se formuló en el tampón a 5,0, 21,0 ó 25,0 mg/ml. A continuación, estas formulaciones se liofilizaron y se evaluó la estabilidad de la proteína después de 2 semanas a 5°C y 40°C. En el liofilizador, se congelaron los viales a una temperatura de almacenamiento de -55°C durante aproximadamente 5 horas, seguido de un secado primario a una temperatura de almacenamiento de 5°C y 150 mTorr durante 30 horas, y un secado hasta conseguir una humedad residual de 1-2% con un secado secundario a una temperatura de almacenamiento de 20°C durante 10 horas. La ruta de degradación principal para esta proteína después de la liofilización era la agregación y, por tanto, se evaluó la estabilidad de la proteína mediante cromatografía de exclusión de tamaño para la proteína nativa para medir la recuperación de proteína nativa intacta (porcentaje de proteína intacta en la tabla 2 siguiente).

[0092] Se midieron los efectos estabilizantes de varios azúcares lioprotectores sobre la proteína liofilizada en succinato de sodio 10 mM, pH 5,0 (tabla 2). A concentraciones elevadas de azúcar (250-275 mM) y la concentración baja de proteína (5,0 mg/ml), la trehalosa y lactosa estabilizaron la proteína contra la agregación para la proteína liofilizada almacenada durante 2 semanas a 40°C. Sin embargo, se observó que la lactosa, un azúcar reductor, reaccionaba con la proteína durante el almacenamiento a más largo plazo a 40°C. Las formulaciones con proteína

5,0 mg/ml que contenían sorbitol o manitol produjeron proteína agregada después del almacenamiento a 40°C durante 2 semanas. A una concentración de proteína más elevada (21,0 mg/ml), las formulaciones que comprenden manitol, o manitol en combinación con sorbitol o glicina, contenían proteína agregada después de la liofilización y almacenamiento a ambas condiciones. En cambio, la trehalosa y la sacarosa evitaban la agregación a ambas condiciones de almacenamiento.

[0093] Se evaluaron las formulaciones de trehalosa 250 mM y lactosa 250 mM por la estabilidad a largo plazo. Después de 9 meses a 40°C o 12 meses a 5°C, no hubo cambios en el porcentaje de proteína intacta para la formulación de trehalosa. Para la formulación de lactosa, el porcentaje de proteína intacta permaneció constante (igual que el inicial) después de 3 meses a 40°C o 6 meses a 25°C. La formulación de trehalosa se podía almacenar a temperatura ambiente controlada (15-30°C) durante 2 años sin un cambio significativo en el porcentaje de proteína intacta.

[0094] La formulación de histidina 10 mM, pH 6,0, con manitol contenía menos proteína agregada después de almacenamiento a 40°C durante 2 semanas que una formulación de succinato 10 mM, pH 5,0, con manitol. Este resultado puede estar relacionado con cierto efecto estabilizante contribuido por la histidina sola. Después de almacenamiento a 40°C durante 2 semanas, hubo, sin embargo, una agregación significativa para formulaciones de histidina sola o de histidina/manitol. La adición de sacarosa a una masa igual a manitol (10 mg/ml de cada uno) en la formulación de histidina estabilizó la proteína contra la agregación para ambas condiciones de almacenamiento. La utilización de glicina con manitol no mejoró la estabilidad de la proteína, mientras que la formulación de sacarosa/glicina proporcionó la misma estabilidad que la formulación de sacarosa/manitol. Estos resultados indicaron adicionalmente que la sacarosa era útil para evitar la agregación de la proteína liofilizada durante el almacenamiento.

TABLA 2

Composición antes de la liofilización		% Proteína intacta <sup>a</sup>		
[Proteína] <sup>b</sup> (mg/ml)	Formulación	Líquida (5°C)	Liofilizada (2 semanas, 5°C)	Liofilizada (2 semanas, 40°C)
	<b>succinato de sodio 10 mM pH 5,0</b>			
5,0	trehalosa 275 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	98,9	99,1	98,9
5,0	lactosa 275 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	96,8	96,5	96,6
5,0	sorbitol 275 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	99,4	99,3	95,4
5,0	manitol 250 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	100,0	99,9	98,8
5,0	trehalosa 250 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	100,0	99,9	100,0
5,0	lactosa 250 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	100,0	100,0	100,0
21,0	trehalosa 250 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,2%	99,3	99,1	99,1
21,0	sacarosa 250 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,2%	99,6	99,6	99,7
21,0	manitol 250 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	100,0	94,6	94,0
21,0	manitol 188 mM/sorbitol 63 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	99,8	98,6	96,5
21,0	manitol 250 mM/glicina 25 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	99,5	96,5	96,4
	<b>Histidina 10 mM pH 6,0</b>			
21,0	Sin azúcar, Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	100,0	99,9	98,9
21,0	manitol 54,9 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	100,0	99,9	99,2
21,0	sacarosa 29,2 mM/glicina 266,4 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	100,0	100,0	99,6
21,0	manitol 54,9 mM/glicina 266,4 mM	100,0	99,8	98,9



	Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%			
21,0	manitol 54,9 mM/sacarosa 29,2 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	99,8	100,0	99,7

a. La fracción de la proteína intacta se midió mediante HPLC de exclusión de tamaño para la proteína nativa y el área del pico de la proteína nativa en relación con el área total de picos que incluía los agregados (columna TSK3000 SW XL, TosoHaas, con un flujo de 1,0 ml/min; elución con solución salina tamponada con fosfato; detección a 214 y 280 nm). Las formulaciones de proteínas se analizaron antes de la liofilización (líquido, 5°C) y después de la liofilización y almacenamiento a 5°C ó 40°C durante 2 semanas.

b. Las formulaciones que contenían proteína 5 mg/ml se reconstituyeron con agua destilada (20 ml, proteína 5,0 mg/ml) y las formulaciones que contenían proteína 21 mg/ml se reconstituyeron con agua bacteriostática para inyección (BWFI, alcohol bencílico al 0,9%; 20 ml, proteína 20 mg/ml).

[0095] La liberación de una concentración elevada de proteína se requiere a menudo para administración subcutánea debido a las limitaciones de volumen (s 1,5 ml) y los requerimientos de dosificación ( $\geq 100$  mg). Sin embargo, las concentraciones elevadas de proteína ( $\geq 50$  mg/ml) son a menudo difíciles de conseguir en el proceso de fabricación ya que a altas concentraciones, la proteína tiene tendencia a agregarse durante el procesado y es difícil de manipular (por ejemplo, bombear) y filtrar de forma estéril. Alternativamente, el proceso de liofilización puede proporcionar un método para permitir la concentración de la proteína. Por ejemplo, la proteína se introduce en viales a un volumen (Vf) y a continuación se liofiliza. A continuación, la proteína liofilizada se reconstituye con un volumen más pequeño (Vr) de agua o conservante (por ejemplo, BWFI) que el volumen original, (por ejemplo, Vr = 0,25Vf) que da lugar a una concentración más elevada de proteína en la solución reconstituida. Este proceso también da lugar a la concentración de los tampones y excipientes. Para la administración subcutánea, la solución es de manera deseable isotónica.

[0096] La cantidad de trehalosa en rhuMAb HER2 liofilizado se redujo para producir una solución isotónica después de la reconstitución para producir proteína 100 mg/ml. El efecto estabilizante de la trehalosa se determinó en función de la concentración para succinato de sodio 5 mM, pH 5,0, e histidina 5 mM, pH 6,0 a proteína 25,0 mg/ml (tabla 3). A concentraciones de trehalosa de 60 a 200 mM, no hubo una agregación significativa después de la incubación de la proteína liofilizada durante 4 semanas a 40°C. Estas formulaciones se reconstituyeron con 20 ml de agua bacteriostática para inyección (BWFI, USP, alcohol bencílico al 0,9%). La reconstitución de la formulación de trehalosa 50 mM (succinato de sodio 5 mM) con 4 ml de BWFI (proteína 100 mg/ml) después de la incubación durante 4 semanas a 40°C produjo un ligero incremento en la formación de agregados. Las formulaciones reconstituidas conservadas proporcionaron la ventaja de múltiples extracciones del mismo vial sin preocupaciones por la esterilidad. Cuando se utilizan agujas estériles, estas formulaciones permitirían entonces varias dosis de un único vial.

TABLA 3

Composición antes de la liofilización		% Proteína intacta <sup>a</sup>		
[Proteína] (mg/ml)	Formulación	Líquida (5°C)	Liofilizada (4 semanas, 5°C)	Liofilizada (4 semanas, 40°C)
	<b>succinato de sodio 5 mM pH 5,0</b>			
25,0	trehalosa 50 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01% <sup>b</sup>	100,0	100,0	99,5
25,0	trehalosa 60 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	100,0	100,0	99,9
25,0	trehalosa 60 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	100,0	100,0	99,2
25,0	trehalosa 100 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	100,0	100,0	99,7
25,0	trehalosa 150 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	100,0	100,0	99,8
25,0	trehalosa 200 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	100,0	100,0	100,0
	<b>Histidina 5 mM pH 6,0</b>			
25,0	manitol 38,4 mM/ sacarosa 20,4 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01%	100,0	100,0	99,3
25,0	manitol 38,4 mM/ sacarosa 20,4 mM Tween 20 <sup>TM</sup> al 0,01% <sup>c</sup>	100,0	100,0	99,4

25,0	trehalosa 60 mM Tween 20™ al 0,01% <sup>d</sup>	100,0	100,0	99,8
25,0	trehalosa 60 mM Tween 20™ al 0,01%	100,0	100,0	99,4
25,0	trehalosa 100 mM Tween 20™ al 0,01%	100,0	100,0	99,6
25,0	trehalosa 150 mM Tween 20™ al 0,01%	100,0	100,0	100,0
25,0	trehalosa 200 mM Tween 20™ al 0,01%	100,0	100,0	100,0

a. La fracción de la proteína intacta se midió mediante HPLC de exclusión de tamaño para la proteína nativa y se definió como el área del pico de la proteína nativa en relación con el área total de picos que incluía los agregados (columna TSK3000 SW XL, TosoHaas, con un flujo de 1,0 ml/min; elución con solución salina tamponada con fosfato; detección a 214 y 280 nm). Las formulaciones de proteínas se analizaron antes de la liofilización (líquido, 5°C) y después de la liofilización y almacenamiento a 5°C ó 40°C durante 4 semanas. Las formulaciones se reconstituyeron con agua bacteriostática para inyección (BWFI, USP, alcohol bencílico al 0,9% p/p; 20 ml, proteína 22 mg/ml).

b. Reconstituido con 4 ml de BWFI (alcohol bencílico al 0,9%) para producir proteína 100 mg/ml.

c. Reconstituido con 4 ml de BWFI (alcohol bencílico al 1,1%) para producir proteína 100 mg/ml..

d. Muestra incubada durante 2 semanas a 5°C o 40°C y a continuación reconstituida con 20 ml de BWFI (alcohol bencílico al 0,9%) para producir proteína 22 mg/ml.

5 **[0097]** Actualmente, se está investigando rhuMAb HER2 como agente terapéutico para el tratamiento del cáncer de mama. La proteína se dosifica a pacientes a 2 mg/kg en una base semanal. Dado que el peso medio de estos  
10 pacientes es 65 kg, la dosis semanal promedio es 130 mg de rhuMAb HER2. Para la administración subcutánea, se toleran bien volúmenes de inyección de 1,5 ml o menos y, por tanto, la concentración de proteína para una administración subcutánea semanal de rhuMAb HER2 puede ser aproximadamente 100 mg/ml (dosis promedio de 130 mg/1,5 ml). Tal como se ha mencionado anteriormente, esta concentración elevada de proteína es difícil de fabricar y mantener en una forma estable. Para conseguir esta concentración elevada de proteína, el rhuMAb HER2 formulado en: (a) succinato de sodio 5 mM, pH 5,0 o (b) histidina 5 mM, pH 6,0, se liofilizó a 25 mg/ml de proteína en  
15 trehalosa 60 mM, Tween 20™ al 0,01%. La liofilización se realizó mediante el relleno de 18 ml de formulación de proteína en viales de 50 cc. En el liofilizador, los viales se congelaron a una temperatura de almacenamiento de -55°C durante aproximadamente 5 horas seguido de un secado primario a una temperatura de almacenamiento de 5°C y 150 mTorr durante 30 horas y se consiguió un secado hasta una humedad residual de 1-2% con un secado secundario a una temperatura de almacenamiento de 20°C durante 10 horas. Los termopares colocados en viales que contenían el placebo (formulación sin proteína) indicaron que el producto en los viales se mantuvo por debajo de -10°C a lo largo del secado primario. Los estudios de detención secuencial durante la liofilización revelaron que la humedad residual después del secado primario era normalmente inferior a 10%.

20 **[0098]** A continuación, la proteína liofilizada se reconstituyó con 4 ó 20 ml de BWFI (alcohol bencílico al 0,9 ó 1,1%) para producir soluciones concentradas de proteína:

(a) 4 ml: rhuMAb HER2102 mg/ml, trehalosa 245 mM, succinato de sodio 21 mM, pH 5,0 o histidina 21 mM, pH 6,0, Tween 20™ al 0,04%;

25 (b) 20 ml: rhuMAb HER2 22 mg/ml, trehalosa 52 mM, succinato de sodio 4 mM, pH 5,0 o histidina 4 mM, pH 6,0, Tween 20™ al 0,009%.

30 **[0099]** Después del almacenamiento de las formulaciones liofilizadas durante 4 semanas a 40°C y la reconstitución a 22 mg/ml de proteína, la cantidad de proteína agregada pareció incrementarse ligeramente con la disminución de la concentración de trehalosa. La estabilidad de la proteína liofilizada no se vio afectada por el volumen de reconstitución. Tal como se muestra en la figura 1, la cantidad de proteína intacta después de la incubación de la proteína liofilizada a 40°C fue la misma que para la formulación de trehalosa 60 mM, succinato de sodio 5 mM, pH 5,0, Tween 20™ al 0,01% reconstituida con 4 ó 20 ml de BWFI.

35 **[0100]** Los resultados mostrados en la tabla 3 sugirieron que podría haber una relación entre la concentración de trehalosa y la estabilidad de proteína. Para valorar más esta relación, se incubaron durante 91 días a 40°C las formulaciones que contenían diferentes concentraciones de trehalosa formulada en succinato de sodio o histidina. A continuación se midió la estabilidad en función de la relación molar d trehalosa a proteína para cada concentración de trehalosa. Tal como se muestra en la figura 2, la estabilidad de la proteína disminuyó claramente con concentraciones decrecientes de trehalosa para ambas formulaciones. No hubo una diferencia aparente entre los  
40 dos tampones, succinato e histidina, en estas formulaciones, lo que sugería que el estabilizador primario bajo estas condiciones es trehalosa. Además, la disminución observada en la proteína de contacto para ambas formulaciones sería aceptable incluso a la concentración baja de trehalosa para una formulación que se almacena a 2-8°C a lo largo de su vida útil. Sin embargo, si se necesita la estabilidad de la temperatura ambiente controlada (temperatura máxima 30°C), pueden ser necesarias concentraciones de trehalosa más elevadas (≥ 600:1 trehalosa:proteína)

dependiendo de las especificaciones de estabilidad para el producto (es decir, la especificación para la cantidad de proteína intacta permanente después de 2 años de almacenamiento). Habitualmente, una condición de almacenamiento a temperatura ambiente controlada requeriría estabilidad durante 6 meses a 40°C que es equivalente a un almacenamiento a 30°C durante 2 años.

[0101] Tal como se muestra en la figura 3, la formulación con trehalosa 250 mM no cambió después de 6 meses a 40°C, mientras que ambas formulaciones con trehalosa 60 mM eran menos estables. A continuación, las formulaciones con trehalosa 60 mM pueden necesitar un almacenamiento refrigerado si la especificación del producto al final de su vida útil es, por ejemplo, superior al 98% de proteína intacta mediante cromatografía de exclusión de tamaño nativo.

[0102] En el estudio de cribado previo, también se observó que la sacarosa evitaba la agregación de rhuMab HER2 después de la liofilización y el posterior almacenamiento. Para conseguir soluciones isotónicas después de la reconstitución para la administración subcutánea (aproximadamente una concentración de cuatro veces de los componentes y la proteína de la formulación), la concentración de sacarosa se debe reducir significativamente. La concentración de masa igual de sacarosa y manitol (agente de relleno) utilizada en los estudios de cribado evitaba la agregación de la proteína. Se eligió una concentración inferior de sacarosa y manitol (concentraciones de masas iguales) como una formulación subcutánea potencial de rhuMab HER2. La solución de proteína (proteína 25 mg/ml, histidina 5 mM, pH 6,0, manitol 38,4 mM (7 mg/ml), sacarosa 20,4 mM (7 mg/ml), Tween 20™ al 0,01%) se liofilizó de la misma manera que la formulación de trehalosa 60 mM, excepto que el ciclo de secado primario se extendió hasta 54 horas. Después de 4 semanas a 40°C, hubo un ligero incremento en la cantidad de agregados después de la reconstitución con 4,0 ó 20,0 ml d BWFI (tabla 3). La cantidad de proteína agregada fu la misma para la reconstitución a 22 ó 100 mg/ml de proteína (figura 4). Como las formulaciones de trehalosa 60 mM, la formulación d manitol/sacarosa produjo menos proteína d contacto con el tiempo a 40°C. La proporción molar de sacarosa a proteína para esta formulación fue de 120 a 1, indicando que la combinación de manitol/sacarosa puede ser más eficaz que la trehalosa sola a la misma proporción molar de azúcar estabilizante (figuras 2 y 4).

[0103] En los ejemplos anteriores, se determinó la estabilidad de las formulaciones liofilizadas de rhuMab HER2 en función de la temperatura. Estos estudios demostraron que las formulaciones de trehalosa y manitol/sacarosa evitaban la degradación de la proteína en estado liofilizado a temperaturas elevadas (40°C). Sin embargo, estos experimentos no se referían a la estabilidad de la proteína después de la reconstitución y almacenamiento. Una vez reconstituidas con BWFI, las formulaciones liofilizadas de rhuMab HER2 se pueden utilizar para varias administraciones del fármaco. En particular, se diseñó la configuración del vial (450 mg rhuMab HER2) para proporcionar tres dosis al paciente promedio (130 mg de rhuMab HER2 por dosis). Dado que el fármaco se dosifica semanalmente, el vial se puede almacenar por lo menos tres semanas después de la reconstitución. Para asegurar que el rhuMab HER2 permanecía estable después de la reconstitución, se realizaron estudios de estabilidad en las formulaciones reconstituidas de rhuMab HER2 a 5°C y 25°C.

[0104] Para la administración subcutánea, las formulaciones se reconstituyeron hasta 100 mg/ml (4 m de BWFI). A esta concentración de proteína elevada, la proteína puede ser más susceptible para la agregación que la forma de dosificación intravenosa que se reconstituyó hasta 22 mg/ml de proteína (20 ml de BWFI). Se evaluaron las cuatro formulaciones de rhuMab HER2 del ejemplo previo por la agregación (pérdida de proteína intacta). Tal como se muestra en las tablas 4 a 6, no hubo diferencia en la estabilidad para las formulaciones reconstituidas a proteína 22 y 100 mg/ml. Además, estas formulaciones mantuvieron la proteína completamente intacta durante hasta 90 días a 5°C y 30 días a 25°C, indicando que la proteína rec onstituida se podía almacenar refrigerada durante por lo menos 90 días. A diferencia de la estabilidad de proteína liofilizada en el ejemplo previo, la concentración de trehalosa en la formulación no afectaba a la estabilidad de la proteína (tabla 7).

TABLA 4

<b>Estabilidad de las formulaciones reconstituidas para rhuMab HER2 liofilizado con proteína 25 mg/ml en succinato de sodio 5 mM, pH 5,0, trehalosa 60 mM, Tween 20™ al 0,01%</b>				
<b>Tiempo (días)</b>	<b>% de proteína intacta</b>			
	<b>Proteína 22 mg/ml</b>		<b>Proteína 100 mg/ml</b>	
	<b>5°C</b>	<b>25°C</b>	<b>5°C</b>	<b>25°C</b>
0	99,9	99,9	99,7	99,7
14	ND	100,0	ND	100,0
30	100,0	100,0	100,0	100,0
91	99,8	ND	100	ND

Las muestras se reconstituyeron con 4,0 ó 20,0 ml de BWFI (alcohol bencílico al 1,1% o 0,9%), y a continuación se almacenaron a 5°C o 25°C. El porcentaje de proteína intacta se definió como la fracción de área de pico de proteína nativa medida mediante cromatografía de exclusión de tamaño para proteína nativa. ND = no determinado.

TABLA 5

Estabilidad de las formulaciones reconstituidas para rhuMAb HER2 liofilizado con proteína 25 mg/ml en histidina 5 mM, pH 6,0, trehalosa 60 mM, Tween 20™ al 0,01%				
Tiempo (días)	% de proteína intacta			
	Proteína 22 mg/ml		Proteína 100 mg/ml	
	5°C	25°C	5°C	25°C
0	100,0	100,0	100,0	100,0
14	ND	100,0	ND	100,0
31	99,3	99,7	100,0	100,0
61	100,0	ND	ND	ND

Las muestras se reconstituyeron con 4,0 ó 20,0 ml de BWFI (alcohol bencílico al 1,1% o 0,9%), y a continuación se almacenaron a 5°C o 25°C. El porcentaje de proteína intacta se definió como la fracción de área de pico de proteína nativa medida mediante cromatografía de exclusión de tamaño para proteína nativa. ND = no determinado.

TABLA 6

Estabilidad de las formulaciones reconstituidas para rhuMAb HER2 liofilizado con proteína 25 mg/ml en histidina 5 mM, pH 6,0, manitol 38,4 mM, sacarosa 20,4 mM, Tween 20™ al 0,01%				
Tiempo (días)	% de proteína intacta			
	Proteína 22 mg/ml		Proteína 100 mg/ml	
	5°C	25°C	5°C	25°C
0	99,7	99,7	99,8	99,8
14	ND	100,0	ND	99,8
31	100,0	100,0	100,0	100,0
92	100,0	ND	100,0	ND

Las muestras se reconstituyeron con 4,0 ó 20,0 ml de BWFI (alcohol bencílico al 1,1% o 0,9%), y a continuación se almacenaron a 5°C o 25°C. El porcentaje de proteína intacta se definió como la fracción de área de pico de proteína nativa medida mediante cromatografía de exclusión de tamaño para proteína nativa. ND = no determinado.

TABLA 7

Estabilidad de las formulaciones reconstituidas para rhuMAb HER2 liofilizado con proteína 21 mg/ml en succinato de sodio 10 mM, pH 5,0, trehalosa 250 mM, Tween 20™ al 0,2%		
Tiempo (días)	% de proteína intacta	
	Proteína 21 mg/ml	
	5°C	25°C
0	99,8	99,8
14	ND	100,0
31	99,9	99,4
92	99,8	ND

Las muestras se reconstituyeron con 20,0 ml de BWFI (alcohol bencílico al 0,9%), y a continuación se almacenaron a 5°C o 25°C. El porcentaje de proteína intacta se definió como la fracción de área de pico de proteína nativa medida mediante cromatografía de exclusión de tamaño para proteína nativa. ND = no determinado.

10 [0105] Tal como se ha mencionado anteriormente, la principal ruta de degradación para rhuMAb HER2 en soluciones acuosas es la desamidación o la formación de succinimida. La pérdida de proteína nativa debido a la desamidación o la formación de succinimida se evaluó para las cuatro formulaciones reconstituidas de rhuMAb HER2.

15 [0106] El análisis de la desamidación y formación de succinimida de rhuMAb HER2 se realizó utilizando cromatografía de intercambio catiónico. Se utilizó una columna de carboxisulfona (CSX) de poro amplio Bakerbond (4,6 x 250 mm) a una velocidad de flujo de 1 ml/min. Los tampones de fase móvil fueron (A) fosfato de sodio 0,02 M, pH 6,9, y (B) fosfato de sodio 0,02 M, pH 6,9, NaCl 0,2 M. A continuación, se realizó la cromatografía a 40°C de la siguiente manera:

20

TABLA 8

Tiempo (min)	% tampón B
0	10
55	45
57	100
62	100
62,1	10

63	10
La elución de los picos se monitorizó a 214 nm y se cargaron 75 µg de proteína para cada análisis.	

[0107] De nuevo, no hubo diferencias en la estabilidad de las formulaciones reconstituidas a 22 y 100 mg/ml de proteína (figuras 5 a 7). La degradación de proteína fue más rápida a 25°C que a 5°C para cada formulación, y la velocidad de degradación fue comparable para todas las formulaciones almacenadas a 5°C. Las formulaciones que contenían histidina experimentaron una velocidad de degradación ligeramente superior a 25°C que las formulaciones de succinato. La cantidad de trehalosa en la formulación no afectó a la velocidad de degradación a cualquier temperatura (figuras 5 y 8). Estos resultados indicaron que estas cuatro formulaciones proporcionan una velocidad de degradación aceptable bajo condiciones de almacenamiento refrigerado (5°C) para el periodo de uso pretendido (30 días después de la reconstitución con BWFI).

[0108] Las formulaciones para múltiples usos deben pasar un test de eficacia de conservación descrito por la Farmacopea de Estados Unidos (USP) para utilizar en los Estados Unidos. La formulación de rhuMab HER2 liofilizada que consistía en proteína 25 mg/ml, histidina 5 mM, pH 6,0, trehalosa 60 mM, Tween 20™ al 0,01% se reconstituyó con 20 ml de alcohol bencílico a concentraciones entre 0,9 y 1,5% p/p. Para concentraciones de 1,3% p/p o superiores, la solución reconstituida se volvió turbia después de incubación durante la noche a temperatura ambiente (-25°C). La reconstitución con la solución de BWFI estándar (alcohol bencílico al 0,9%) dio lugar a una solución que no pasaba de manera consistente los tests de eficacia de conservantes. Sin embargo, la reconstitución con alcohol bencílico al 1,0 ó 1,1% eran compatibles con la formulación y pasó el test de eficacia de conservantes. Las especificaciones del fabricante para la solución requerían un intervalo de  $\pm 10\%$  y, por tanto, las formulaciones liofilizadas se reconstituyen con alcohol bencílico al 1,1% (1,1  $\pm$  0,1%).

[0109] Se desarrolló un ciclo de liofilización de una etapa para la formulación de rhuMab HER2. En el ciclo de liofilización de una etapa, se liofilizaron rhuMab HER2 a 25 mg/ml, trehalosa 60 mM, histidina 5 mM pH 6 y polisorbato 20 al 0,01% a una temperatura de almacenamiento de 20°C, y una presión de 150 mTorr. Después de 47 horas, el contenido de humedad residual de la torta liofilizada fue inferior del 5%. Este ciclo de liofilización se considera útil porque simplifica el proceso de fabricación mediante la eliminación de la etapa de secado secundaria.

## EJEMPLO 2

### FORMULACIÓN ANTI-IgE

[0110] Los anticuerpos IgE se unen a receptores de afinidad elevada específicos en mastocitos, conduciendo a la desgranulación de mastocitos y la liberación de mediadores, tales como histamina, que producen síntomas asociados con la alergia. Por tanto, los anticuerpos anti-IgE que bloquean la unión de IgE a su receptor de afinidad elevada son de potencial valor terapéutico en el tratamiento de la alergia. Estos anticuerpos tampoco deben unirse a IgE una vez se ha unido al receptor debido a que esto desencadenaría la liberación de histamina. Este ejemplo describe el desarrollo de una formulación liofilizada que comprende anticuerpo anti-IgE humanizado de longitud completa MaE11 descrito en Presta et al. J. Immunology, 151: 2623-2632 (1993).

[0111] *Materiales:* se utilizó rhuMab E25 (anticuerpo anti-IgE humanizado recombinante MaE II) altamente purificado que no contenía Tween 20™ en las formulaciones descritas a continuación. Se adquirieron membranas de diálisis Spectra/Por 7 de Spectrum (Los Angeles, CA). Todos los otros reactivos utilizados en este estudio se obtuvieron de fuentes comerciales y eran de grado analítico. Los tampones de las formulaciones y la fase móvil de las cromatografías se prepararon mediante mezclado de la cantidad apropiada de tampón y sal con agua Milli-Q en un matraz volumétrico.

[0112] *Formulación:* Se dializó el grupo de E25 por Sefarosa S en tampones para formulación tal como se ha especificado. La diálisis se realizó mediante un mínimo de 4 intercambios de tampones de 2 litros durante un periodo de 48 horas a 2-8°C. Después del análisis, se añadió lioprotector a una concentración isotónica a algunas de las formulaciones según fuera necesario. La concentración de proteína después de la diálisis se determinó mediante espectroscopía UV utilizando una absorptividad molar de 1,60. La proteína dializada se diluyó hasta la concentración predeterminada de la formulación con un tampón para la formulación apropiado, se filtró de forma estéril utilizando un filtro Millex-GV de 0,22 µm (Millipore) y se dispensó en vidrio prelavado y pasado por autoclave. Los viales se ajustaron con tapones de liofilización de teflón siliconados y se liofilizaron utilizando las siguientes condiciones: la formulación E25 se congeló hasta -55°C a 80°C/hora y el contenido del vial se mantuvo congelado durante 4 horas. La temperatura de almacenamiento se incrementó gradualmente hasta 25°C a 10°C/hora durante el secado primario. El secado primario se llevó a cabo a 25°C, una presión de vacío en la cámara de 50 µ durante 39 horas de manera que la humedad residual de la torta liofilizada se redujo el 1-2%. Después de la liofilización, se extrajo un vial de cada formulación para un análisis a  $t = 0$  y los viales restantes se mantuvieron a varias temperaturas que incluían -70°C, 2-8°C, 25°C, 30°C (temperatura ambiente controlada) 40°C y 50°C.

[0113] *Cromatografía:* Se llevó a cabo una cromatografía de exclusión por tamaño de proteína nativa en una

columna Bio-Rad Bio-Select™ SEC 250-5 (300 x 7,8 mm). La columna se equilibró y desarrolló en PBS a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min utilizando una columna HPLC Hewlett Packard 1090L equipada con un detector con una serie de diodos. Se utilizaron patrones de peso molecular (Bio-Rad, Inc.) consistían en tiroglobulina (670 kd), gamma-globulina (158 kd), ovoalbúmina (44 kd), y cianocobalamina (1,35 kd) para calibrar la columna. La carga de muestra fue de 25 µg y se detectó proteína mediante la monitorización de la absorción UV a 214 nm utilizando el software Turbochrom 3 (PE Nelson, Inc).

**[0114]** *Cromatografía de interacción hidrofóbica:* Se cromatografiaron fragmentos de F(ab')<sub>2</sub> del anticuerpo E25 utilizando una columna TosoHaas de Butil-NPR (3,5 x 4,6 mm) y una columna HPLC Hewlett Packard 1090L equipada con un detector con una serie de diodos. El tampón de elución A fue: Tris 20 mM, sulfato de amonio 2 M, glicerol al 20% (v/v), pH 8,0, mientras que el tampón de elución B fue: Tris 20 mM, glicerol al 20% (v/v), pH 8,0. La columna se equilibró con tampón de elución B al 10% a una velocidad de flujo de 1,0 ml/min durante un mínimo de 20 minutos. La carga de muestra fue de 5 µg y la proteína se detectó mediante monitorización de la absorción UV a 214 nm utilizando un software de obtención de datos Turbochrom 3 (PE Nelson, Inc). Después de la inyección de la muestra, la columna se mantuvo a un tampón B al 10% durante 1 minutos, seguido de un gradiente lineal de 10% a 62% de tampón B en 20 minutos. La columna se lavó con tampón B al 100% durante 5 minutos y se reequilibró con tampón B al 10% durante un mínimo de 20 minutos entre las inyecciones sucesivas de muestra.

**[0115]** *Actividad de unión a anticuerpo:* El ensayo de inhibición de la unión al receptor de IgE (IE25:2) se llevó a cabo tal como se describe en Presta et al., supra, sobre muestras diluidas hasta 20 pg/ml y 30 pg/ml en diluyente de ensayo (solución salina tamponada con fosfato, BSA al 0,5%, polisorbato 20 al 0,05%, Timerosol al 0,01%). A continuación, cada dilución se ensayó por triplicado y los resultados se multiplicaron por un factor de dilución apropiado para producir una concentración activa. Se promediaron los resultados de 6 ensayos. El ensayo mide la capacidad de rhuMAb E25 para unirse competitivamente a IgE y así evitar la unión de IgE a su receptor de afinidad elevada que se inmoviliza a una placa ELISA. Los resultados se dividen por la concentración de anticuerpo tal como se determina mediante espectroscopía de absorción UV y se indica como una actividad específica. Los experimentos previos han demostrado que este ensayo es indicador de la estabilidad.

**[0116]** *Ensayo de partículas:* Se agruparon los viales reconstituidos de rhuMAb E25 liofilizado para conseguir un volumen de aproximadamente 7 ml. Se determinó un recuento del número de partículas de tamaño que variaba de 2 a 80 µm presentes en 1 ml de muestra utilizando un contador Hiac/Royco modelo 8000. El contador se lavó primero con 1 ml de muestra tres veces, seguido de la medición de 1 ml de muestra por triplicado. El instrumento determina el número de partículas por ml que son iguales o superiores a 10 µm y el número de partículas por ml que son iguales o superiores a 25 µm.

**[0117]** La primera etapa en el desarrollo de una formulación para el anticuerpo anti-IgE era determinar un tampón y pH adecuados para la liofilización y almacenamiento del producto. Se formuló anticuerpo a una concentración de 5,0 mg/ml en tampones de succinato 10 mM que variaban de pH 5,0 a pH 6,5 y en tampones de fosfato de sodio, fosfato de potasio e histidina a pH 7,0. La figura 9 muestra que se observó un aumento de agregados de anticuerpo en las formulaciones con pH más elevado tanto antes como después de la liofilización. Una excepción fue la formulación de histidina a pH 7, donde no se observó un incremento de agregados tras el almacenamiento a 2-8°C. La figura 10 muestra rhuMAb E25 liofilizado en tampón histidina 5 mM a pH 6 y pH 7 y almacenado durante 1 año a 2-8°C, 25°C, y 40°C. En cada punto de tiempo del ensayo y temperatura de almacenamiento, la formulación de pH 6 presentaba menos agregación que el anticuerpo formulado a pH 7. Estos resultados muestran que la histidina a pH 6 es un sistema de tampón particularmente útil para evitar la agregación del anticuerpo.

**[0118]** Para facilitar el cribado de lioprotectores, se formuló el anticuerpo anti-IgE en succinato de sodio a pH 5 con o sin un lioprotector. Los lioprotectores potenciales, añadidos a concentraciones isotónicas, se agruparon en 3 categorías:

- (a) monosacárido no reductor (es decir, manitol);
- (b) disacáridos reductores (es decir, lactosa y maltosa); y
- (c) disacáridos no reductores (es decir, trehalosa y sacarosa).

**[0119]** La agregación de las formulaciones después del almacenamiento a 2-8°C y 40°C durante un año se muestra en las figuras 11 y 12. Con el almacenamiento a 2-8°C, la formulación de monosacárido (manitol) se agregó a una velocidad similar al tampón de control, mientras que las formulaciones que contenían disacáridos fueron igual de eficaces en el control de la agregación (figura 11). Los resultados después del almacenamiento a 40°C fueron similares con la excepción de la formulación de sacarosa que se agregó rápidamente (que se correlaciona con el oscurecimiento de la torta liofilizada (figura 12)). Se observó posteriormente que esto estaba causado por la degradación de sacarosa después del almacenamiento a pH ácido y a temperatura elevada.

**[0120]** La cromatografía de interacción hidrofóbica del anticuerpo formulado en el tampón de histidina a pH 6 con lactosa muestra que el anticuerpo se altera después de almacenamiento durante 6 meses a 40°C (figura 13). Los picos de la cromatografía se amplían y el tiempo de retención disminuye. Estos cambios no se observan con el

tampón de control y las formulaciones de sacarosa almacenadas bajo condiciones similares tal como se muestra en las figuras 14 y 15, respectivamente. Además, el enfoque isoelectrico mostró un desplazamiento ácido en el pI del anticuerpo formulado en lactosa y almacenado a 25°C y 40°C. Esto indica que los azúcares reductores no son adecuados como lioprotectores para el anticuerpo.

**[0121]** En la figura 16 se muestra la agregación de formulaciones liofilizadas de anti-IgE a una concentración de 20 mg/ml en tampón de histidina 5 mM a pH 6 con varias concentraciones de sacarosa y trehalosa después del almacenamiento durante 12 semanas a 50°C. Ambos azúcares tienen un efecto protector en la agregación cuando la concentración de azúcar es superior a 500 moles de azúcar por mol de anticuerpo. A partir de estos resultados, se identificaron formulaciones isotónicas e hipertónicas de sacarosa y trehalosa para el posterior desarrollo. Las formulaciones se diseñan para rellenarse antes de la liofilización a una concentración relativamente baja de anticuerpo y el producto liofilizado se reconstituye con menos volumen que relleno con agua bacteriostática para inyección (BWFI) que comprende alcohol bencílico al 0,9%. Esto permite la concentración del anticuerpo inmediatamente antes de la administración subcutánea e incluye un conservante para una potencial formulación multiusos a la vez que se evitan las interacciones entre la proteína y el conservante tras un almacenamiento a largo plazo.

**[0122]** Formulación isotónica: Anti-IgE a 25 mg/ml formulado en tampón de histidina 5 mM a pH 6 con 500 moles de azúcar por mol de anticuerpo que es igual a una concentración de azúcar de 85 mM. Esta formulación se reconstituye con BWFI (0,9% de alcohol bencílico) a un volumen que es cuatro veces inferior al que se relleno. Esto da lugar a 100 mg/ml de anticuerpo en histidina 20 mM a pH 6 con una concentración isotónica de azúcar de 340 mM.

**[0123]** Formulación hipertónica: Anti-IgE a 25 mg/ml formulado en tampón de histidina 5 mM a pH 6 con 1000 moles de azúcar por mol de anticuerpo que es igual a una concentración de azúcar de 161 mM. Esta formulación se reconstituye con BWFI (0,9% de alcohol bencílico) a un volumen que es cuatro veces inferior al que se relleno. Esto da lugar a 100 mg/ml de anticuerpo en histidina 20 mM a pH 6 con una concentración isotónica de azúcar de 644 mM.

**[0124]** Las comparaciones de la agregación de anticuerpos después del almacenamiento de las formulaciones isotónicas e hipertónicas hasta 36 semanas se muestran en las figuras 17 a 19. No se observa cambio en la agregación en ninguna de las formulaciones hipertónicas o isotónicas con un almacenamiento a 2-8°C (figura 17). Con el almacenamiento a una temperatura de sala controlada (30°C), no se observa un aumento de la agregación en las formulaciones hipertónicas, mientras que tiene lugar un aumento en la agregación del 1 al 2% en las formulaciones isotónicas (figura 18). Finalmente, después del almacenamiento a 50°C se observa un incremento mínimo en la agregación con las formulaciones hipertónicas, tiene lugar un incremento del 4% en las agregaciones con la formulación isotónica con trehalosa y tiene lugar un incremento del 12% en la agregación con la formulación isotónica con sacarosa (figura 19). Estos resultados muestran que la formulación isotónica contiene la cantidad mínima de azúcar necesaria para mantener la estabilidad del anticuerpo con un almacenamiento a una temperatura de hasta 30°C.

**[0125]** La actividad de unión del anti-IgE en las formulaciones isotónicas e hipertónicas se midió en un ensayo de inhibición de receptores de IgE. Se descubrió que la actividad de unión de las formulaciones con sacarosa y trehalosa isotónicas e hipertónicas no cambiaban de manera esencial después de un almacenamiento a -70°C, 2-8°C, 30°C y 50°C hasta 36 semanas.

**[0126]** Se sabe que las formulaciones liofilizadas de proteínas contienen agregados o partículas insolubles (Cleland et al., *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*, 10 (4):307-377 (1993)). Por consiguiente, se realizó un ensayo de partículas de anticuerpo liofilizado a una concentración de 25 mg/ml en histidina 5 mM, pH 6 con la adición de sacarosa 85 mM y trehalosa 161 mM. Se añadió polisorbato 20 a las formulaciones a una concentración de 0,005%, 0,01%, y 0,02%. Las muestras se liofilizaron y analizaron después de una reconstitución hasta 100 mg/ml de anticuerpo en histidina 20 mM, pH 6 con azúcar a 340 mM y 644 mM. La concentración de polisorbato 20 después de la reconstitución fue de 0,02%, 0,04%, y 0,08%.

**[0127]** La tabla 9 muestra el número de partículas con un tamaño igual o superior a 10 µm e igual o superior a 25 µm de formulaciones isotónicas e hipertónicas de sacarosa y trehalosa. Se añadió polisorbato 20 a las formulaciones a las concentraciones de 0,005%, 0,01%, y 0,02% antes de la liofilización. Los resultados muestran que la adición de Tween™ a la formulación reduce significativamente el número de partículas en cada intervalo de tamaños analizado. La especificación de la Farmacopea de Estados Unidos (USP) para inyecciones de pequeño volumen es no más de 6.000 partículas de un tamaño igual o superior a 10 µm y no más de 600 partículas de un tamaño superior o igual a 25 µm por recipiente (Cleland et al., supra). Con la adición de polisorbato 20, las formulaciones hipertónicas e isotónicas pasan esta especificación.

#### TABLA 9

Formulación	Polisorbato 20	Partículas por ml	
		≥ 10 µm	≥ 25 µm
Sacarosa isotónica	Ninguno	16.122	28
	0,005%	173	2
	0,01%	224	5
	0,02%	303	6
Sacarosa hipertónica	Ninguno	14.220	84
	0,005%	73	6
	0,01%	51	0
	0,02%		6
Trehalosa isotónica	Ninguno	33.407	24
	0,005%	569	4
	0,01%	991	16
	0,02%	605	9
Trehalosa hipertónica	Ninguno	24.967	28
	0,005%	310	11
	0,01%	209	6
	0,02%	344	8

[0128] En la tabla 10 siguiente se muestra una formulación desarrollada para el anticuerpo anti-IgE (es decir, 143 mg de formulación isotónica de rhuMAb E25 en vial) que se considera útil para la administración subcutánea de este anticuerpo. Se rellena un vial de 10 cc con 5,7 ml de rhuMAb E25 a una concentración de 25 mg/ml formulada en histidina 5 mM a pH 6,0 con polisorbato 20 al 0,01%. Se añade sacarosa como lioprotector a una concentración de 85 mM que corresponde a una proporción molar de azúcar con respecto a anticuerpo de 500 a 1. El vial se liofiliza y se reconstituye con alcohol bencílico al 0,9% hasta un cuarto del volumen del relleno o 1,2 ml. La concentración final de componentes en la formulación se incrementa cuatro veces hasta 100 mg/ml de rhuMAb E25 en histidina 20 mM a pH 6 con polisorbato 20 al 0,04% y sacarosa 340 mM (isotónica) y alcohol bencílico al 0,9%. La formulación contiene tampón de histidina a pH 6 debido a su efecto protector demostrado en la agregación de anticuerpos. Se añadió sacarosa como lioprotector debido a su uso previo en la industria farmacéutica. Se eligió la concentración de azúcar que daba lugar a una formulación isotónica tras la reconstitución. Finalmente, se añadió polisorbato 20 para evitar la formación de agregados insolubles.

TABLA 10

Formulación preliofilizada (relleno de 5,7 ml en un vial de 10 cc)	Formulación reconstituida (1,2 ml de alcohol bencílico al 0,9%)
rhuMAb E25 25 mg/ml	rhuMAb E25 100 mg/ml
Histidina 5 mM, pH 6,0	Histidina 20 mM, pH 6,0
Sacarosa 85 mM	Sacarosa 340 mM
Polisorbato 20 al 0,01%	Polisorbato 20 al 0,04%
	Alcohol bencílico al 0,9%

[0129] Las siguientes cláusulas numeradas, que describen aspectos de nuestras propuestas, son parte de la descripción.

- Formulación reconstituida isotónica estable que comprende una proteína en una cantidad de por lo menos aproximadamente 50 mg/ml y un diluyente, cuya formulación reconstituida se ha preparado a partir de una mezcla liofilizada de una proteína y un lioprotector, en la que la concentración de proteína en la formulación reconstituida es aproximadamente 2-40 veces mayor que la concentración de proteína en la mezcla antes de la liofilización.
- Formulación, según la cláusula 1, en la que el lioprotector es sacarosa o trehalosa.
- Formulación, según la cláusula 1, que comprende además un tampón.
- Formulación, según la cláusula 3, en la que el tampón es histidina o succinato.
- Formulación, según la cláusula 1, que comprende además un tensoactivo.
- Formulación reconstituida estable que comprende un anticuerpo en una cantidad de por lo menos aproximadamente 50 mg/ml y un diluyente, cuya formulación reconstituida se ha preparado a partir de una mezcla liofilizada de un anticuerpo y un lioprotector, en la que la concentración de anticuerpo en la formulación reconstituida es aproximadamente 2-40 veces mayor que la concentración de anticuerpo en la mezcla antes de la liofilización.
- Formulación, según la cláusula 6, en la que el anticuerpo es un anticuerpo anti-IgE o un anticuerpo anti-HER2.
- Formulación, según la cláusula 6, que es isotónica.
- Método para la preparación de una formulación reconstituida isotónica estable que comprende reconstituir una mezcla liofilizada de una proteína y un lioprotector en un diluyente, de manera que la concentración de proteína en la formulación reconstituida sea por lo menos 50 mg/ml, en el que la concentración de proteína en la formulación reconstituida es aproximadamente 2-40 veces mayor que la concentración de proteína en la mezcla antes de la liofilización.



10. Método para la preparación de una formulación, que comprende las etapas de:
- a. liofilizar una mezcla de una proteína y un lioprotector; y
  - b. reconstituir la mezcla liofilizada de la etapa (a) en un diluyente, de manera que la formulación reconstituida es isotónica y estable y tiene una concentración de proteínas de por lo menos aproximadamente 50 mg/ml.
- 5 11. Método, según la cláusula 10, en el que la concentración de proteína en la formulación reconstituida es de aproximadamente 80 mg/ml a aproximadamente 300 mg/ml.
12. Método, según la cláusula 10, en el que la concentración de proteína en la formulación reconstituida es aproximadamente 2-40 veces mayor que la concentración de proteína en la mezcla antes de la liofilización.
- 10 13. Método, según la cláusula 10, en el que la liofilización se realiza a una temperatura de almacenamiento mantenida a aproximadamente 15-30°C a lo largo de todo el proceso de liofilización.
14. Artículo de fabricación, que comprende:
- a. un recipiente que contiene una mezcla liofilizada de una proteína y un lioprotector; y
  - b. instrucciones para reconstituir la mezcla liofilizada con un diluyente hasta una concentración de proteína en la formulación reconstituida de por lo menos aproximadamente 50 mg/ml.
- 15 15. Artículo de fabricación, según la cláusula 14, que comprende además un segundo recipiente que contiene un diluyente.
16. Artículo de fabricación, según la cláusula 15, en el que el diluyente es agua bacteriostática para inyección (BWF1) que comprende un alcohol aromático.
- 20 17. Formulación que comprende una mezcla liofilizada de un lioprotector y un anticuerpo, en la que la proporción molar de lioprotector:anticuerpo es aproximadamente 100-1500 moles de lioprotector:1 mol de anticuerpo.
18. Utilización de la formulación, según la cláusula 1, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un mamífero que tiene un trastorno que requiere el tratamiento con la proteína en la formulación.
19. Utilización, según la cláusula 18, en la que la formulación es para administración subcutánea.
- 25 20. Formulación que comprende anticuerpo anti-HER2 en una cantidad de aproximadamente 5-40 mg/ml, sacarosa o trehalosa en una cantidad de aproximadamente 10-100 mM, un tampón y un tensoactivo.
21. Formulación, según la cláusula 20, que comprende además un agente de relleno.
22. Formulación, según la cláusula 20, que está liofilizada y es estable a 30°C durante por lo menos 6 meses.
- 30 23. Formulación, según la cláusula 20, que está reconstituida con un diluyente, de manera que la concentración de anticuerpo anti-HER2 en la formulación reconstituida es de aproximadamente 10-30 mg/ml, en la que la formulación reconstituida es estable a 2-8°C durante por lo menos aproximadamente 30 días.
24. Formulación que comprende anticuerpo anti-IgE en una cantidad de aproximadamente 5-40 mg/ml, sacarosa o trehalosa en una cantidad de aproximadamente 80-300 mM, un tampón y un tensoactivo.
- 35 25. Formulación, según la cláusula 24, que está liofilizada y es estable a aproximadamente 30°C durante por lo menos 1 año.

**REIVINDICACIONES**

5 1. Utilización de una formulación liofilizada que comprende un anticuerpo monoclonal y un lioprotector, en la que la proporción molar de lioprotector:anticuerpo es 200-600 moles de lioprotector:1 mol de anticuerpo, en la que el lioprotector es trehalosa, y en la que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-HER2, en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer **caracterizado por** la sobreexpresión del receptor HER2.

10 2. Formulación liofilizada que comprende un anticuerpo monoclonal y un lioprotector, en la que la proporción molar de lioprotector:anticuerpo es 200-600 moles de lioprotector:1 mol de anticuerpo, en la que el lioprotector es trehalosa, y en la que el anticuerpo monoclonal es un anticuerpo anti-HER2, para utilizar en un método para el tratamiento de un cáncer **caracterizado por** la sobreexpresión del receptor HER2, en la que la formulación está reconstituida con un diluyente antes de la administración a un paciente con necesidad de la misma.

15

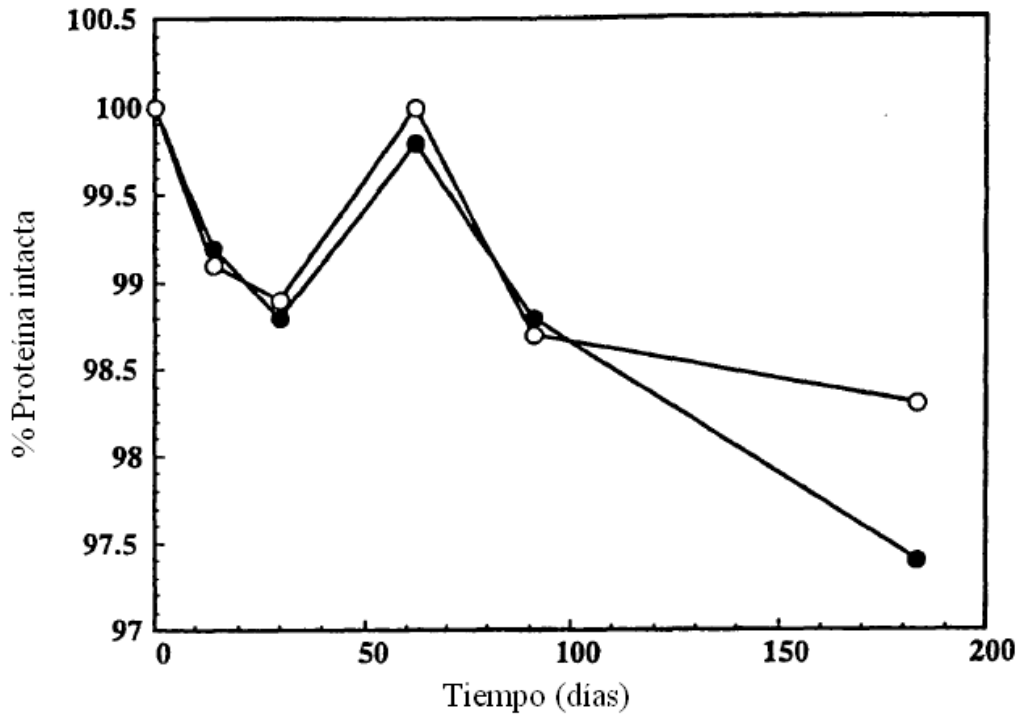


Figura 1

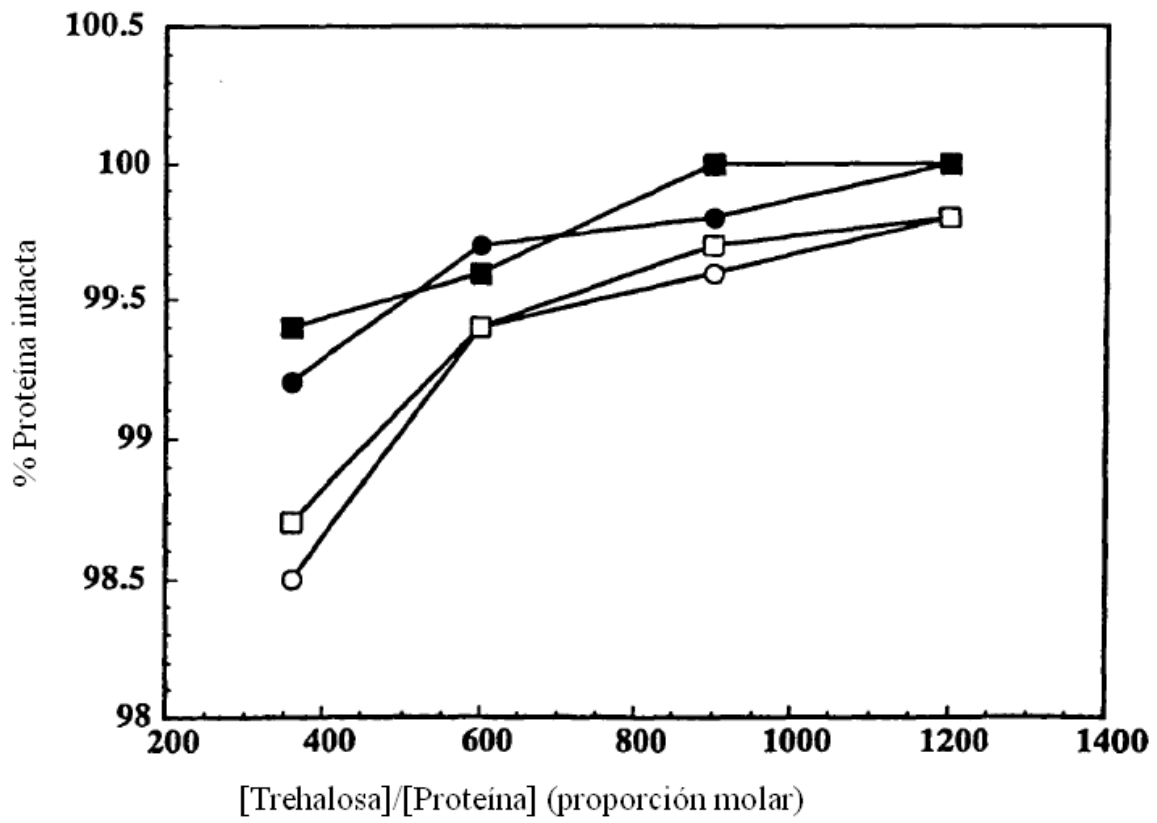


Figura 2

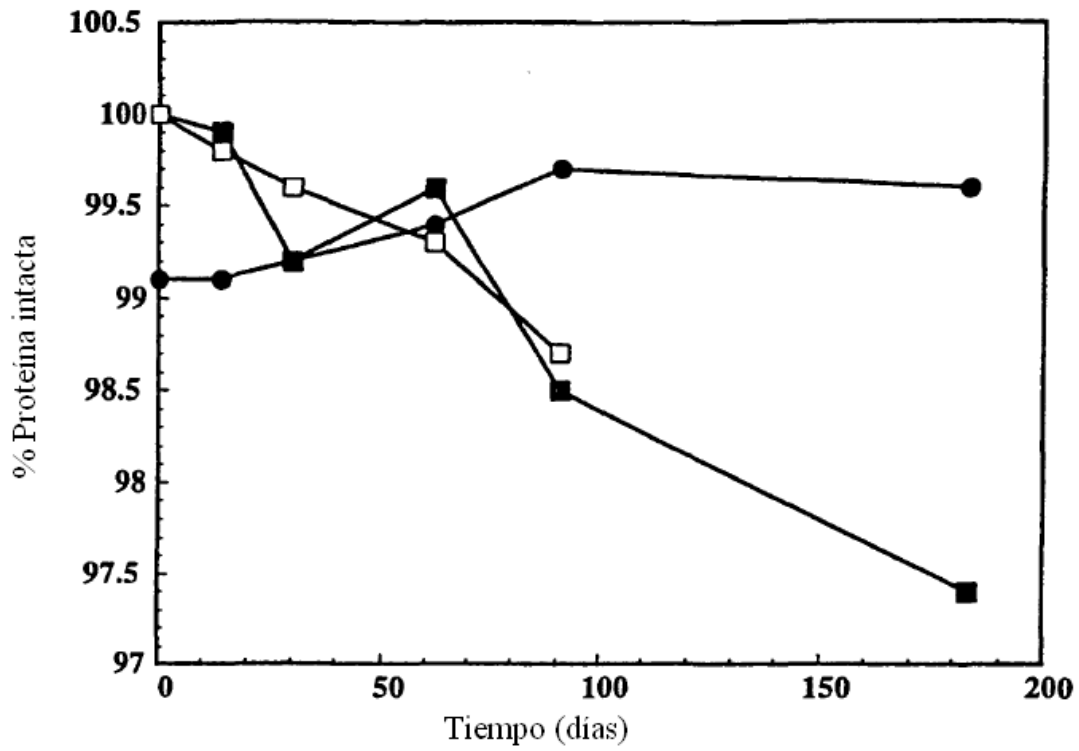


Figura 3

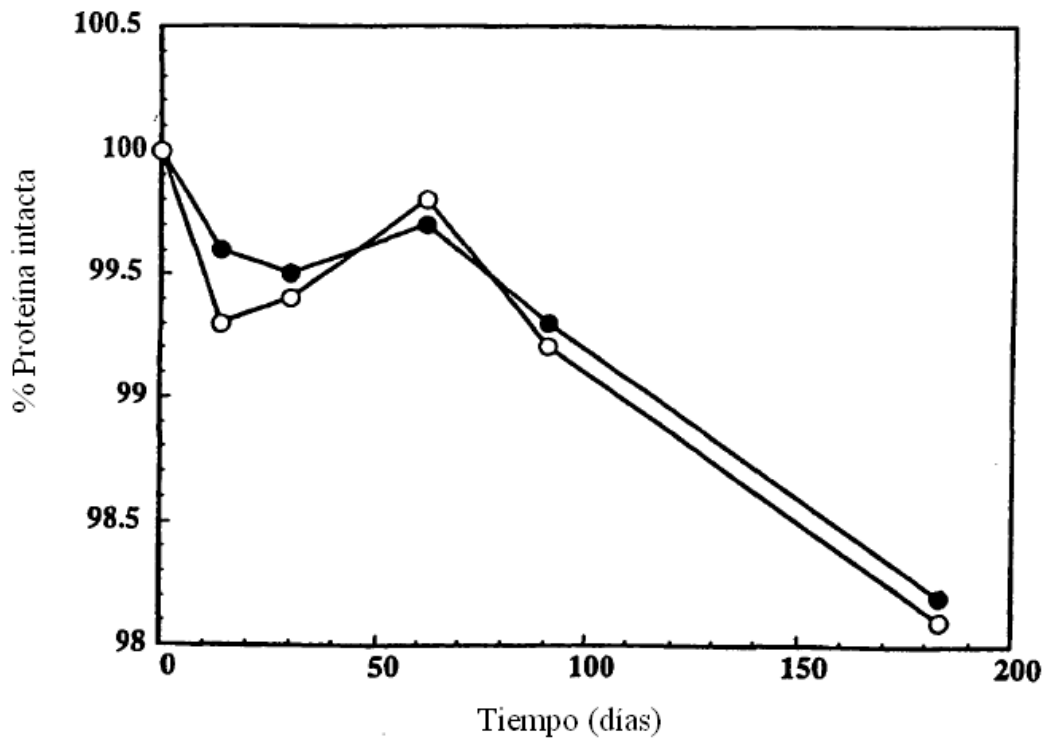


Figura 4

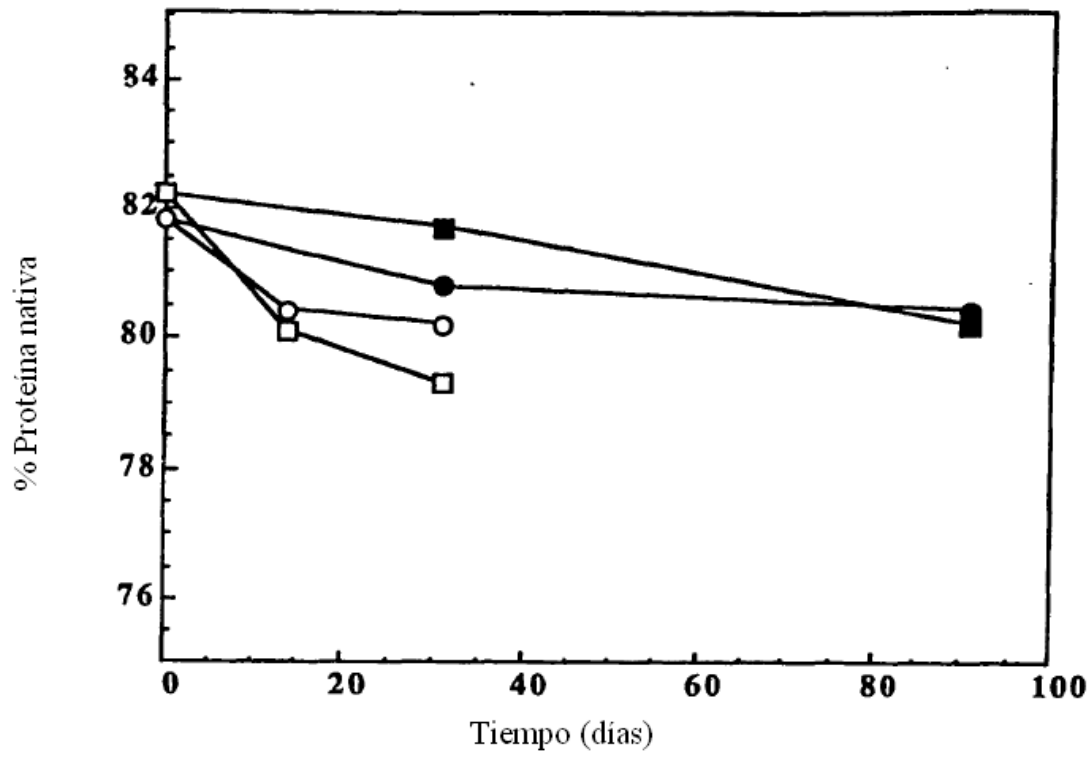


Figura 5

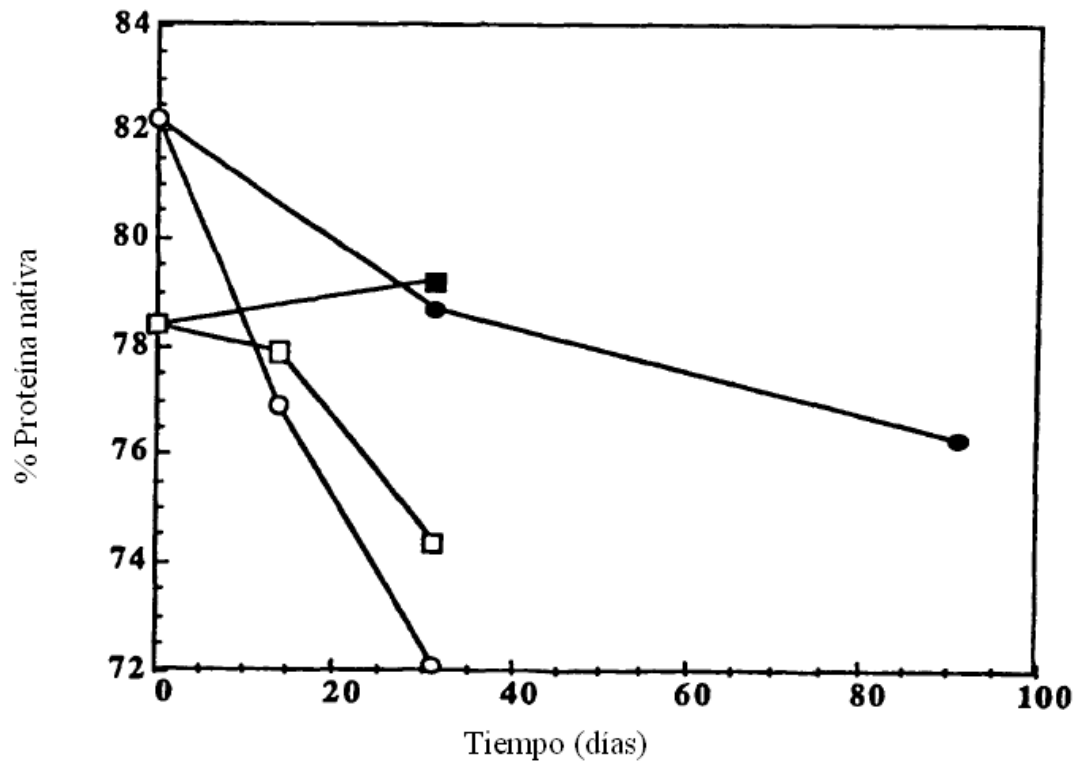


Figura 6

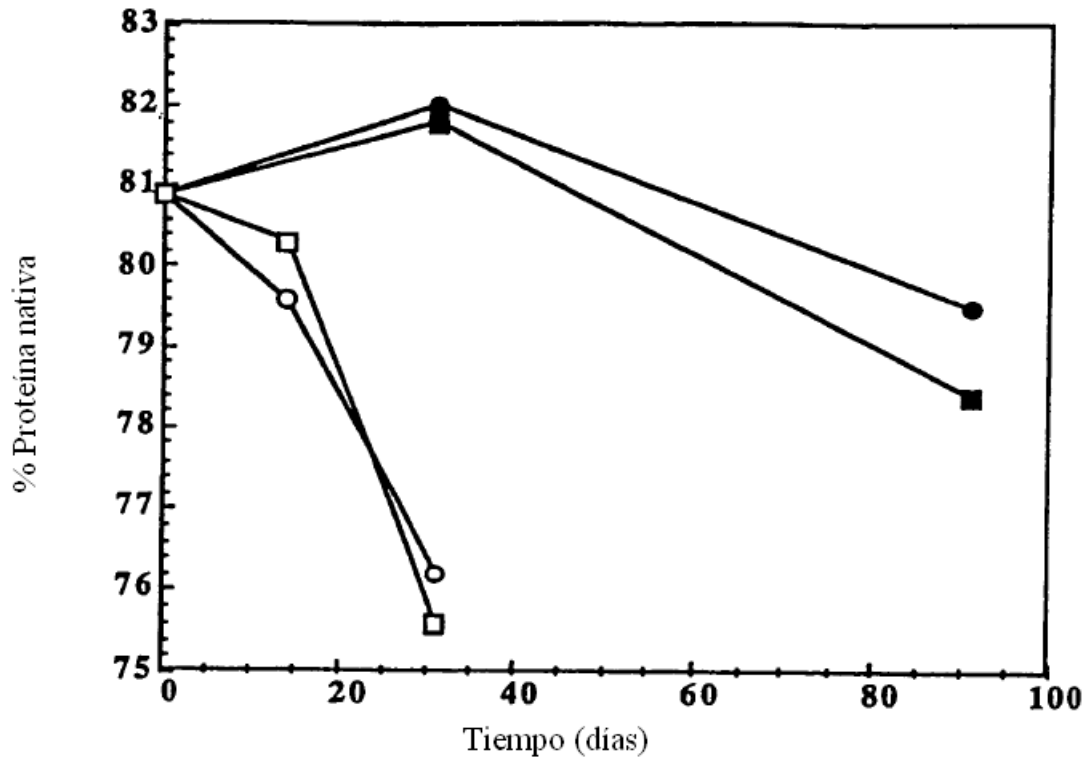


Figura 7

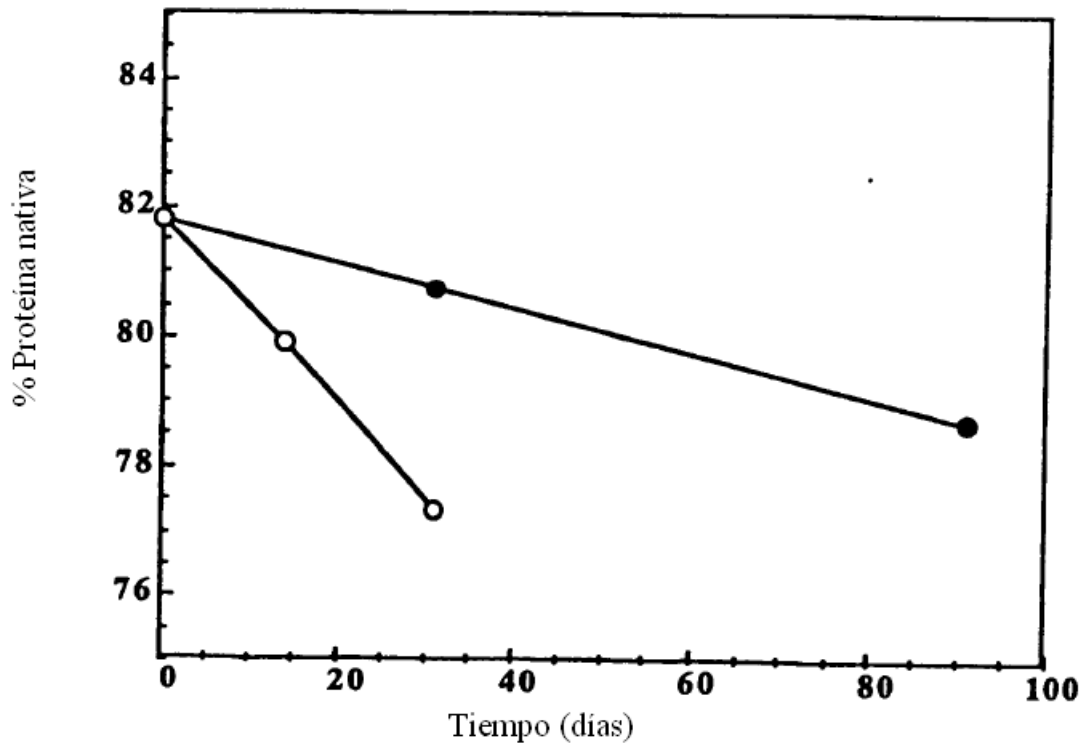


Figura 8

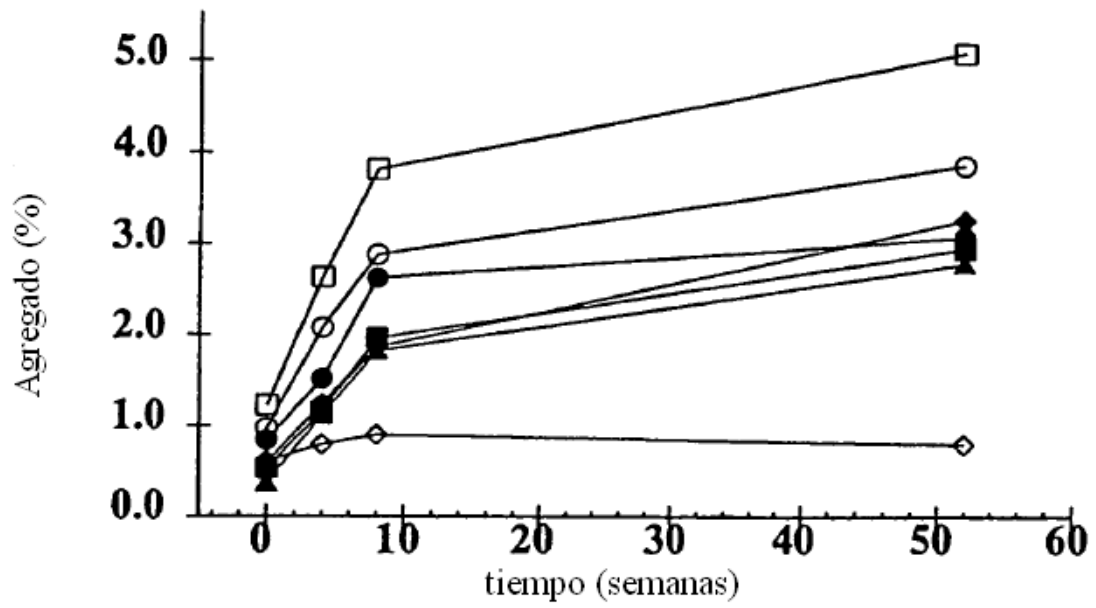


Figura 9

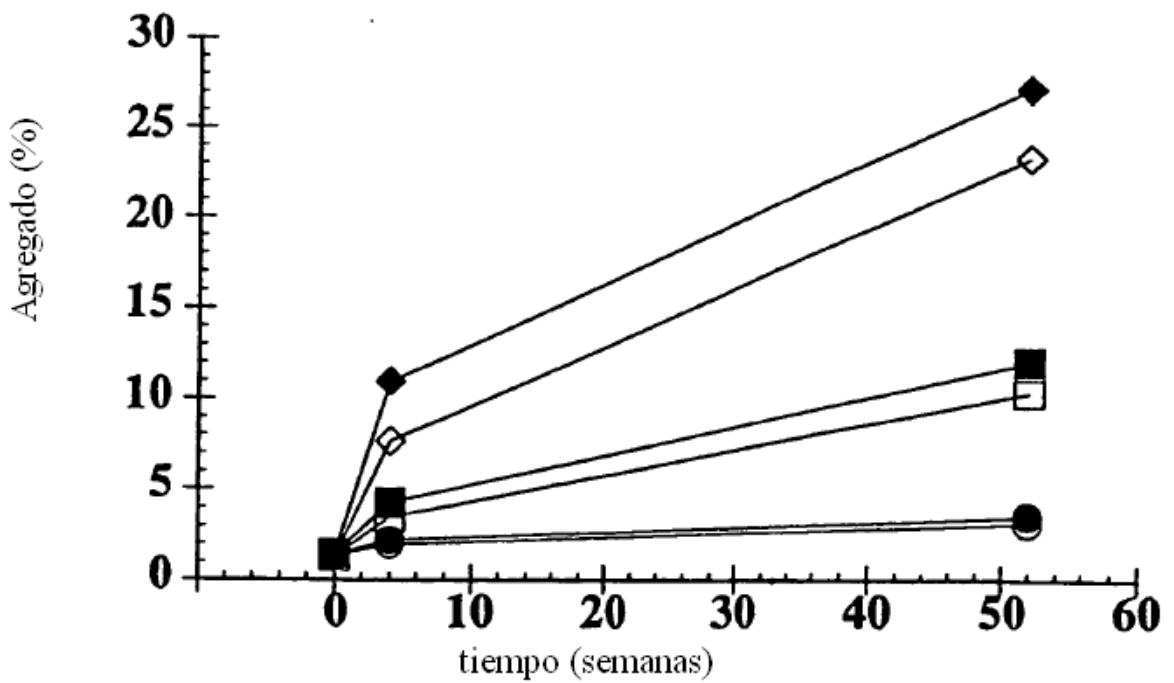


Figura 10

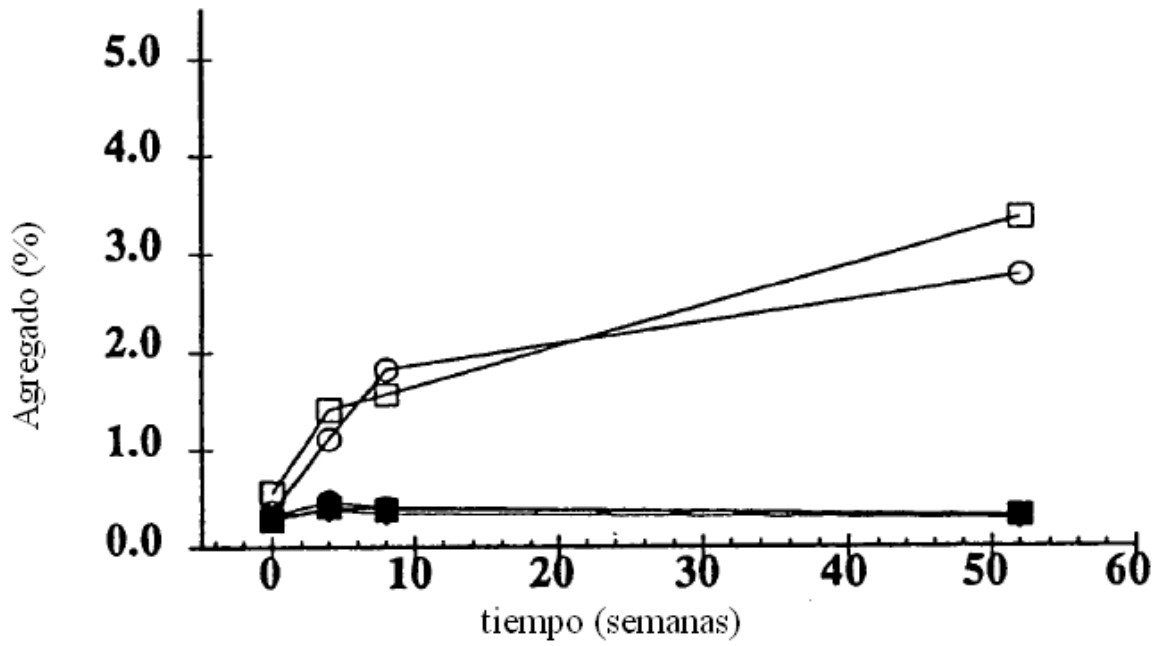


Figura 11

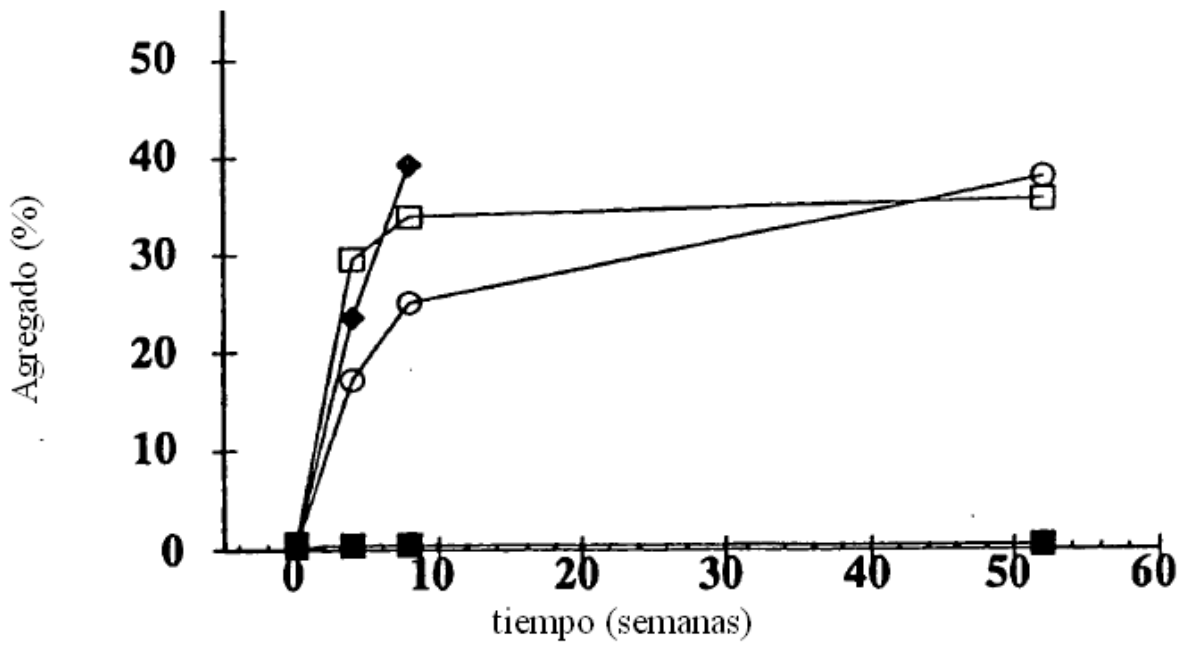


Figura 12



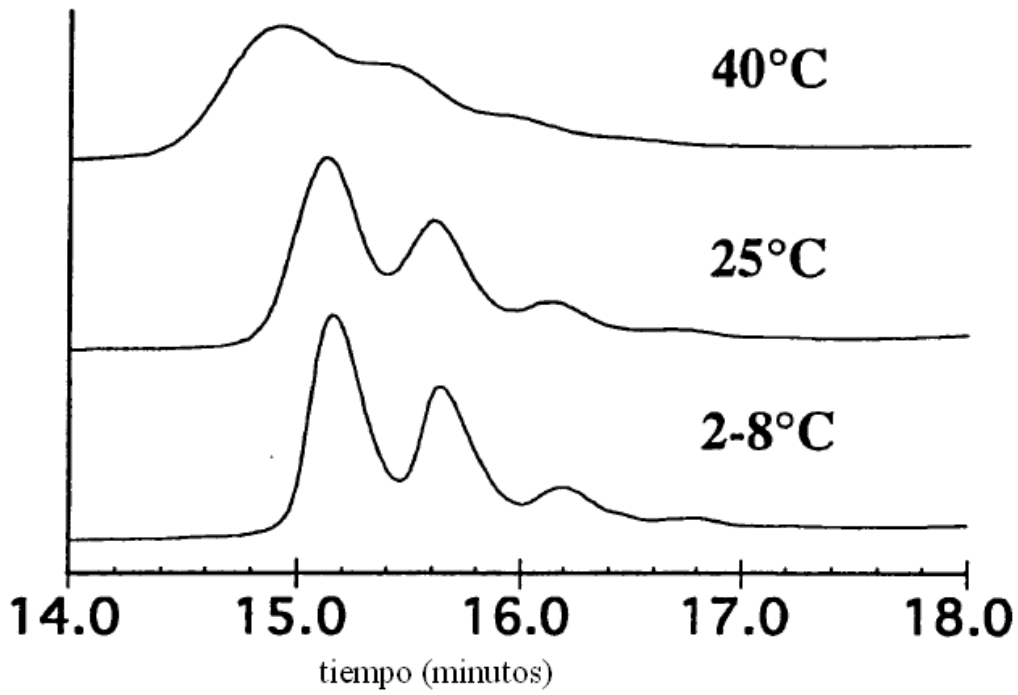


Figura 13

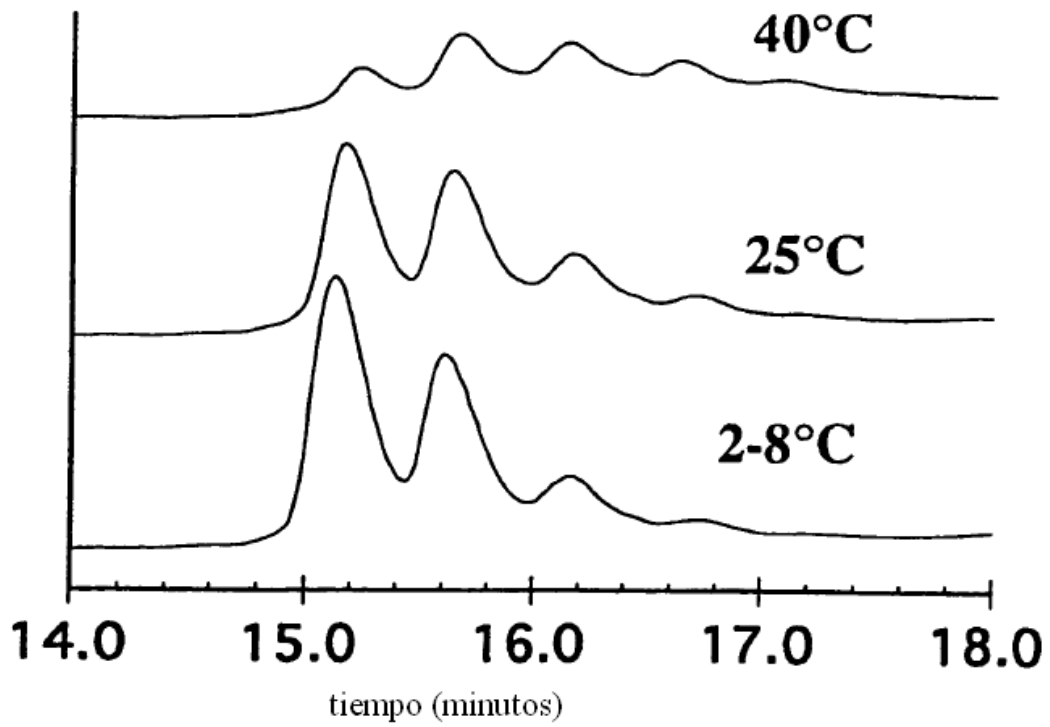


Figura 14

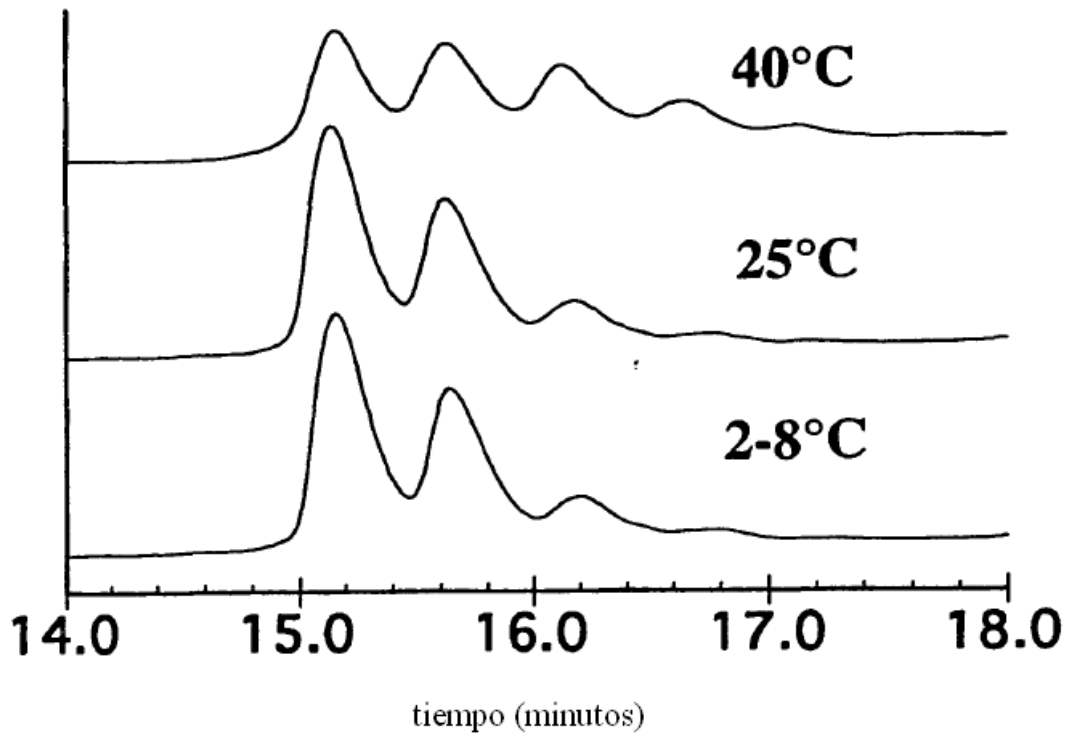


Figura 15

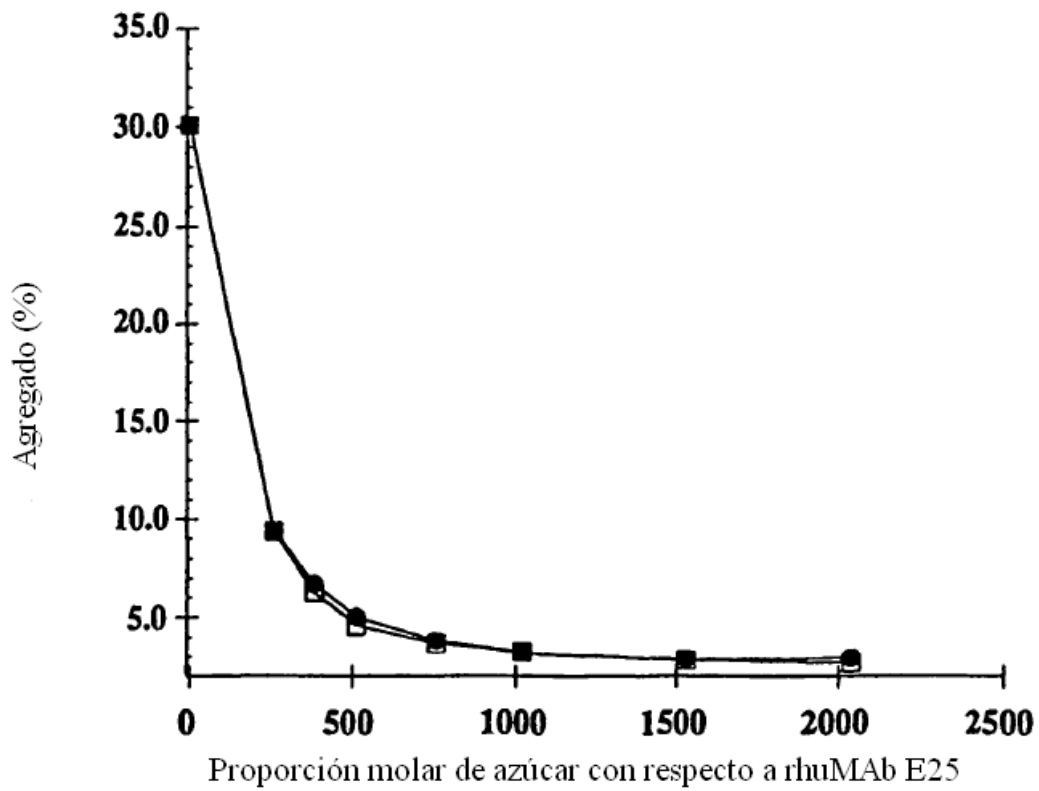


Figura 16

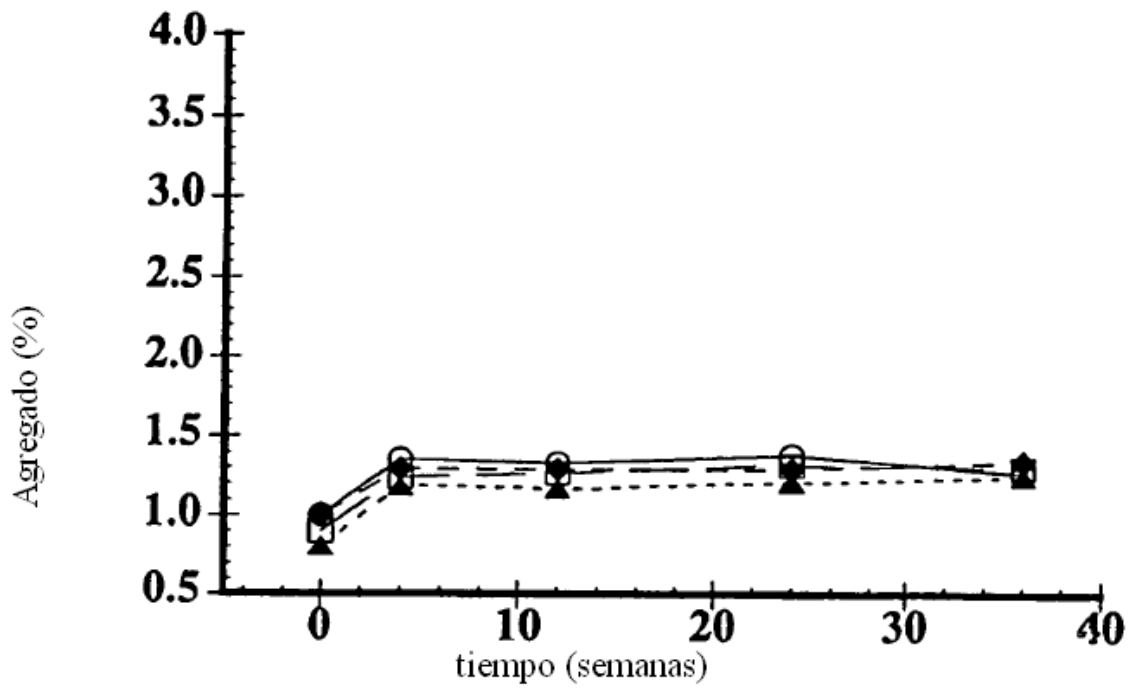


Figura 17

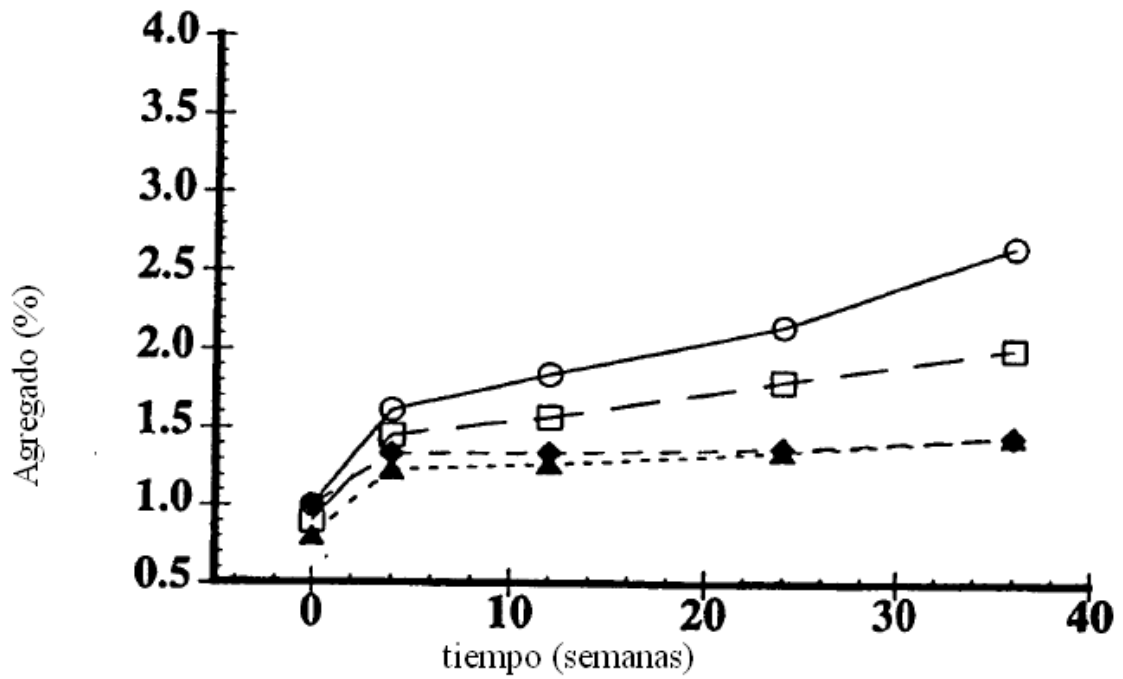


Figura 18

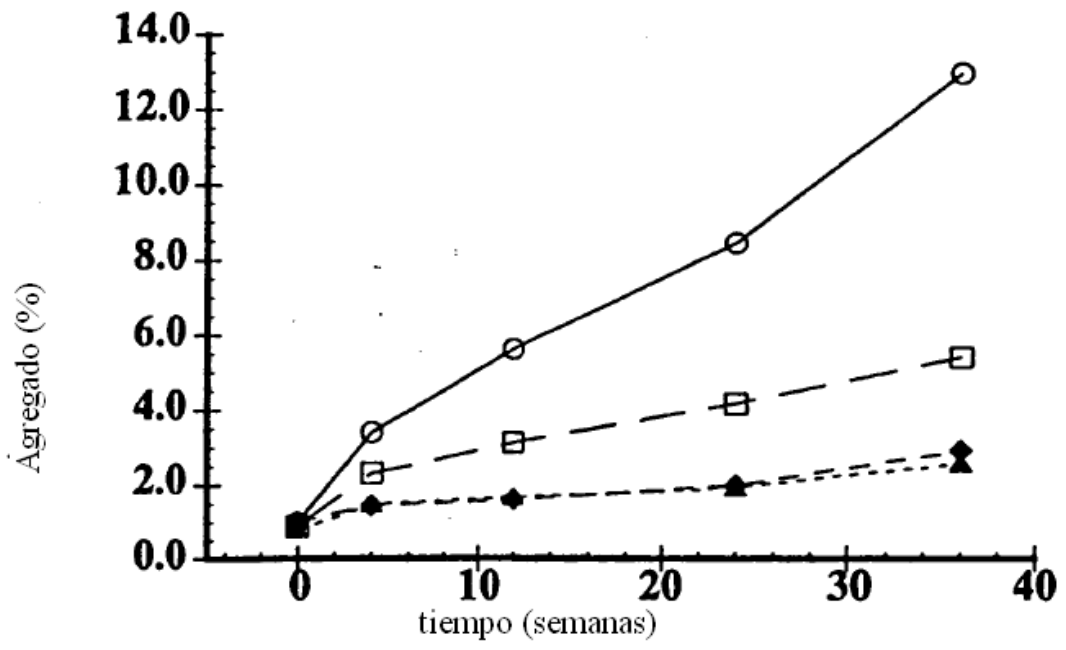


Figura 19