

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 477 996**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/16 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
C07K 16/06 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2001 E 01955698 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.06.2014 EP 1314437**

54 Título: **Preparaciones estabilizadas que contienen un anticuerpo**

30 Prioridad:

11.08.2000 US 224623 P
11.08.2000 US 224834 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
18.07.2014

73 Titular/es:

CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)
5-1, Ukima 5-chome, Kita-ku
Tokyo, 115-8543, JP

72 Inventor/es:

KAKUTA, MASAYA;
YAMAZAKI, TADAO;
HAYASAKA, AKIRA;
HAYASHI, YOSHIKI y
ARAKAWA, TSUTOMU

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 477 996 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

Preparaciones estabilizadas que contienen un anticuerpo

5 Campo de la invención

La presente invención "se relaciona" con las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones. Así, se relaciona con una preparación estabilizada que tiene un pH de 5,7-6,2 y que contiene un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado hPM-1 en un tampón de histidina, donde la concentración del tampón de histidina es de 5 mM-20 mM y la preparación está en forma de una formulación en solución.

Técnica antecedente

Se suministran al mercado una serie de preparaciones inyectables que contienen proteínas, en donde se adoptan diversas medidas para proporcionar preparaciones estabilizadas que contienen proteínas con poca pérdida de principios activos incluso después de un almacenamiento a largo plazo. Las preparaciones que contienen proteínas son preparadas disolviendo los principios activos y diversos aditivos, tales como diluyentes, solubilizadores, excipientes, agentes calmantes, agentes tamponantes, agentes reductores que contienen azufre, antioxidantes, estabilizadores, surfactantes, etc. en un tampón.

Un problema generalmente asociado al almacenamiento de proteínas como soluciones concentradas es su deterioro, como ejemplifica la formación de agregados insolubles y que se ha de prevenir.

Por ejemplo, los anticuerpos, tales como inmunoglobulinas, anticuerpos monoclonales y anticuerpos humanizados, son proteínas inestables susceptibles a cambios físicos o químicos, tales como asociación o agregación bajo estreses de filtración, concentración y calentamiento para eliminar virus durante el proceso de purificación.

Un método convencional ampliamente utilizado para inhibir el deterioro de proteínas y almacenarlas de manera estable es la estabilización mediante liofilización. Sin embargo, era necesario añadir algún agente para proteger frente a la congelación y evitar la desnaturalización o los cambios químicos que podrían estar causados por estreses mecánicos durante la congelación y la liofilización.

Se vio un efecto de estabilización añadiendo como estabilizador para inhibir los cambios químicos o físicos polímeros o polioles, incluyendo proteínas, tales como seroalbúmina humana o gelatina purificada, u oligómeros, tales como aminoácidos, y surfactantes. Sin embargo, la adición de biopolímeros, tales como proteínas, como estabilizadores presentaba problemas, tales como la necesidad de una etapa muy compleja para eliminar contaminantes, tales como virus, derivados de los estabilizadores. Más aún, los tratamientos térmicos para inactivar virus a veces causaban problemas, tales como asociación o agregación, debido a estreses térmicos.

El receptor de interleuquina-6 (IL-6) es una proteína de unión a ligando que tiene un peso molecular de aproximadamente 80 KD a la que se une la IL-6. Se vio que los anticuerpos anti-receptores de IL-6 tienen un efecto terapéutico sobre diversas enfermedades mediadas por IL-6, tales como trastornos inmunes, enfermedades inflamatorias o tumores linfocíticos, por bloqueo de la transducción de señal de la IL-6 en células de mieloma inmaduras para inhibir las actividades biológicas de la IL-6 (Tsunenari, T. y col., Blood, 90: 2437, 1997; Tsunenari T. y col., Anticancer Res. 16: 2537, 1996). También vimos que los anticuerpos anti-receptores de IL-6 tienen un efecto terapéutico sobre las células de mieloma inmaduras (JP-A-8-099902).

Conseguimos producir en masa un anticuerpo humanizado remodelado, hPM-1, como uno de tales anticuerpos anti-receptores de IL-6 y hemos intentado formular este anticuerpo anti-receptor de IL-6 purificado en preparaciones farmacéuticas.

De forma similar a otras preparaciones proteicas, un factor importante para la formulación de anticuerpos anti-IL-6R es la estabilidad química y física. Especialmente, los anticuerpos anti-receptor de IL-6 humanizados son proteínas inestables susceptibles de cambios físicos o químicos, tales como asociación o agregación bajo estreses de filtración, concentración y calentamiento para la eliminación de virus durante el proceso de purificación.

Por lo tanto, existe una demanda en cuanto al desarrollo y la comercialización de preparaciones que contengan un anticuerpo, especialmente un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado, que sean estables incluso después de un almacenamiento a largo plazo.

Como para diversas proteínas fisiológicamente activas, es también necesario establecer condiciones de preparación y condiciones de almacenamiento para mantener sus estructuras y actividades con objeto de suministrarlas como productos farmacéuticos en una cantidad constante y con una gran calidad. Especialmente, sería deseable desarrollar un método para inhibir la formación de agregados insolubles en soluciones de proteínas.

Divulgación de la invención

Como resultado de cuidadosos estudios para conseguir los anteriores objetos, logramos la presente invención en base al descubrimiento de que la agregación inducida por calor es controlada formulando un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado en un tampón de glicina y/o un tampón de histidina y de que dichas formulaciones son además estabilizadas añadiendo glicina y/o sacarosa.

También logramos la presente invención en base al descubrimiento de que se puede reducir la agregación y se puede aumentar el efecto de estabilización ajustando el pH con un aminoácido básico o un derivado de aminoácido básico o una sal del mismo.

Por consiguiente, la presente invención proporciona:

- (1) una preparación estabilizada que contiene un anticuerpo en un tampón de histidina como se caracteriza aún más en la reivindicación 1;
- (2) la preparación estabilizada como se define en el punto (1) anterior que contiene glicina y/o sacarosa como agente isotonzante;
- (3) la preparación estabilizada como se define en el punto (2) anterior que contiene glicina 0,05-1 M y/o sacarosa;
- (4) la preparación estabilizada como se define en cualquiera de los puntos (1) a (3) anteriores, que no contiene NaCl como agente isotonzante;
- (5) un método para estabilizar una preparación de anticuerpo que contiene un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado, hPM-1, cuyo método comprende la incorporación del anticuerpo en un tampón de histidina, donde la concentración del tampón de histidina es de 5 mM - 20 mM y la preparación está en forma de una formulación en solución;
- (6) el método como se define en el punto (5) anterior, que comprende la incorporación de glicina y/o sacarosa como agente isotonzante.

Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra los resultados de la electroforesis en gel nativa que muestran agregación cuando se trató por calor el anticuerpo hPM-1 disuelto en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,5, a 75°C (electroforetograma). La FIG. 2 muestra los resultados de la electroforesis en gel nativa que muestran el efecto del tipo de tampón sobre la agregación (electroforetograma).

La FIG. 3 muestra los resultados de la electroforesis en gel nativa que muestran el efecto de la adición de NaCl 50 mM a los tampones y del calentamiento sobre la agregación (electroforetograma). La FIG. 4 muestra la distribución del coeficiente de sedimentación $g(s^*)$, obtenida por DCDT y análisis de un anticuerpo hPM-1 control en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M.

La FIG. 5 muestra la distribución del coeficiente de sedimentación $g(s^*)$, mostrando el efecto del tipo de tampón sobre la agregación.

La FIG. 6 muestra los resultados de la electroforesis en gel nativa que muestran el efecto de la glicina y de la sacarosa sobre la agregación (electroforetograma).

La FIG. 7 muestra los resultados del análisis en gel nativo de seis muestras (muestras 1 a 6) antes y después de calentar (electroforetograma).

La FIG. 8 muestra los resultados del análisis en gel nativo de las muestras 6-1, 6-2, 6-3 y 6-4 antes y después de calentar (electroforetograma).

La FIG. 9 muestra los resultados del análisis en gel nativo en donde se compararon las muestras 6-1 y 6-2 a varias concentraciones de histidina (electroforetograma).

La FIG. 10 muestra los resultados del análisis en gel nativo en donde se compararon la muestra 6-1, pH 6,5, la muestra 6-2, pH 6,0, y la muestra 6-3, pH 6,5, a varias concentraciones de histidina (electroforetograma).

La FIG. 11 muestra los resultados del análisis en gel nativo en donde se comparó el efecto de la histidina entre dos muestras a pH 6,0, es decir, las muestras 6-2 y 6-5 (electroforetograma).

La FIG. 12 muestra los resultados del análisis en gel nativo en donde se compararon la muestra 6-1 (fosfato/Na 5 mM, pH 6,5), la muestra 6-2 (fosfato/His 5 mM, pH 6,0) y la muestra 6-5 (fosfato/Na 5 mM, pH 6,0) (electroforetograma).

La FIG. 13 muestra los resultados del análisis en gel nativo en donde se compararon el efecto de la sacarosa (50-200 mM) añadida a la muestra 6-2 y el efecto de la glicina (50-200 mM) añadida a la muestra 6-5 (electroforetograma).

La FIG. 14 muestra los resultados del análisis en gel nativo en donde se comparó el efecto de la glicina o de la sacarosa 200 mM en dos muestras a pH 6,0 (muestras 6-2 y 6-5) (electroforetograma).

Las realizaciones más preferidas de la invención

Los anticuerpos usados en las preparaciones estabilizadas de la presente invención se basan en anticuerpos monoclonales, los cuales pueden ser preparados por cualquier procedimiento. Los anticuerpos monoclonales pueden ser básicamente contruidos por técnicas conocidas como se indica a continuación. Se inmuniza a un

huésped adecuado con un antígeno inmunizante según una técnica de inmunización estándar y se fusionan las células inmunizadas resultantes con células parentales conocidas mediante una técnica de fusión celular estándar, y luego se criban las células fusionadas en cuanto a células productoras de anticuerpos monoclonales por un método de cribado estándar.

5 Estudiamos la estabilidad térmica del anticuerpo hPM-1 disuelto en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,5, para descubrir que apenas se producía agregación incluso después de una incubación prolongada a 70°C o menos. Se formaron luego agregados cuando se trató con calor el anticuerpo hPM-1 a 75°C. Este resultado muestra que la agregación es inducida en el anticuerpo hPM-1 sólo después de haber pasado una transición térmica caracterizada por un punto de fusión de 72°C. Al aumentar el período de incubación, aumentaba la intensidad de la banda de agregados y prácticamente se perdía el contenido en monómeros después de 60 minutos. Estos agregados parecían ser no covalentes, ya que se disociaban en presencia de dodecilsulfato de sodio.

15 Tras examinar diversos factores que contribuyen a la inhibición de esta agregación inducida por calor, vimos que se puede controlar la agregación disolviendo un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado en un tampón de glicina y/o un tampón de histidina.

20 Por lo tanto, se pueden preparar las preparaciones estabilizadas de la presente invención por el método caracterizado en las reivindicaciones.

El tampón de glicina y el tampón de histidina pueden ser usados solos o en combinación en una concentración total dentro del rango anterior.

25 Las preparaciones estabilizadas de la presente invención pueden ser preparaciones más estables con menos agregación mediante la adición de glicina y/o sacarosa como agente isotonzante. La cantidad de glicina y/o sacarosa que se ha de añadir es de 0,05-1 M. Las preparaciones de la presente invención están preferiblemente libres de NaCl, ya que el efecto reductor de la agregación de la glicina y/o de la sacarosa disminuye por la adición de NaCl.

30 Las preparaciones estabilizadas de la presente invención pueden ser preparaciones más estables con menos agregación mediante la adición de más glicina y/o sacarosa. La cantidad de glicina y/o sacarosa que se ha de añadir es preferiblemente de 0,05-1 M.

35 Las preparaciones de la presente invención pueden además contener agentes isotonzantes, v.g., polietilenglicol, y azúcares, tales como dextrano, manitol, sorbitol, inositol, glucosa, fructosa, lactosa, xilosa, manosa, maltosa y rafinosa.

Las preparaciones estabilizadas de la presente invención pueden además contener surfactantes. Como ejemplos típicos de surfactantes, se incluyen:

40 surfactantes no iónicos, v.g., ésteres de sorbitán y ácidos grasos, tales como monocaprilato de sorbitán, monolaurato de sorbitán y monopalmitato de sorbitán; ésteres de glicerina y ácidos grasos, tales como monocaprilato de glicerina, monomiristato de glicerina y monoestearato de glicerina; ésteres de poliglicerina y ácidos grasos, tales como monoestearato de decaglicerilo, diestearato de decaglicerilo y monolinoleato de decaglicerilo; ésteres de polioxietilensorbitán y ácidos grasos, tales como monolaurato de polioxietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, monoestearato de polioxietilensorbitán, monopalmitato de polioxietilensorbitán, trioleato de polioxietilensorbitán y triestearato de polioxietilensorbitán; ésteres de polioxietilensorbitol y ácidos grasos, tales como tetraestearato de polioxietilensorbitol y tetraoleato de polioxietilensorbitol; ésteres de polioxietilenglicerina y ácidos grasos, tales como monoestearato de polioxietilenglicerilo; ésteres de polietilenglicol y ácidos grasos, tales como diestearato de polietilenglicol; polioxietilén alquil éteres, tales como polioxietilén lauril éter; polioxietilén polioxipropilén alquil éteres, tales como polioxietilén polioxipropilén glicol éter, polioxietilén polioxipropilén propil éter y polioxietilén polioxipropilén cetil éter; polioxietilén alquil fenil éteres, tales como polioxietilén nonil fenil éter; aceites de ricino endurecidos polioxietilenados, tales como aceite de ricino polioxietilenado y aceite de ricino endurecido polioxietilenado (aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado); derivados de cera de abejas polioxietilenados, tales como cera de abejas polioxietilensorbitol; derivados de lanolina polioxietilenados, tales como polioxietilenlanolina; amidas de ácidos grasos polioxietilenados, tales como la amida del ácido esteárico polioxietilenada con un HLB de 6-18; surfactantes aniónicos, v.g., alquilsulfatos que tienen un grupo alquilo C10-18, tales como cetilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio y oleilsulfato de sodio; polioxietilén alquil éter sulfatos que tienen un número medio de moles de óxido de etileno de 2-4 y un grupo alquilo C10-18, tales como polioxietilenlaurilsulfato de sodio; sales de ésteres de ácidos alquilsulfosuccínicos que tienen un grupo alquilo C8-18, tales como laurilsulfosuccinato de sodio; y surfactantes naturales, v.g., lecitina, glicerofosfolípidos, esfingofosfolípidos, tales como esfingomielina, y ésteres de sacarosa y ácidos grasos de ácidos grasos C12-18. Se pueden añadir uno o más de estos surfactantes en combinación a las preparaciones de la presente invención.

65

Las preparaciones estabilizadas de la presente invención pueden además contener diluyentes, agentes solubilizantes, excipientes, modificadores del pH, agentes calmantes, agentes tamponantes, agentes reductores que contienen azufre, antioxidantes o similares, si se desea. Por ejemplo, como agentes reductores que contienen azufre, se incluyen N-acetilcisteína, N-acetilhomocisteína, ácido tióctico, tioglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico y sus sales, tiosulfato de sodio, glutatión y compuestos que contienen sulfhidrilo, tales como ácido tioalcanoico de 1 a 7 átomos de carbono. Como antioxidantes, se incluyen ácido eritórico, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, α -tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico y sus sales, palmitato de L-ascorbilo, estearato de L-ascorbilo, bisulfito de sodio, sulfito de sodio, galato de triamilo, galato de propilo o agentes quelantes, tales como etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA), pirofosfato de sodio y metafosfato de sodio. También pueden estar contenidos otros componentes comúnmente añadidos, v.g., sales inorgánicas, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, fosfato de sodio, fosfato de potasio y bicarbonato de sodio, y sales orgánicas, tales como citrato de sodio, citrato de potasio y acetato de sodio.

Las preparaciones estabilizadas de la presente invención son normalmente administradas por vías parenterales, tales como inyección (v.g., inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal), o por administración percutánea, mucosal, nasal o pulmonar, pero también pueden ser administradas por vía oral.

Las preparaciones estabilizadas de la presente invención pueden también estar en forma de formulaciones en solución o de formulaciones liofilizadas para ser reconstituidas en solución antes de su uso. Como excipientes adecuados para la liofilización, se incluyen alcoholes de azúcares o azúcares, tales como manitol o glucosa. La cantidad de anticuerpos hPM-1 contenida en las preparaciones de la presente invención depende del tipo de la enfermedad que haya de ser tratada, de la gravedad de la enfermedad, de la edad del paciente y de otros factores, pero generalmente varía de 0,1 a 200 mg/ml, preferiblemente de 1 a 120 mg/ml, expresada como concentración final.

Aplicabilidad industrial

Como se muestra en los ejemplos que se dan a continuación, se demostró que se puede controlar la agregación inducida por calor con las preparaciones estabilizadas de la presente invención formuladas en un tampón de histidina como se caracteriza en las reivindicaciones, y que se puede reducir aún más la agregación añadiendo glicina y/o sacarosa.

Los siguientes ejemplos dan una mayor ilustración de la presente invención sin, no obstante, limitar el alcance de la invención a los mismos. Los expertos en la técnica pueden hacer diversos cambios y modificaciones en base a la descripción de la invención, y dichos cambios y modificaciones quedan también incluidos en la presente invención.

Ejemplos

Métodos de ensayo

(1) Materiales

Se usó el anticuerpo hPM-1 como anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado. El anticuerpo hPM-1 es un anticuerpo humanizado preparado según el protocolo descrito en el Ejemplo de referencia 2 de JP-A-8-099902 usando el promotor del factor de elongación humano I α descrito en el Ejemplo 10 de la Publicación Internacional N° WO92/19759. Se purificó el anticuerpo hPM-1 a través de una columna de proteína A y se guardó en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,5.

(2) Determinación de las concentraciones de proteína

Se calcularon las concentraciones de proteína a partir de las absorbancias medidas a 280 nm con un espectrofotómetro (DU-600, Beckman-Coulter) usando coeficientes de extinción por mg/ml (calculados a partir de la secuencia de aminoácidos).

(3) Velocidad de sedimentación

La velocidad de sedimentación determinada por ultracentrifugación analítica es una excelente herramienta para detectar cambios menores en la agregación proteica. Este método puede detectar la agregación a nivel de aproximadamente un 1% en peso.

Se diluyeron todas las muestras con diversos tampones formulados a aproximadamente 0,5 mg/ml inmediatamente antes del análisis y se escanearon en cuanto a agregados muy grandes sedimentados por centrifugación a una baja velocidad del rotor de 3.000 rpm usando una ultracentrífuga analítica Beckman XLA a 20°C. Se sedimentaron luego el monómero y pequeños oligómeros a una velocidad del rotor de 45.000 rpm.

Se analizaron los datos mediante el programa DCDT+ desarrollado por John Philo usando el método dc/dt (Stafford, Anal. Biochem. 203: 295-230, 1992). En algunos casos, se usó el programa SVEDBERG (también desarrollado por John Philo).

5 (4) Electroforesis en gel nativa

Se analizó la agregación proteica por electroforesis en gel nativa en ausencia de SDS. En este método, la movilidad de las proteínas depende tanto del tamaño hidrodinámico como del estado de carga. La electroforesis en gel nativa permite detectar agregados proteicos no covalentes en ausencia de SDS. Desarrollamos un protocolo para el análisis en gel nativo del anticuerpo hPM-1, ya que el anticuerpo hPM-1 es una proteína básica para la cual no se puede aplicar la polaridad ordinaria en sistemas tampón de Tris-glicina normales o en electroforesis en gel de SDS.

Se realizó la electroforesis en gel nativa en un gel de Tris-acetato Novex NuPAGE al 7% (comprado a Novex). El tampón de electrodo utilizado era β -alanina 80 mM/AcOH 40 mM, pH 4,4, o histidina 30 mM/MES 30 mM, pH 6,1. El anticuerpo hPM-1 estaba positivamente cargado a pH 6,1, y se le sometió a electroforesis en una dirección del ánodo al cátodo. Se mezclaron las muestras con un exceso cinco veces mayor del tampón de electrodo que contenía sacarosa y verde de metilo.

20 Ejemplo 1: Estabilidad térmica del anticuerpo hPM-1

Se estudió el anticuerpo hPM-1 disuelto en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,5, en cuanto a estabilidad térmica. La Fig. 1 muestra los resultados de la electroforesis en gel nativa antes y después del tratamiento térmico a 75°C durante 5-60 minutos.

En la Fig. 1, aparece una sola banda antes del tratamiento térmico, para mostrar que la proteína purificada es muy homogénea en cuanto a estado de carga y tamaño. La velocidad de sedimentación de la misma muestra era constante, para mostrar que es una especie monomérica. Después de calentar a 75°C durante 5 minutos, se observó una banda correspondiente a agregados. Al aumentar el período de incubación, aumentó la intensidad de la banda de agregados y se perdió prácticamente el contenido monomérico después de 60 minutos. Estos agregados parecían ser no covalentes, ya que se disociaban en presencia de dodecilsulfato de sodio.

Ejemplo 2: Efecto del tipo de tampón sobre la agregación

Se usaron cinco tampones (todos 19 mM) para examinar su efecto sobre la agregación. Los pH de las muestras preparadas disolviendo una preparación de anticuerpo hPM-1 en estos tampones (a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml) son como se indica a continuación.

- 1) fosfato de sodio (pH 6,8)
- 2) histidina-HCl (pH 7,1)
- 3) citrato de sodio (pH 6,7)
- 4) Tris-HCl (pH 7,2)
- 5) glicina (pH 7,6).

Se calentaron estas muestras a 75°C durante 60 minutos y se las sometió a análisis en gel nativo. La Fig. 2 muestra los resultados antes y después del calentamiento. El contenido monomérico era el más alto, para dar la menor cantidad de agregación en glicina, y disminuía en el orden histidina-HCl, Tris-HCl, fosfato de sodio y citrato de sodio. Se observaron muy pocos agregados en glicina.

Cuando se añadió NaCl 50 mM a estos tampones, la agregación tras el calentamiento aumentó en gran medida en cualquiera de los tampones (Fig. 3).

Ejemplo 3: Efecto del tipo de tampón sobre la distribución de sedimentación

Con objeto de examinar la naturaleza de la agregación inducida por calor en estos tampones, se realizó entonces una prueba de sedimentación. La Fig. 4 muestra la distribución del coeficiente de sedimentación $g(s^*)$ obtenida gracias al análisis dc/dt de un anticuerpo hPM-1 control en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M. Se ve que esta muestra es una sola especie que tiene un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 6,2 svedbergs (S). La Fig. 5 muestra el perfil de sedimentación de una muestra de preparación que contiene anticuerpo hPM-1 disuelta en los cinco tampones mostrados en el Ejemplo 2 y calentada a 75°C durante 60 minutos. Se observaron una considerable agregación y pérdida de especies monoméricas en los tampones distintos de la glicina 19 mM, pH 7,6. La pérdida monomérica era mayor en el citrato de sodio, seguido del fosfato de sodio, del Tris-HCl, de la histidina-HCl y de la glicina en orden descendente. Se observó una amplia distribución que representaba la existencia de agregados en fosfato, citrato y Tris, que se extendían a 40 S o más y tenían un pico a aproximadamente 15-18 S. Los agregados observados en histidina no fueron observados a aproximadamente 25 S o más y tenían un pico a aproximadamente 10 S. Estos resultados concuerdan con los resultados del análisis en gel nativo sobre las preparaciones después del tratamiento térmico descrito en el Ejemplo 2.

Ejemplo 4: Efecto de la glicina y de la sacarosa

Este ejemplo se relaciona con la evaluación del efecto de la glicina o de la sacarosa sobre la agregación al utilizarlas en lugar de NaCl. Se dializaron muestras de anticuerpo hPM-1 disueltas en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,5, frente a fosfato de sodio 19 mM, pH 6,5, que contenía glicina 0,2 M o sacarosa 0,2 M. Se calentaron estas muestras a 75°C durante 20-60 minutos en paralelo. La Fig. 6 muestra los resultados de la electroforesis en gel nativa. Comparando las bandas de monómeros, el contenido en monómeros era inferior en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M, después de calentar durante 20 minutos. Esta diferencia se hizo más significativa cuando se prolongó el período de incubación hasta 40 y 60 minutos. La sacarosa era más efectiva que la glicina en la reducción de la agregación del anticuerpo hPM-1 inducida por el tratamiento térmico. Así, el NaCl mostró un efecto negativo sobre la prevención de la agregación como lo hizo en el Ejemplo 2.

Ejemplo 5: Análisis en gel nativo de muestras de anticuerpo hPM-1 antes y después del calentamiento

Se sometieron seis muestras (muestras 1 a 6) de dicha preparación de anticuerpo hPM-1 almacenadas en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,5, a análisis en gel nativo. Se muestran los resultados de muestras de aproximadamente 28 µg sobre el gel en la calle derecha de la Fig. 7.

Se diluyeron dichas seis muestras en fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,5, para preparar una solución de anticuerpo hPM-1 a una concentración de aproximadamente 2 mg/ml, que se dializó frente al tampón. Tras la diálisis, se determinaron espectrofotométricamente las concentraciones de proteína a un coeficiente de extinción de 1,401, con los resultados siguientes.

Muestra 1: 1,87 mg/ml
 Muestra 2: 1,77 mg/ml
 Muestra 3: 1,89 mg/ml
 Muestra 4: 1,89 mg/ml
 Muestra 5: 1,87 mg/ml
 Muestra 6: 1,85 mg/ml.

Estas muestras fueron sometidas a análisis en gel nativo. Los resultados fueron los mismos que los mostrados en la calle derecha de la Fig. 7, lo que confirma que la agregación no estaba influenciada por la dilución y la diálisis.

Se calentaron luego estas muestras a 75°C durante una hora y se las sometió a análisis en gel nativo del mismo modo (excepto por usar muestras de 49 µg). Los resultados son mostrados en la calle izquierda de la Fig. 7. El contenido en monómeros de anticuerpo hPM-1 disminuyó notablemente en todas las muestras, para mostrar que se habían formado agregados.

Ejemplo 6: Efecto del tipo y del pH del tampón sobre la agregación

Se diluyó la muestra 6 en los cinco tampones siguientes para preparar soluciones de anticuerpo hPM-1 a una concentración de aproximadamente 2 mg/ml.

Muestra 6-1: fosfato/Na 5 mM, pH 6,5 [fosfato de sodio (monobásico) 5 mM ajustado a pH 6,5 con NaOH concentrado].

Muestra 6-2: fosfato/His 5 mM, pH 6,0 [fosfato de sodio (monobásico) 5 mM ajustado a pH 6,0 con histidina (base) concentrada a una concentración final de histidina de 1 mM].

Muestra 6-3: fosfato/His 5 mM, pH 6,5 [fosfato de sodio (monobásico) 5 mM ajustado a pH 6,5 con histidina (base) concentrada a una concentración final de histidina de 6,6 mM].

Muestra 6-4: fosfato/Na 5 mM + His/HCl 20 mM, pH 6,5 [fosfato 10 mM, pH 6,5, mezclado con igual cantidad de His/HCl 40 mM, pH 6,5].

Muestra 6-5: fosfato/Na 5 mM, pH 6,0 [fosfato de sodio (monobásico) 5 mM ajustado a pH 6,0 con NaOH concentrado].

Se dializaron estas muestras frente a los tampones respectivos mostrados anteriormente. Tras la diálisis, se determinaron las concentraciones proteicas con los resultados siguientes.

Muestra 6-1: 1,80 mg/ml
 Muestra 6-2: 1,75 mg/ml
 Muestra 6-3: 1,82 mg/ml
 Muestra 6-4: 1,84 mg/ml
 Muestra 6-5: 1,68 mg/ml.

Se sometieron estas muestras a análisis en gel nativo antes y después del tratamiento térmico a 75°C durante 1 hora.

La Fig. 8 muestra los resultados analíticos de las muestras 6-1, 6-2, 6-3 y 6-4. La agregación era menor en la muestra 6-2, seguida de la muestra 6-4. Esto mostró que un pH de 6,0 daba mejores resultados que un pH de 6,5 y que el ajuste del pH con histidina tenía un efecto de estabilización.

La Fig. 9 muestra los resultados de la comparación de las muestras 6-1 y 6-2 a diversas concentraciones de histidina. Se prepararon las muestras mezclando la muestra 6-1 ó 6-2 con una solución de histidina 0,25 M (mezclada con el correspondiente tampón para ajustar el pH). Se formaron menos agregados a pH 6,0 (muestra 6-2) que a pH 6,5 (muestra 6-1), lo que muestra que el efecto de la histidina varía con el pH.

El efecto de estabilización de la histidina era considerable a una concentración de 5-10 mM a pH 6,0, mientras que el efecto de estabilización aumentaba con la concentración de histidina a pH 6,5, como muestran los resultados a 25-50 mM.

Se examinó entonces el efecto de la concentración de histidina sobre la agregación en otras muestras. La Fig. 10 muestra los resultados de la comparación de la muestra 6-1, pH 6,5, la muestra 6-2, pH 6,0, y la muestra 6-3, pH 6,5, a diversas concentraciones de histidina.

Se vio algún efecto de estabilización en la muestra 6-3, pH 6,5, incluso cuando se aumentó la concentración a 100 mM, pero el efecto era mayor a concentraciones menores de histidina, tales como 5-10 mM, a pH 6,0 (muestra 6-2), que a cada concentración de histidina a pH 6,5. Sin embargo, las concentraciones reales de histidina de la muestra 6-3 son 3,3 mM superiores a lo indicado, ya que esta muestra contiene inicialmente 6,6 mM de histidina.

La comparación de las muestras 6-1 y 6-3 a 50 ó 100 mM (por la misma razón, la muestra 6-3 también contiene aquí histidina en una cantidad 3,3 mM superior a lo indicado) mostró que la muestra 6-3 tenía un mayor contenido en monómeros con menos agregación. Las muestras 6-1 y 6-3 difieren en el medio de ajuste del pH a 6,5. Es decir, la muestra 6-1 fue ajustada a pH 6,5 con NaOH, mientras que la muestra 6-3 fue ajustada con histidina concentrada utilizada como base. Por lo tanto, el efecto de estabilización es mayor cuando se usa histidina que cuando se usa el NaOH convencional para ajustar el pH a 6,5.

La Fig. 11 muestra los resultados de la comparación del efecto de la histidina en dos muestras a pH 6,0, es decir, las muestras 6-2 y 6-5. En ambas muestras, la histidina 5-10 mM era la más efectiva.

La Fig. 12 muestra los resultados de la comparación de la muestra 6-1 (fosfato/Na 5 mM, pH 6,5), la muestra 6-2 (fosfato/His 5 mM, pH 6,0) y la muestra 6-5 (fosfato/Na 5 mM, pH 6,0). El contenido en agregados era menor en 6-2, seguido de 6-5 y luego de 6-1. Esto confirmaba que el anticuerpo hPM-1 es más estable a pH 6,0. Las muestras 6-2 y 6-5 difieren en el medio de ajuste del pH a 6,0. Es decir, la muestra 6-5 fue ajustada a pH 6,0 con NaOH, mientras que la muestra 6-2 fue ajustada con histidina concentrada utilizada como base. Por lo tanto, el efecto de estabilización es mayor cuando se usa histidina que cuando se usa NaOH convencional para ajustar el pH a 6,0, de forma similar al pH 6,5.

La Fig. 13 muestra el efecto de la sacarosa (50-200 mM) añadida a la muestra 6-2. Se observó una prevención efectiva de la agregación al aumentar la concentración de sacarosa.

La Fig. 13 también muestra el efecto de la glicina (50-200 mM) añadida a la muestra 6-5. Se observó una prevención notablemente efectiva de la agregación al aumentar la concentración de glicina.

La Fig. 14 muestra una comparación del efecto de la glicina o la sacarosa 200 mM en dos muestras a pH 6,0 (6-2 y 6-5). La agregación era menor en 6-2 que en 6-5. Se confirmó además por estos resultados que el ajuste del pH es más efectivo con histidina que con NaOH.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una preparación estabilizada que tiene un pH de 5,7-6,2 y que contiene un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado hPM-1 en un tampón de histidina, donde la concentración del tampón de histidina es de 5 mM-20 mM y la preparación está en forma de una formulación en solución.
2. La preparación estabilizada de la reivindicación 1, que además contiene glicina y/o sacarosa como agente isotonzante.
- 10 3. La preparación estabilizada de la reivindicación 2, donde la concentración de la glicina y/o de la sacarosa como agente isotonzante es de 0,05-1 M.
4. La preparación estabilizada de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que no contiene NaCl como agente isotonzante.
- 15 5. La preparación estabilizada de la reivindicación 1, donde la concentración de histidina es de 5-10 mM.
6. Un método para estabilizar una preparación de anticuerpo que contiene un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado hPM-1, cuyo método comprende la incorporación del anticuerpo en un tampón de histidina, donde la concentración del tampón de histidina es de 5 mM-20 mM y la preparación está en forma de una formulación en solución.
- 20 7. El método de la reivindicación 6, que comprende la incorporación de glicina y/o sacarosa como agente isotonzante.
- 25

Fig. 1

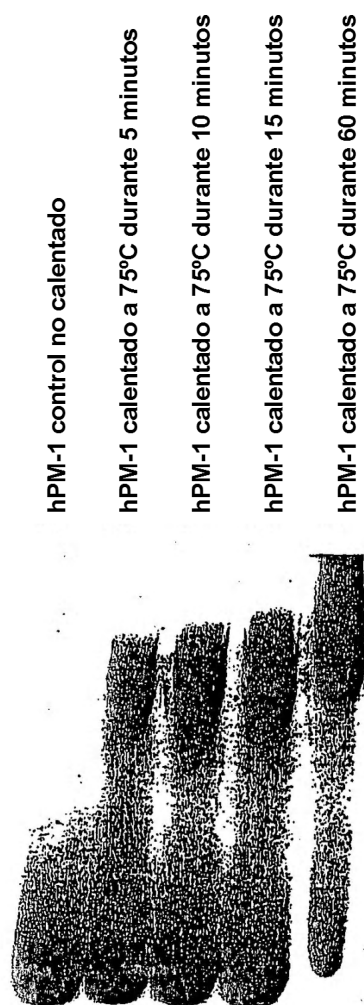


Fig. 2

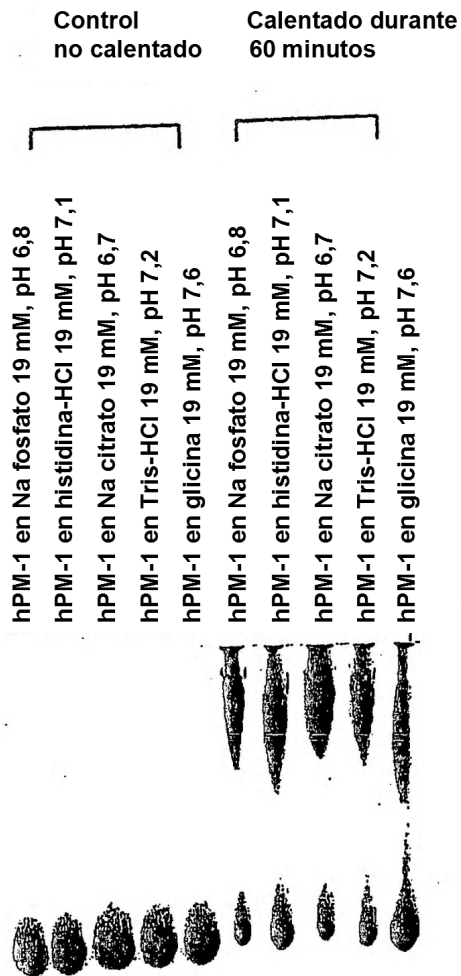


Fig. 3

Calentado durante 60 minutos

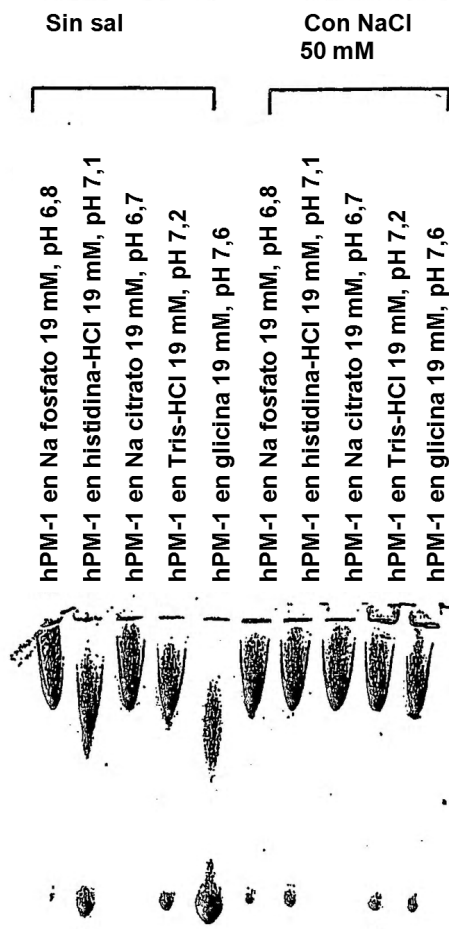


Fig. 4

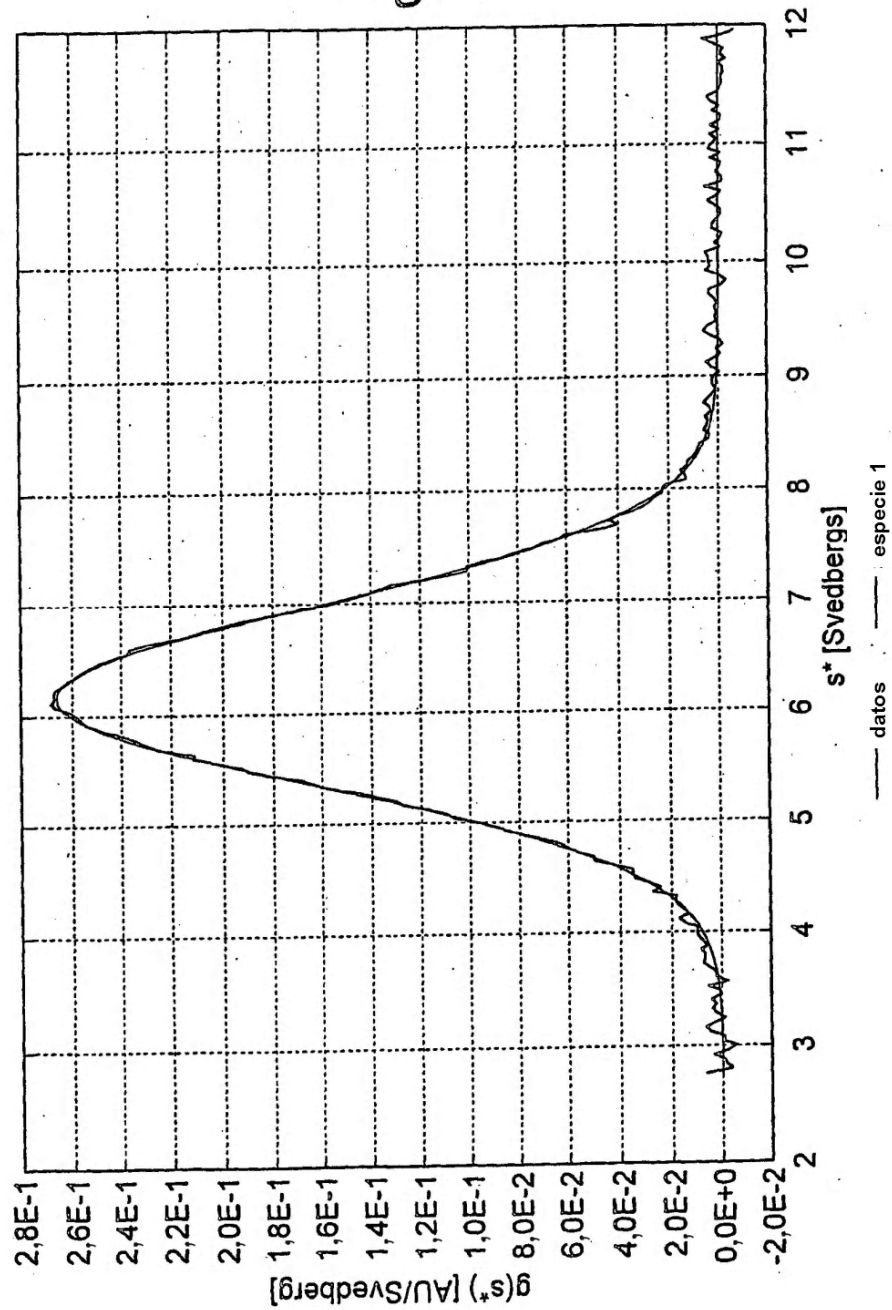


Fig. 5

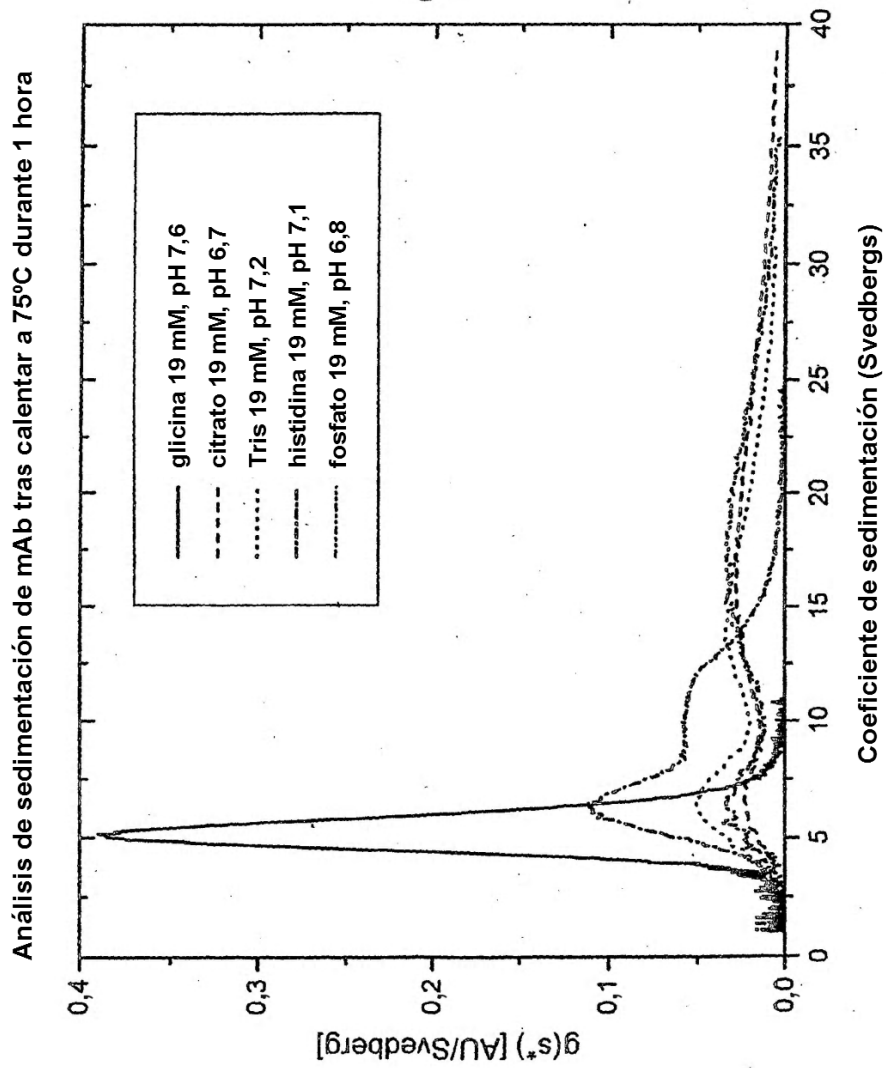


Fig. 6

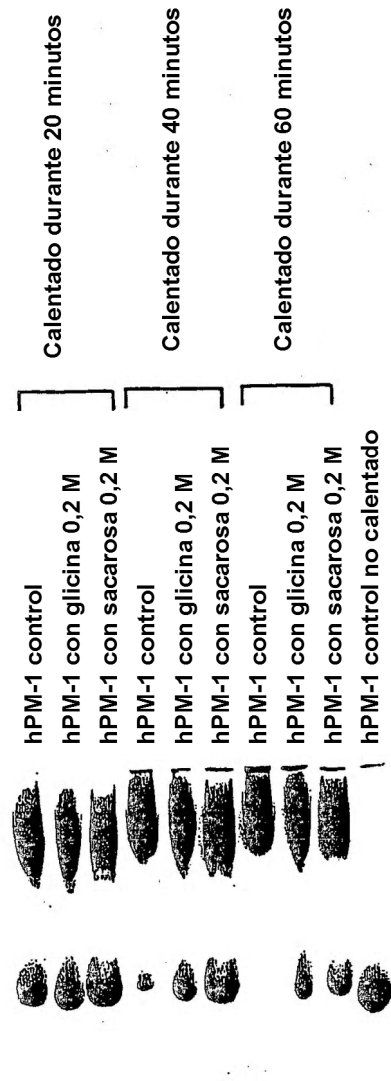


Fig. 7

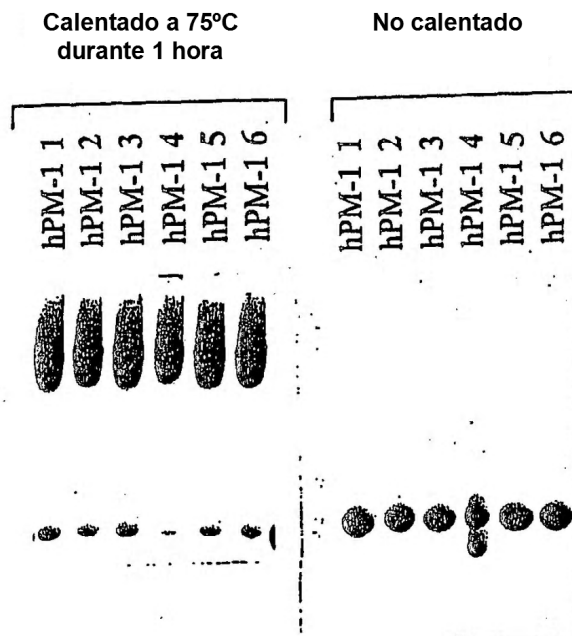


Fig. 8

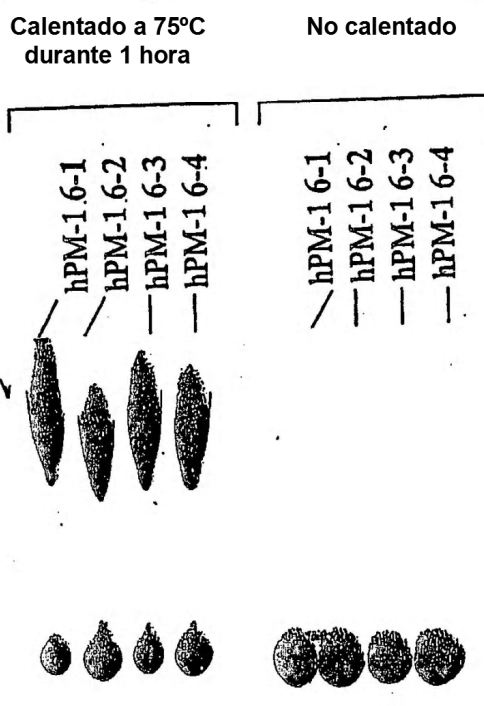


Fig. 9

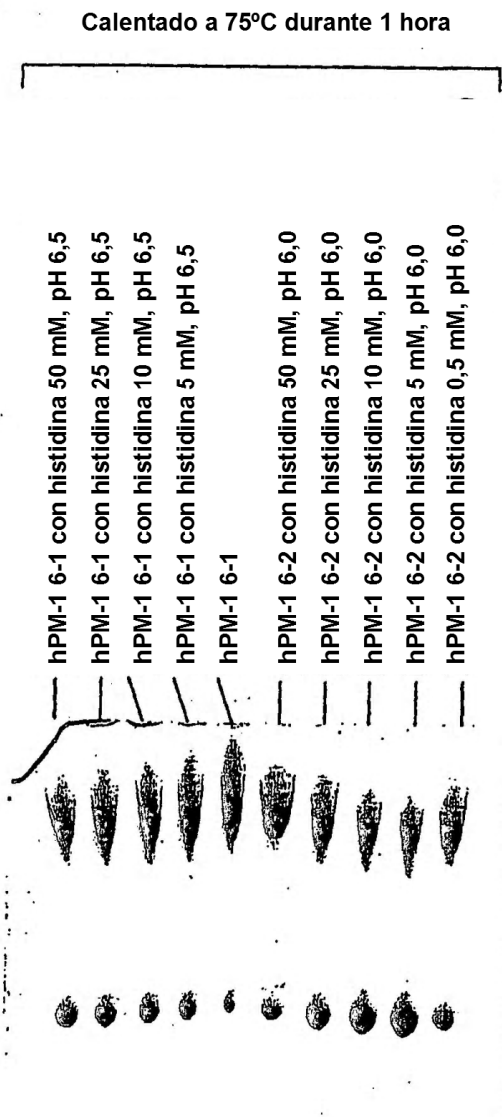


Fig. 10

Calentado a 75°C durante 1 hora

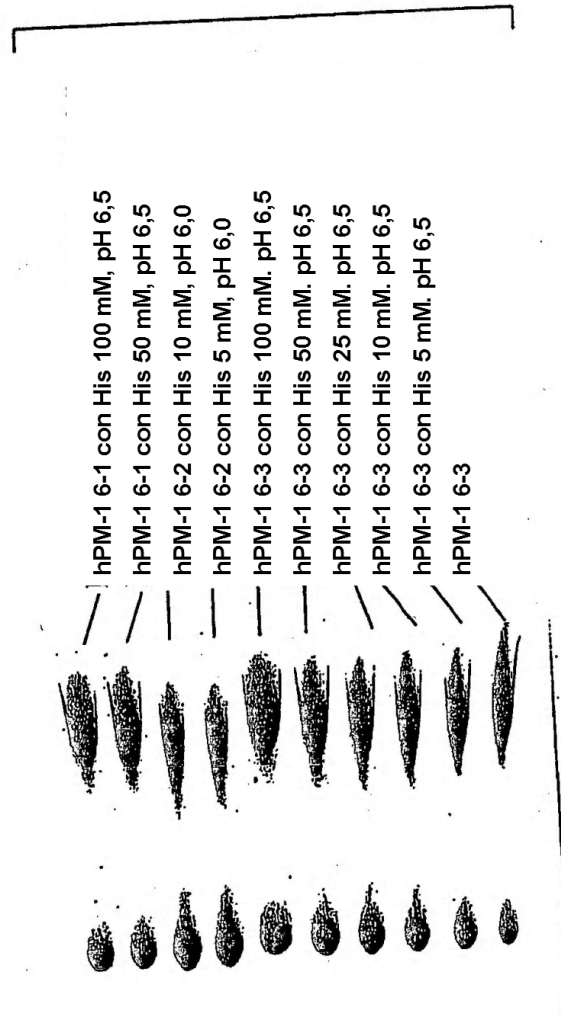


Fig. 11

Calentado a 75°C durante 1 hora

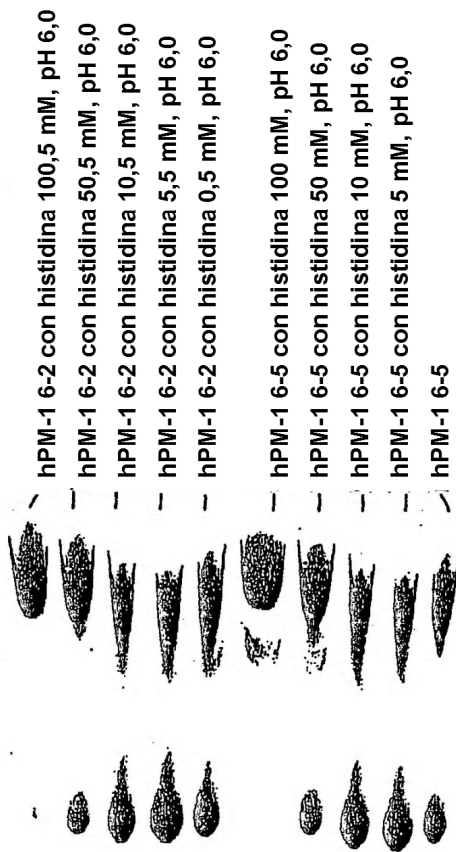


Fig. 12

Calentado a 75°C No calentado
durante 1 hora

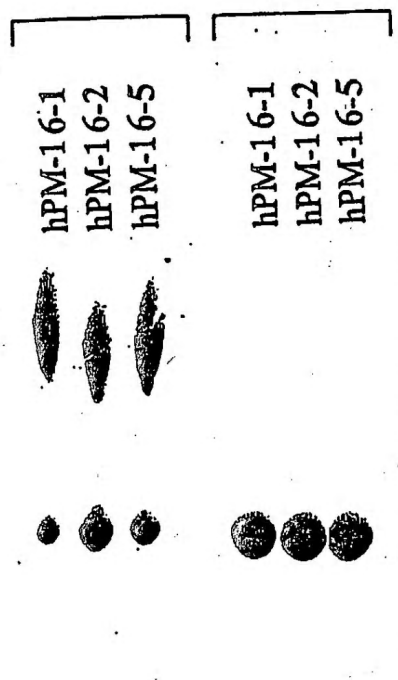


Fig. 13

Calentado a 75°C durante 1 hora

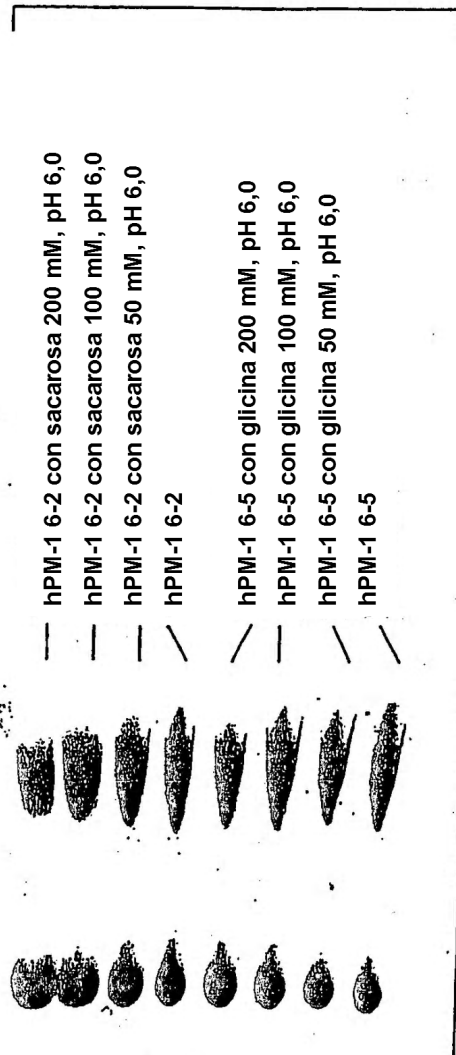


Fig. 14

Calentado a 75°C durante 1 hora

