

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 709**

51 Int. Cl.:

**A61K 9/00** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C07K 16/40** (2006.01)  
**C07K 16/44** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 47/10** (2006.01)  
**A61K 47/12** (2006.01)  
**A61K 47/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2003 E 03705165 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.05.2015 EP 1475100**

54 Título: **Utilización de ácido acético para eliminar los problemas inducidos por el ión Fe en las formulaciones de anticuerpos anti-HM1.24 o anti-IL6R**

30 Prioridad:

**14.02.2002 JP 2002036244**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**27.05.2015**

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)  
5-1, UKIMA 5-CHOME, KITA-KU  
TOKYO, 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**MIZUSHIMA, HIDEFUMI y  
MIYAUCHI, EIICHI**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

ES 2 536 709 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**

**Utilización de ácido acético para eliminar los problemas inducidos por el ión Fe en las formulaciones de anticuerpos anti-HM1.24 o anti-IL6R**

5 **Campo técnico**

10 La presente invención se refiere en general al uso de ácido acético para suprimir la formación de materia insoluble visible y/o partículas insolubles causada por iones Fe presentes en una formulación de disolución que contiene anticuerpo.

**Técnica anterior**

15 Los avances en la tecnología de recombinación génica han permitido el uso farmacéutico de anticuerpos, tales como inmunoglobulinas, anticuerpos monoclonales y anticuerpos humanizados. Para garantizar un suministro estable de estos anticuerpos, es necesario establecer condiciones de producción y almacenamiento en las que la estructura y la actividad de los anticuerpos puedan ser mantenidas.

20 El documento EP-A-1.174.148 se refiere a una composición farmacéutica parenteral que comprende un fragmento de anticuerpo monoclonal humanizado, un agente tensioactivo no iónico y sacáridos, en donde el pH es débilmente ácido.

25 El documento US-B-6.252.055 describe preparaciones de anticuerpos monoclonales concentrados para la administración a seres humanos en las que el anticuerpo está presente a una concentración mayor de 100 mg/mL y tan alta como 350 mg/mL.

Las sustancias farmacéuticas liofilizadas de anticuerpos monoclonales o policlonales, que contienen un azúcar o un amino azúcar, así como un tensioactivo como agente estabilizante se describen en el documento WO 98/22136.

30 El documento WO 98/56418 describe una formulación farmacéutica acuosa estable que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo no sometido a liofilización previamente; un tampón que mantiene el pH en el intervalo de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0, un tensioactivo y un poliol.

35 Cuando las proteínas se almacenan en forma de una disolución altamente concentrada, generalmente están asociadas con un problema de deterioro, que incluye la formación de agregados insolubles, es necesario evitar tal deterioro. Por ejemplo, el solicitante ha encontrado que un anticuerpo anti-HM1.24 tiene un efecto terapéutico sobre las células de mieloma (documento JP KOKAI 11-092399), y también ha estudiado la formulación de este anticuerpo. Sin embargo, el anticuerpo anti-HM1.24 es una proteína inestable y es muy probable que experimente cambios físicos y químicos (por ejemplo, asociación, agregación) como resultado de estreses en el proceso de purificación. Tales estreses incluyen el estrés por filtración durante la eliminación de virus y bacterias, el estrés por concentración, el estrés por calor y el estrés por luz.

45 También, en el caso de utilizar técnicas de ingeniería genética para obtener anticuerpos, las células productoras de anticuerpos se cultivan a granel, las disoluciones que contienen anticuerpos se purifican, se congelan y se almacenan hasta su descongelación para su utilización en la formulación del fármaco. Sin embargo, la repetición de tales etapas de agitación y congelación-descongelación provoca la formación de agregados de anticuerpos y/o partículas insolubles. Además, el almacenamiento a largo plazo causa la descomposición de los anticuerpos, lo que da como resultado la formación de productos de descomposición. Estos fenómenos podrían conducir eventualmente a una reducción del nivel de anticuerpos que permanecen en la disolución.

50 También existe el problema de que la materia insoluble visible y las partículas insolubles se forman en presencia de iones metálicos (iones Fe) introducidos durante el proceso de producción. Puesto que los iones metálicos (iones Fe), incluso cuando están presentes en cantidades muy pequeñas en la disolución, contribuyen a la formación de materia insoluble visible y partículas insolubles, tales iones deben eliminarse por completo. Sin embargo, existe un límite para los métodos de eliminación tal como la precipitación, la formación de complejos, etcétera. Por lo tanto, ha habido una necesidad de desarrollar una estrategia para evitar la formación de materia insoluble visible y partículas insolubles incluso en presencia de iones metálicos.

60 Se han realizado muchos intentos para almacenar proteínas en una forma de disolución, con el hallazgo de que los efectos de estabilización se obtienen mediante la adición de un estabilizador para prevenir cambios químicos y físicos. Los ejemplos del estabilizador incluyen materiales de alto peso molecular tales como proteínas (p. ej., albúmina de suero humano, gelatina purificada) o materiales de bajo peso molecular tales como polioles, aminoácidos y tensioactivos. Sin embargo, cuando se añaden como estabilizadores, los materiales de alto peso molecular derivados de organismos como las proteínas son desventajosos ya que se requieren procesos muy

complicados para eliminar los contaminantes, tales como virus y priones. Con respecto a los materiales de bajo peso molecular, también es preferible utilizarlos en cantidades tan pequeñas como sea posible.

5 Para la estabilización de formulaciones de anticuerpos liofilizadas, se ha informado sobre aquellas que comprenden un azúcar o un amino azúcar, un aminoácido, y un agente tensioactivo como estabilizadores (documento JP TOKUHYO 2001-503781).

10 Sin embargo, ha habido una fuerte demanda de formulaciones en disolución fáciles de usar que eliminen las etapas de disolución y reconstitución antes de su uso. Especialmente, ha habido una necesidad de formulaciones en disolución estables que contengan anticuerpos.

### Descripción de la invención

15 El objeto de la presente invención es suprimir la formación de materia insoluble visible y/o partículas insolubles en presencia de iones Fe introducidos durante el proceso de producción.

20 Como resultado de los esfuerzos extensos y profundos realizados para lograr el objeto anterior, los autores de de la presente invención han encontrado que el uso de ácido acético suprime significativamente la formación de materia insoluble visible en presencia de hierro, y que la adición de agentes tensioactivos suprime muy significativamente la formación de materia insoluble visible y/o partículas insolubles durante las etapas de agitación y congelación-descongelación.

La presente invención se resume en las reivindicaciones adjuntas.

### 25 Mejor modo de llevar a cabo la invención

30 Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "formulación en disolución que contiene anticuerpo" signifique una formulación en disolución que contiene un anticuerpo como un ingrediente activo y disponible para su uso en la administración a animales incluyendo seres humanos, preferiblemente preparada sin utilizar una etapa de liofilización.

35 Dentro de los límites de la reivindicación 1, según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "disolución que contiene anticuerpo" signifique una disolución que contiene cualquier anticuerpo, ya sea el anticuerpo uno nativo o uno recombinante. Este es preferiblemente un medio de cultivo de células de mamífero (por ejemplo, células CHO) que contienen las moléculas de anticuerpo producidas por cultivo, que además se pueden someter a purificación parcial u otro tratamiento o tratamientos determinados (disolución a granel), o alternativamente, la formulación en disolución indicada anteriormente disponible para su uso en la administración a animales incluyendo seres humanos.

40 Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "partículas insolubles" signifique material particulado insoluble de 10  $\mu\text{m}$  o más grandes, como se define en la Prueba para Partículas Insolubles en Inyectables, Procedimientos de Ensayo Normalizados, Farmacopea Japonesa. La medición de partículas insolubles puede llevarse a cabo mediante el uso de un microscopio, un filtro para recoger partículas insolubles y un filtro de membrana para la medición, pero convenientemente mediante el uso de un tipo de protección contra la luz de un analizador automático de partículas.

50 Según se utiliza en la presente memoria, se pretende que el término "materia insoluble visible" signifique aquella fácilmente detectada a simple vista cuando una formulación en disolución en un recipiente se coloca directamente bajo una luz blanca con un brillo de aproximadamente 3000 lux (2000-3750 lux) contra un fondo negro, de acuerdo con los procedimientos descritos en la Sección 9.2.20 de la Farmacopea Europea, tercera edición.

55 Según se utilizan en la presente memoria, se pretende que los términos "productos de agregación" y "productos de descomposición" signifiquen agregados y fragmentos, respectivamente, de moléculas de anticuerpos utilizados como un ingrediente activo de la formulación. El contenido de estos productos se puede determinar, por ejemplo, basándose en la razón máxima con la cromatografía de penetración en gel como se indica a continuación.

60 No existe ninguna limitación particular sobre los anticuerpos usados en la formulación en disolución de la presente invención, siempre y cuando sean un anticuerpo anti-receptor de la interleuquina-6 o un anticuerpo anti-antígeno HM1.24 y puedan unirse al antígeno deseado. Es posible utilizar anticuerpos de ratón, anticuerpos de rata, anticuerpos de conejo, anticuerpos de oveja, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos y similares, según corresponda. Tales anticuerpos pueden ser policlonales o monoclonales, pero son preferiblemente monoclonales debido a que se pueden producir moléculas de anticuerpos uniformes de forma estable. Los anticuerpos policlonales y monoclonales se pueden preparar de una manera bien conocida por los expertos en la técnica.

En principio, se pueden preparar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales usando técnicas conocidas, como sigue. Es decir, se utiliza un antígeno deseado o una célula que expresa el antígeno deseado como antígeno de sensibilización y se inmunizan de acuerdo con los procedimientos convencionales para la inmunización. Los inmunocitos resultantes se fusionan a continuación con células parentales conocidas utilizando procedimientos convencionales para la fusión celular, seguido de la selección de células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) a través de procedimientos de escrutinio convencionales. La preparación de hibridomas se puede llevar a cabo de acuerdo con, por ejemplo, el método de Milstein et al. (Kohler, G. y Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46). Si el antígeno utilizado es menos inmunogénico, tal antígeno puede conjugarse con una macromolécula inmunogénica (por ejemplo, albúmina) antes de su uso en la inmunización.

Además, los genes de anticuerpos son clonados a partir de hibridomas, integrados en vectores apropiados, y luego transformados en anfitriones para producir moléculas de anticuerpo mediante la tecnología de recombinación de genes. Los anticuerpos recombinantes genéticamente producidos de este modo también se pueden usar en la presente invención (véase, por ejemplo, Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, *THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES*, Publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Más específicamente, el ADNc de los dominios variables del anticuerpo (dominios V) se sintetiza a partir del ARNm del hibridoma utilizando la transcriptasa inversa. Tras la obtención del ADN que codifica los dominios V del anticuerpo objetivo, el ADN se liga al ADN que codifica los dominios constantes del anticuerpo deseado (dominios C) y se integra en un vector de expresión. Alternativamente, el ADN que codifica los dominios V del anticuerpo puede estar integrado en un vector de expresión que lleva el ADN de los dominios C del anticuerpo. El constructo de ADN se integra en un vector de expresión de tal manera que se expresa bajo el control de una región reguladora de la expresión, p. ej., un intensificador o un promotor. Las células anfitrionas se transforman con este vector de expresión para la expresión del anticuerpo.

En la presente invención, es posible usar anticuerpos recombinantes genéticamente (p. ej., anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados) que son modificados artificialmente con el fin de atenuar las características como heteroantígeno para seres humanos. Estos anticuerpos modificados se pueden preparar de una manera conocida. Un anticuerpo quimérico se compone de dominios variables de cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo de mamífero no humano (por ejemplo, ratón) y dominios constantes de las cadenas pesadas y ligeras de un anticuerpo humano. Para obtener anticuerpos quiméricos, los ADN que codifican tales dominios variables de anticuerpos de ratón se pueden ligar a los ADN que codifican los dominios constantes de anticuerpos humanos, y después se pueden integrar en un vector de expresión, seguido de la transformación en un anfitrión para la producción de anticuerpos.

Los anticuerpos humanizados también se denominan anticuerpos humanos reformados y se obtienen por injerto de regiones determinantes de complementariedad (CDR) de anticuerpos de mamíferos no humanos (p. ej., ratón) para sustituir aquellas de los anticuerpos humanos. También se conocen procedimientos de recombinación de genes convencionales para este propósito. Más específicamente, una secuencia de ADN diseñada para permitir la ligación entre las CDR de un anticuerpo de ratón y las regiones marco (FR) de un anticuerpo humano se sintetiza por medio de PCR a partir de varios oligonucleótidos que se preparan para que tengan secciones solapantes entre sí en los extremos. El ADN así obtenido se liga al ADN que codifica los dominios constantes de anticuerpos humanos, y se integra en un vector de expresión, seguido de la transformación en un anfitrión para la producción de anticuerpos (véase la Publicación de Patente Europea Núm. EP 239400 y la Publicación de Patente Internacional Núm. WO 96/02576). Las FR de anticuerpos humanos, que se ligan a las CDR, se seleccionan de tal manera que las regiones determinantes de complementariedad forman un sitio de unión al antígeno favorable. Si es necesario, se pueden realizar sustituciones de aminoácidos en las regiones marco de los dominios variables de anticuerpos de tal manera que las regiones determinantes de la complementariedad del anticuerpo humanizado reformado pueden formar un sitio de unión al antígeno apropiado (Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856).

También se conocen procedimientos para obtener anticuerpos humanos. Por ejemplo, los linfocitos humanos son sensibilizados *in vitro* con un antígeno deseado o una célula que expresa el antígeno deseado, y los linfocitos sensibilizados se fusionan a continuación con células de mieloma humanas (p. ej., U266) para dar los anticuerpos humanos deseados que tienen actividad de unión al antígeno (véase el documento JP KOKOKU 01-59878). Alternativamente, los animales transgénicos que tienen la totalidad de los repertorios de genes de anticuerpos humanos se pueden inmunizar con un antígeno para obtener los anticuerpos humanos deseados (véanse las Publicaciones Internacionales Núms. WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735). Existen técnicas adicionales que utilizan bibliotecas de anticuerpos humanos para dar anticuerpos humanos por medio de inmunoadsorción ("panning"). Por ejemplo, los dominios variables de anticuerpos humanos pueden ser expresados por medio de la tecnología de presentación en fagos en forma de un anticuerpo de cadena sencilla (scFv) sobre la superficie de fagos, seguido de la selección de fagos que se unen al antígeno. Cuando se analizan genes de los fagos seleccionados, es posible determinar las secuencias de ADN que codifican los dominios variables de anticuerpos humanos que se unen al antígeno. Una vez que se han identificado las secuencias de ADN del scFv que se une al antígeno, se pueden utilizar las secuencias para construir vectores de expresión apropiados para obtener anticuerpos humanos. Estas técnicas son ya bien conocidas y se pueden encontrar en los documentos

WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388.

5 En un caso en el que los genes de anticuerpos se aíslan y luego se transforman en anfitriones apropiados para producir anticuerpos, se puede utilizar cualquier combinación adecuada de anfitrión y vector de expresión para este propósito. Cuando se utilizan células eucarióticas como anfitriones, se pueden utilizar células animales, células vegetales y células fúngicas. Las células animales conocidas para este propósito incluyen (1) células de mamífero tales como CHO, COS, mieloma, BHK (riñón de cría de hámster), HeLa y Vero, (2) células de anfibio tales como oocitos de *Xenopus*, y (3) células de insecto tales como Sf9, Sf21 y Tn5. Las células vegetales incluyen aquellas derivadas de plantas de *Nicotiana* (por ejemplo, *Nicotiana tabacum*), que pueden ser sometidas a cultivos de callos.  
10 Las células fúngicas incluyen levaduras tales como *Saccharomyces* (por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*) y hongos filamentosos tales como *Aspergillus* (p. ej., *Aspergillus niger*). Cuando se utilizan células procarióticas, existen sistemas de producción que emplean células bacterianas. Las células bacterianas conocidas para este propósito son *E. coli* y *Bacillus subtilis*. Los anticuerpos se pueden obtener mediante la introducción de genes de anticuerpos diana en estas células a través de la transformación y el posterior cultivo de las células transformadas *in vitro*.  
15

Los anticuerpos que van a estar contenidos en la formulación estabilizada de la presente invención son un anticuerpo anti-receptor de IL-6 o un anticuerpo monoclonal anti-antígeno HM1.24.

20 Los ejemplos de los anticuerpos humanizados reformados preferidos para su uso en la presente invención incluyen un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado (hPM-1) (véase la Publicación Internacional Núm. WO 92-19759) y un anticuerpo monoclonal anti-antígeno HM1.24 humanizado (véase la Publicación Internacional Núm. WO 98-14580).

25 Los anticuerpos que van a estar contenidos en la formulación en disolución de la presente invención pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina, preferiblemente de la clase IgG incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, y más preferiblemente de la clase IgG1.

30 En la disolución o la formulación en disolución que contiene el anticuerpo de la presente invención, la formación de materia insoluble visible y/o partículas insolubles, que está causada por iones Fe introducidos durante los procedimientos de producción, se puede suprimir de manera significativa por medio de la adición de ácido acético.

35 La adición de ácido acético se puede llevar a cabo mediante la disolución de un anticuerpo y otros ingredientes en un tampón de ácido acético. Para preparar una formulación en disolución, se pueden disolver un anticuerpo y otros ingredientes en un tampón acuoso conocido en la técnica de las formulaciones en disolución, incluyendo tampón de acetato y opcionalmente tampón de citrato (preferiblemente tampón de citrato de sodio). La concentración del tampón utilizado es de 5 a 100 mM, y preferiblemente de 10 a 50 mM.

40 Debido a la inclusión de ácido acético, la formulación en disolución que contiene el anticuerpo de la presente invención logra una supresión significativa de la formación de contaminante insoluble, incluso en presencia de iones Fe durante el almacenamiento a temperatura ambiente (25°C), en comparación con una formulación en disolución que contiene anticuerpo con un suplemento de un ácido inorgánico.

45 En la presente invención, la adición de un agente tensioactivo permite una supresión muy significativa de la materia insoluble visible y/o la formación de partículas insolubles durante la agitación y la congelación-descongelación de la formulación en disolución que contiene anticuerpo. Los ejemplos típicos de un agente tensioactivo incluyen:

50 tensioactivos no iónicos (HLB 6 a 18), tales como ésteres de ácidos grasos y sorbitán (p. ej., monocaprilato de sorbitán, monolaurato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán), ésteres de ácidos grasos y glicerina (p. ej., monocaprilato de glicerina, monomiristato de glicerina, monoestearato de glicerina), ésteres de ácidos grasos y poliglicerina, (p. ej., monoestearato de decaglicerilo, diestearato de decaglicerilo, monolinoleato de decaglicerilo), ésteres de ácidos grasos y polioxietilensorbitán (p. ej., monolaurato de polioxietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, monoestearato de polioxietilensorbitán, monopalmitato de polioxietilensorbitán, trioleato de polioxietilensorbitán, triestearato de polioxietilensorbitán), ésteres de ácidos grasos y polioxietilensorbitol (p. ej., tetraestearato de polioxietilensorbitol, tetraoleato de polioxietilensorbitol), ésteres de ácidos grasos y polioxietilenglicerina (p. ej., monoestearato de polioxietilenglicerilo), ésteres de ácidos grasos y polietilenglicol (p. ej., diestearato de polietilenglicol), polioxietilenaquí éteres (p. ej., polioxietilenaquí éter), polioxipropilenaquí éteres (p. ej., polioxietilenaquí éter), polioxietilenaquí éteres (p. ej., polioxietilenaquí éter), polioxietilenaquí éteres (p. ej., polioxietilenaquí éter), aceites de ricino polioxietilenaquí éteres (p. ej., aceite de ricino polioxietilenaquí éter), aceites de ricino polioxietilenaquí éteres (p. ej., aceite de ricino polioxietilenaquí éter), derivados de cera de abeja polioxietilenaquí éteres (p. ej., sorbitol-cera de abejas polioxietilenaquí éter), derivados de lanolina polioxietilenaquí éteres (p. ej., lanolina polioxietilenaquí éter), y amidas de ácidos grasos polioxietilenaquí éteres (p. ej., amida de ácido esteárico polioxietilenaquí éter);  
60 tensioactivos aniónicos tales como alquil(C<sub>10</sub>-C<sub>18</sub>)sulfato (p. ej., cetilsulfato de sodio, lauril sulfato de sodio, oleil sulfato de sodio), polioxietilenaquí étersulfato con un promedio de 2 a 4 moles de unidades de

óxido de etileno añadidas (p. ej., polioxietilena Lauril sulfato de sodio), y sales éster de alquil(C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>)sulfosuccinato (p. ej., éster Lauril sulfosuccinato de sodio); y tensioactivos naturales tales como lecitina, glicerofosfolípido, esfingofosfolípidos (p. ej., esfingomielina), y ésteres de sacarosa de ácidos grasos C<sub>12</sub>-C<sub>18</sub>. La formulación de la presente invención se puede complementar con uno o más de estos tensioactivos. Los tensioactivos preferidos para su uso en la formulación en disolución de la presente invención son ésteres de ácidos grasos y polioxietilensorbitán tales como Polisorbato 20, 40, 60 o 80, siendo el Polisorbato 20 y 80 particularmente preferidos. También es preferido el polioxietileno polioxipropilenglicol tipificado por poloxámeros (p. ej., Pluronic F-68<sup>®</sup>), siendo particularmente preferido Poloxámero 188.

La cantidad de agente tensioactivo que se va a añadir variará dependiendo del tipo de tensioactivo usado. En el caso de Polisorbato 20 o Poloxámero 188, éstos se añaden normalmente en una cantidad de 0,001 a 100 mg/mL (0,0001% a 10%), preferiblemente de 0,005 a 50 mg/mL (0,0005% a 5%), y más preferiblemente 0,01 a 10 mg/mL (0,001% a 1%). Incluso más preferiblemente, la cantidad es de 0,025 a 0,25 mg/mL (0,0025% a 0,025%) a la que el número máximo de partículas insolubles que tienen un diámetro de no menos de 25 µm puede ser de no más de 3, incluso después de agitar (200 golpes/min x 30 minutos) y un ciclo de congelación-descongelación (-80°C/25°C). En el caso del Polisorbato 80, éste se añade normalmente en una cantidad de 0,001 a 100 mg/mL (0,0001% a 10%), preferiblemente de 0,005 a 50 mg/mL (0,0005% a 5%), y más preferiblemente de 0,01 a 10 mg/mL (0,001% a 1%). Incluso más preferiblemente, la cantidad es de 0,025 a 1 mg/mL (0,0025% a 0,1%) en la que el número máximo de partículas insolubles que tienen un diámetro de no menos de 25 µm puede ser cero, y no se observa formación de materia insoluble visible ni siquiera después de agitar (200 golpes/min x 60 minutos) y 3 ciclos de congelación-descongelación (-20°C/5°C).

Preferiblemente, la formulación en disolución que contiene anticuerpos de la presente invención está sustancialmente libre de estabilizadores de proteínas tales como albúmina de suero humano y gelatina purificada.

La formulación en disolución que contiene anticuerpos de la presente invención puede comprender además cloruro de sodio en una cantidad de 10 a 300 mM, preferiblemente de 20 a 200 mM.

La formulación en disolución que contiene anticuerpos de la presente invención tiene preferiblemente un pH de 4 a 8, más preferiblemente de 5 a 7,5. Sin embargo, el pH variará dependiendo del tipo de anticuerpo contenido y no se limita a este intervalo. Por ejemplo, en el caso de usar un anticuerpo anti-HM1.24, el intervalo de pH de 5,5 a 6,5 es más preferido con el fin de evitar la agregación inducida por el estrés por calor, mantener un alto nivel de residuo, y suprimir la formación de heteromoléculas cargadas (incluyendo productos desamidados, etc.). El pH preferido para cada anticuerpo se puede determinar de acuerdo con los ejemplos mostrados a continuación.

La formulación de la presente invención puede comprender además, como un estabilizador, alcoholes de azúcares tales como manitol y sorbitol o sacáridos tales como oligosacáridos no reductores incluyendo disacáridos no reductores (p. ej., sacarosa, trehalosa) y trisacáridos no reductores (p. ej., rafinosa).

Asimismo, la formulación de la presente invención puede comprender además, como agente de isotonicidad, polietilenglicol o sacáridos tales como dextrano, manitol, sorbitol, inositol, glucosa, fructosa, lactosa, xilosa, manosa, maltosa, sacarosa, trehalosa y rafinosa.

Si se desea, la formulación en disolución que contiene anticuerpos de la presente invención puede comprender además un diluyente, un solubilizante, un excipiente, un ajustador de pH, un agente calmante, un tampón, un agente reductor que contiene azufre, un antioxidante y similares. Por ejemplo, los ejemplos de un agente reductor que contiene azufre incluyen aquellos que tienen un grupo sulfhidrilo, tales como N-acetilcisteína, N-acetilhomocisteína, ácido tióctico, tioglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico y una sal del mismo, tiosulfato de sodio, glutatión, y un ácido tioalcanoico C<sub>1</sub>-C<sub>7</sub>. Los ejemplos del antioxidante incluyen ácido eritórbito, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, α-tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico y una sal del mismo, palmitato de L-ascórbico, estearato de L-ascórbico, bisulfito de sodio, sulfito de sodio, galato de triamillo y galato de propilo, así como agentes quelantes tales como etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA), pirofosfato de sodio y metafosfato de sodio. Además, la formulación de la presente invención puede comprender otros ingredientes comúnmente utilizados, por ejemplo, sales inorgánicas tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, fosfato de sodio, fosfato de potasio y bicarbonato de sodio, así como sales orgánicas tales como citrato de sodio, citrato de potasio y acetato de sodio.

La formulación en disolución que contiene anticuerpos de la presente invención se administra generalmente por vía parenteral, por ejemplo, en una forma de dosificación inyectable (p. ej., inyecciones subcutáneas, intravenosas, intramusculares o intraperitoneales), así como preparaciones transdérmicas, transmucosales, transnasales y transpulmonares. Sin embargo, también se puede administrar por vía oral.

La formulación en disolución que contiene anticuerpos de la presente invención generalmente se puede proporcionar

en forma de recipientes que tienen un volumen definido, incluyendo viales, ampollas y jeringas sellados y esterilizados de plástico o vidrio, así como en forma de recipientes de gran volumen como botellas. En términos de comodidad de manejo, se prefieren las jeringas precargadas.

5 La cantidad de anticuerpo en la formulación de la presente invención se puede determinar según sea apropiado para el tipo y la gravedad de la enfermedad a ser tratada, la edad del paciente, etc. En general, el anticuerpo se incorpora en una cantidad de 0,1 a 200 mg/mL, preferiblemente de 1 a 120 mg/mL.

10 Como se muestra en los ejemplos siguientes, se confirmó que la formulación en disolución que contenía anticuerpos de la presente invención suprime significativamente la formación de materia insoluble visible en presencia de hierro cuando se añaden ácido acético y opcionalmente ácido cítrico, a una disolución de anticuerpo. Por lo tanto, la adición de ácido acético suprimió significativamente la formación de materia insoluble visible y/o partículas insolubles, que estaba causada por iones de Fe introducidos durante los procedimientos de producción. Cuando se suplementa adicionalmente con un agente tensioactivo, la formulación en disolución que contiene anticuerpos de la  
15 presente invención consigue una supresión muy significativa de la materia insoluble visible y/o la formación de partículas insolubles inducida por la agitación y la congelación-descongelación.

20 La presente invención se describirá ahora adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no están destinados a limitar el alcance de la invención, que se define por las reivindicaciones.

### Ejemplos

#### Muestras de anticuerpo

25 Se produjo un anticuerpo monoclonal anti-antígeno HM1.24 humanizado (denominado en lo sucesivo "anticuerpo anti-HM1.24") de acuerdo con el Ejemplo de Referencia 2 de la Publicación Internacional Núm. WO 98-35698 y se utilizó en los ejemplos.

30 El anticuerpo anti-HM1.24 utilizado en los ejemplos era de la clase IgG1.

#### Procedimientos de ensayo

##### Cromatografía de penetración en gel (GPC)

35 Los productos de agregación y descomposición del anticuerpo están separados por diferencias en el peso molecular. En este ensayo, los dímeros, los trímeros y los agregados superiores de anticuerpo se denominan colectivamente como productos de agregación, mientras que los dos fragmentos de bajo peso molecular generados a partir del anticuerpo se conocen como productos de descomposición 1 y producto de descomposición 2, respectivamente. El nivel de residuos del pico principal también se tuvo en cuenta.

40 El contenido se evaluó como el nivel de residuos basándose en el nivel inicial. Los productos de agregación y descomposición se expresaron en tanto por ciento (%).

#### Condiciones de GPC

45 Columna: gel TSK G3000SWXL (TOSOH)  
 Columna de guarda: columna de guarda TSK SWXL (TOSOH)  
 Temperatura de la columna: se mantiene constante alrededor de 25°C  
 Fase móvil: tampón fosfato 50 mM (pH 7,0)/cloruro de sodio 300 mM  
 50 Velocidad de flujo: aproximadamente 0,5 mL/min  
 Longitud de onda de detección: 280 nm

#### Cálculo de la concentración

55 Concentración de anticuerpo anti-HM1.24 (mg/mL)  

$$= (\text{concentración de muestra patrón} \times \text{área del pico de anticuerpo anti-HM1.24} \times \text{cantidad de muestra patrón inyectada}) / (\text{área del pico total de muestra patrón} \times \text{cantidad de sustancia de ensayo inyectada})$$

60 Nivel residual de anticuerpo anti-HM1.24 (%)

$$= [(\text{contenido de anticuerpo anti-HM1.24 después del estrés}) / (\text{contenido de anticuerpo anti-HM1.24 inicial})] \times 100$$

Productos de agregación (también para los productos de descomposición) (%)

$$= \left[ \frac{\text{área del pico de productos de agregación (escisión)}}{\text{área del pico total}} \right] \times 100$$

Cromatografía de intercambio iónico (IEC)

Se separan las heteromoléculas cargadas, que se generan por el deterioro incluyendo la desamidación del anticuerpo. La estabilidad se evalúa por los cambios en el área del pico principal.

Condiciones de HPLC

Columna: Poly CAT (PolyLC Inc.)

Columna de guarda: Poly CAT A guarda Javelin (PolyLC Inc.)

Temperatura de la columna: se mantiene constante alrededor de 25°C

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Longitud de onda de detección: 280 nm

Fase móvil: usando un gradiente de los siguientes dos eluyentes A y B:

Eluyente A:	Tampón MES 25 mM (azida de sodio al 0,05%, pH 6,1)
Eluyente B:	Cloruro de sodio 250 mM en tampón MES 25 mM (azida de sodio al 0,05%, pH 6,1)

Medición

La columna se equilibró con Eluyente B al 30% y luego se inyectó con una disolución de la muestra. Se hizo circular un gradiente lineal de Eluyente B al 70% durante 32 minutos, seguido por el mantenimiento de Eluyente B al 70% durante 5 minutos. Después de lavar con Eluyente B al 100% durante 5 minutos o más, la columna se equilibró con Eluyente B al 30% durante 15 minutos o más y se proporcionó para la siguiente medición.

Análisis

Las áreas de los picos del cromatograma de HPLC resultante se analizaron mediante integración automática para determinar el porcentaje del área del pico principal.

Ensayo de partículas insolubles

Medición: de acuerdo con el ensayo de partículas insolubles en inyecciones utilizando un tipo de protección contra la luz de un analizador automático de partículas, como se describe en Procedimientos de Ensayo Normalizados de la Farmacopea Japonesa.

Aparato: un tipo de protección contra la luz de un analizador de partículas automático (HIAC)

Ensayo de materia insoluble foránea

Medición: la materia insoluble visible fue detectada a simple vista contra un fondo negro de acuerdo con los procedimientos de la Sección 9.2.20 de la Farmacopea Europea, tercera edición.

Ejemplo 1: Efectos de la adición de ácido orgánico

Las formulaciones de anticuerpo anti-HM1.24 preparadas en diferentes tampones (fosfato, acetato, citrato) se complementaron con hierro (FeCl<sub>3</sub>), y se observaron para determinar la formación de materia insoluble visible a simple vista contra un fondo negro, de acuerdo con el ensayo de materia insoluble foránea. Las muestras se almacenaron a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C). La Tabla 1 resume la composición de las formulaciones sometidas a ensayo, y la Tabla 2 muestra los resultados obtenidos. Las muestras 1 y 4 a 12 se dan como referencia.

## ES 2 536 709 T3

Tabla 1: Composición de las formulaciones sometidas a ensayo

Núm. de muestra	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Anticuerpo anti-HM1.24 (mg/mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Polisorbato 80 (%)	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
Tipo de tampón	Ac	Ac	Ac	Ac	Fos	Fos	Fos	Fos	Cit	Cit	Cit	Cit
Conc. de tampón (mM)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
Cloruro de sodio (mM)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
pH	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Conc. FeCl <sub>3</sub> (µg/L)	0	10	100	1000	0	10	100	1000	0	10	100	1000

Ac: tampón acetato, Fos: tampón fosfato, Cit: tampón citrato

Tabla 2: Resultados del ensayo de materia insoluble foránea en muestras con suplemento de hierro (FeCl<sub>3</sub>)

Núm. de muestra	Tampón	Conc.	Inicial	1 día	4 días	5 días	6 días	7 días	8 días
1	Acetato	0 g/L	-	-	-	-	-	±	-
2		10 g/L	-	-	±	±	+	±	+
3		100 g/L	-	-	±	±	±	±	+
4		1,000 g/L	-	-	±	±	±	±	+
5	Fosfato	0 g/L	-	-	-	-	-	-	-
6		10 g/L	-	±	±	±	±	+	±
7		100 g/L	-	-	±	+	+	+	+
8		1,000 g/L	-	-	++	++	++	+++	+++
9	Cittrato	0 g/L	-	-	-	-	-	-	±
10		10 g/L	-	-	-	-	-	±	+
11		100 g/L	-	-	-	-	±	±	+
12		1,000 g/L	-	-	-	-	-	±	±

## ES 2 536 709 T3

no observada -----> altamente observada  
(Evaluación) (-) < (+) < (+) < (++) < (+++)

5 Como resulta evidente a partir de los resultados anteriores, las formulaciones de anticuerpos anti-HM1.24 preparadas en tampones acetato y citrato suprimieron significativamente la formación de materia insoluble visible en presencia de hierro, en comparación con la formulación preparada en tampón fosfato.

Ejemplo 2: Efectos de la adición de tensioactivo

10 En el ensayo de agitación, el ensayo de congelación-descongelación y el ensayo de estabilidad de almacenamiento de las formulaciones de anticuerpos anti-HM1.24 (2,5 a 10 mg/mL) se utilizaron Polisorbato 80, Polisorbato 20 y Poloxámero 188, para estudiar los efectos inducidos por agentes tensioactivos en las formulaciones.

15 Ensayo de estrés físico

Se estudiaron los efectos inducidos por tensioactivo sobre los estreses físicos (agitación y congelación-descongelación) en términos de partículas insolubles o formación de materia insoluble visible.

20 (1-1) Ensayo en disoluciones de 2,5 mg/mL

La evaluación se llevó a cabo como sigue. La Tabla 3 muestra la composición de las formulaciones sometidas a ensayo junto con los resultados obtenidos.

25 Muestra de ensayo: 2 mL por vial de 5 mL (Muestras 13-22)

Evaluación: Ensayo de partículas insolubles utilizando un tipo de protección contra la luz de un analizador de partículas automático (HIAC)

30 Condiciones de evaluación:

1. (i) Ensayo de agitación

Condiciones de agitación: 200 golpes/min. x 30 min.

Aparato de agitación: RECIPRO SHAKER SR-I

(Taiyo Scientific Industrial Co., Ltd.)

35

2. (ii) Ensayo de congelación-descongelación

Condiciones de congelación-descongelación: -80°C → 25°C x 1 ciclo

Tabla 3: Composición de las formulaciones sometidas a ensayo y resultados

Núm. muestra	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	
Anticuerpo anti-HM1.24 (mg/mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	
Polisorbato 80 (%)	0,025	0,01	0,0025	-	-	-	-	-	-	-	
Polisorbato 20 (%)	-	-	-	0,025	0,01	0,0025	-	-	-	-	
Poloxámero 188 (%)	-	-	-	-	-	-	0,025	0,01	0,0025	-	
Cloruro de sodio (mM)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	
Tampón acetato (mM)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	
pH	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	
Recuentos iniciales de partículas	≥ 10 μm	2	9	6	6	9	3	9	1	5	19
(Recuentos/mL)	≥ 25 μm	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
Después de	≥	78	49	30	66	89	74	131	32	44	5922

Núm. muestra		13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
agitar	10 $\mu\text{m}$										
(Recuentos/mL)	$\geq 25 \mu\text{m}$	3	1	0	1	1	0	1	0	1	1485
Después de la congelación-descongelación	$\geq 10 \mu\text{m}$	6	1	2	3	2	2	3	2	4	329
(Recuentos/mL)	$\geq 25 \mu\text{m}$	1	0	0	2	0	0	0	2	1	47

La Muestra 22 de la Tabla 3 se da como referencia.

Se encontró que los agentes tensioactivos utilizados (Polisorbato 80, Polisorbato 20, Poloxámero 188) producían un efecto significativo cuando se añadían en el intervalo de 0,0025% a 0,025%, en vista de la supresión de la formación de partículas insolubles o materia insoluble visible.

- 5 (1-2) Ensayo en disoluciones de 10 mg/mL
- La evaluación se llevó a cabo como sigue. La Tabla 4 muestra la composición de las formulaciones sometidas a ensayo junto con los resultados obtenidos.
- 10 Muestra de ensayo: 10 mL por vial de 20 mL (Muestras 23-28)

Evaluación:

- 15 1. (i) Ensayo de partículas insolubles utilizando un tipo de protector de luz de un analizador de partículas automático (HIAC)
2. (ii) Ensayo de contaminación insoluble de acuerdo con el método EP (contra un fondo negro)

Condiciones de la evaluación:

- 20 1. (i) Ensayo de agitación  
 Condiciones de agitación: 200 golpes/min. x 60 min.  
 Aparato de agitación: RECIPRO SHAKER SR-I  
 (Taiyo Científico Industrial Co., Ltd.)
2. (ii) Ensayo de congelación-descongelación  
 Condiciones de congelación-descongelación:  $-20^{\circ}\text{C} \Leftrightarrow 5^{\circ}\text{C}$  x 3 ciclos

Tabla 4: Composición de las formulaciones y los resultados ensayados

Núm. muestra		23	24	25	26	27	28
Anticuerpo anti-HM1.24 (mg/mL)		10	10	10	10	10	10
Polisorbato 80 (%)		0	0,00025	0,0025	0,025	0,05	0,1
Ácido acético (mM)		10	10	10	10	10	10
Cloruro de sodio (mM)		100	100	100	100	100	100
pH		6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Recuentos iniciales de partículas	$\geq 10 \mu\text{m}$	2	0	0	0	1	0
(Recuentos/mL)	$\geq 25 \mu\text{m}$	0	0	0	0	0	0
Después de agitar	$\geq 10 \mu\text{m}$	44079	0	0	0	0	4
(Recuentos/mL)	$\geq 25 \mu\text{m}$	15699	0	0	0	0	0
Después de la	$\geq 10 \mu\text{m}$	5054	1	0	0	0	0

ES 2 536 709 T3

Núm. muestra		23	24	25	26	27	28
congelación-descongelación (x 3 ciclos)							
(Recuentos/mL)	≥ 25 µm	333	0	0	0	0	0
Ensayo de contaminación insoluble	Inicial	-	-	-	-	-	-
	Agitado	+	-	-	-	-	-
	Congelado-descongelado (x 3 veces)	+	+	-	-	-	-
+: Observado, -: No observado La Muestra 23 en la Tabla 4 se da como referencia.							

Se encontró que el Polisorbato 80 producía un efecto cuando se añadía en el intervalo de 0,0025% a 0,1%, en vista de la supresión de la formación de materia insoluble visible y partículas insolubles.

5 (2) Ensayo de estabilidad de almacenamiento

Se sometió a ensayo el Polisorbato 80 para determinar su efecto inhibitor de la formación de materia insoluble visible dependiente del tiempo en disoluciones de anticuerpos anti-HM1.24 durante el almacenamiento a 5°C.

10 (2-1) Ensayo en disoluciones de 2,5 y 5,0 mg/mL

La evaluación se llevó a cabo como sigue. La Tabla 5 muestra la composición de las formulaciones sometidas a ensayo junto con los resultados obtenidos.

Muestra de ensayo: 5 mL por vial de 10 mL (Muestras 29-38)

15 Evaluación: Ensayo de contaminación insoluble de acuerdo con el método EP (contra un fondo negro)

Condiciones de almacenamiento: a 5°C durante 3 meses (5°C - 3M)

Tabla 5: Composición de las formulaciones sometidas a ensayo y resultados

Núm. muestra	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
Anticuerpo anti-HM1.24 (mg/mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Polisorbato 80 (%)	-	0,001	0,0025	0,01	0,025	-	0,002	0,005	0,02	0,05
Cloruro de sodio (mM)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Tampón acetato (mM)	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
pH	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0	6,0
Vial ID1	Inicial	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	3M	+	+	-	-	-	++	-	-	-
Vial ID2	Inicial	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3M	+	-	-	-	-	++	-	-	+
Vial ID3	Inicial	++	-	-	-	-	-	-	-	-
	3M	+	+	+	-	-	++	-	-	+
Vial	Inicial	-	-	-	-	-	-	-	-	-

## ES 2 536 709 T3

Núm. muestra		29	30	31	32	33	34	35	36	37	38
ID4	3M	+	+	-	-	-	++	+	+	-	-
Vial ID5	Inicial	-		-	-	-	-	-	-		-
	3M	+		-	-	-	++	+	-		-

++: altamente observado, +: poco observado, -: no observado  
Las muestras 29 y 34 de la Tabla 5 se dan como referencia.

5 Después del almacenamiento a 5°C durante 3 meses, se observó una notable formación de materia insoluble visible en las formulaciones que no contenían Polisorbato 80 (Muestras 29 y 34), mientras que se observó un efecto inhibitor significativo sobre la formación de contaminación cuando se añadía Polisorbato 80 a las formulaciones en el intervalo de 0,001% a 0,05%.

(2-2) Ensayo sobre disoluciones de 10 mg/mL

10 La evaluación se llevó a cabo como sigue. La Tabla 6 muestra la composición de las formulaciones sometidas a ensayo junto con los resultados obtenidos.

Muestra de ensayo: 10 mL por vial de 20 mL (Muestras 39-42)

Evaluación: Ensayo de materia insoluble foránea de acuerdo con el método EP (contra un fondo negro)

Condiciones de almacenamiento: a 5°C durante 3, 6 y 12 meses (5°C - 3, 6, 12 M)

15 Tabla 6: Composición de las formulaciones sometidas a ensayo y resultados

Núm. muestra		39	40	41	42
Anticuerpo anti-HM1.24 (mg/mL)		10	10	10	10
Polisorbato 80 (%)		0	0,005	0,025	0,05
Cloruro de sodio (mM)		100	100	100	100
Tampón acetato (mM)		10	10	10	10
pH		6,0	6,0	6,0	6,0
Ensayo de materia insoluble foránea	Inicial	-	-	-	-
	5°C - 3M	+	-	-	-
	5°C - 6M	+	-	-	-
	5°C - 12M	+	-	-	-

+: observado, -: no observado  
La Muestra 39 de la Tabla 6 se da como referencia.

Cuando se añadía a 0,005% o más, se encontró que el Polisorbato 80 producía un efecto significativo en la formación de materia insoluble visible.

20 Ejemplo 3: Dependencia del pH

Para confirmar el pH óptimo para el anticuerpo anti-HM1.24 en el intervalo de concentración de 2,5 a 10 mg/mL, se llevaron a cabo el ensayo de de resistencia al calor y el ensayo de estabilidad de almacenamiento.

25 Ensayo sobre formulaciones de 2,5 mg/mL

La evaluación se llevó a cabo como sigue. Las Tablas 7 y 8 muestran la composición de las formulaciones sometidas a ensayo y los resultados obtenidos, respectivamente.

Muestra de ensayo: 1 mL por vial de 5 mL (Muestras 43-47)  
 Evaluación: Ensayo de resistencia al calor, ensayo de estabilidad de almacenamiento  
 Condiciones de almacenamiento: a 50°C durante 3 meses (50°C - 3M) (GPC)  
 a 5°C durante 6 meses (5°C - 6M) (IEC)

5

Tabla 7: Composición de las formulaciones sometidas a ensayo

Núm. muestra	43	44	45	46	47
Anticuerpo anti-HM1,24 (mg/mL)	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
Tampón acetato (mM)	20	20	20	20	20
Cloruro de sodio (mM)	100	100	100	100	100
Polisorbato 80 (%)	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
pH	5,0	5,5	6,0	6,5	7,0

Tabla 8: Resultados de la evaluación del ensayo de resistencia al calor (50°C - 3M) y ensayo de estabilidad de almacenamiento (5°C - 6M)

Núm. muestra	pH	GPC (50°C - 3M)				IEG (5°C - 6M)
		Residuo (%)	Productos de agregación (%)	Producto de descomposición 1 (%)	Producto de descomposición 2 (%)	
43	5,0	53,7	35,8	ND	12,6	93,1
44	5,5	68,1	29,6	ND	9,5	92,8
45	6,0	76,6	19,6	4,9	8,2	92,5
46	6,5	78,2	15,2	8,9	7,8	90,7
47	7,0	77,8	12,4	11,4	8,5	88,0

10

(2) Ensayo sobre formulaciones de 10 mg/mL

La evaluación se llevó a cabo como sigue. Las Tablas 9 y 10 muestran la composición de las formulaciones sometidas a ensayo y los resultados obtenidos, respectivamente.

15

Muestra de ensayo: 1 mL por vial de 5 mL (Muestras 48-54)  
 Evaluación: ensayo de resistencia al calor  
 Condiciones de almacenamiento: a 50°C durante 1 mes (50°C - 1M) (GPC)  
 a 40°C durante 1 mes (40°C - 1M) (IEC)

20

Tabla 9: Composición de las formulaciones sometidas a ensayo

Núm. muestra	48	49	50	51	52	53	54
Anticuerpo anti-HM1.24 (mg/mL)	10	10	10	10	10	10	10
Polisorbato 80 (%)	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
Tampón acetato (mM)	10	10	10	10	10	10	10
Cloruro de sodio (mM)	100	100	100	100	100	100	100
pH	5,50	5,75	6,00	6,25	6,50	6,75	7,00

Tabla 10: Resultados de la evaluación del ensayo de resistencia al calor (50°C - 1M, 40°C - 1M)

Núm. muestra	pH	GPC (50°C - 1M)				IEC (40°C - 1M)
		Residuo (%)	Productos de agregación (%)	Producto de descomposición 1 (%)	Producto de descomposición 2 (%)	Pico principal (%)
48	5,50	79,1	14,5	5,4	2,5	67,2
49	5,75	84,2	11,3	5,8	2,3	64,4
50	6,00	85,6	10,0	5,9	2,2	62,5
51	6,25	85,5	10,1	6,1	2,2	58,5
52	6,50	86,8	8,6	6,5	2,2	57,8
53	6,75	87,1	7,9	6,8	2,2	57,0
54	7,00	86,5	7,7	7,6	2,5	55,0

- 5 Basándose en estos resultados, se confirma que, en el intervalo de pH 5,5 a pH 6,5, la formación de productos de agregación y la transición a heteromoléculas cargadas fueron suprimidas. Además, se confirmó lo siguiente.
- La formación de productos de agregación se aceleró en condiciones de pH más bajo.
  - La formación del producto de descomposición 2 no era sustancialmente dependiente del pH.
  - La formación del producto de descomposición 1 se aceleró a pH más alto.
- 10 ● El nivel de residuo del pico principal en la IEC fue mayor a menor pH.

Ejemplo 4: Dependencia de la concentración de cloruro de sodio

15 El ensayo de resistencia al calor se llevó a cabo para estudiar el efecto de la concentración de cloruro de sodio sobre la estabilidad del anticuerpo anti-HM1.24.

(1) Ensayo en formulaciones de 2,5 mg/mL

20 La evaluación se llevó a cabo como sigue. Las Tablas 11 y 12 muestran la composición de las formulaciones sometidas a ensayo y los resultados obtenidos, respectivamente.

Muestra de ensayo: 1 mL por vial de 5 mL (Muestras 55-58)

Evaluación: Ensayo de resistencia al calor

Condiciones de almacenamiento: a 50°C durante 3 meses (50°C - 3M) (GPC)

Tabla 11: Composición de las formulaciones sometidas a ensayo

Núm. muestra	55	56	57	58
Anticuerpo anti-HM1.24 (mg / mL)	2,5	2,5	2,5	2,5
Polisorbato 80 (%)	0,025	0,025	0,025	0,025
Tampón acetato (mM)	20	20	20	20
pH	6,0	6,0	6,0	6,0
Cloruro de sodio (mM)	23	100	200	500

Tabla 12: Resultados de la evaluación del ensayo de resistencia al calor (50°C - 3M)

Núm. muestra	NaCl (mM)	Residuo (%)	Productos de agregación (%)	Producto de descomposición 1 (%)	Producto de descomposición 2 (%)
55	23	75,4	17,6	ND	7,1
56	100	76,8	15,5	ND	7,6
57	200	76,5	15,8	ND	7,8
58	500	68,0	14,5	8,7	8,6

5 Cuando se añadió cloruro de sodio a la muestra de manera que la concentración final fuera de 500 mM, se observó un nivel de residuos reducido de moléculas monoméricas, mientras que las otras muestras no mostraron ninguna diferencia en la estabilidad.

(2) Ensayo sobre formulaciones de 10 mg/mL

10 La evaluación se llevó a cabo como sigue. Las Tablas 13 y 14 muestran la composición de las formulaciones sometidas a ensayo y los resultados obtenidos, respectivamente.

Muestra de ensayo: 1 mL por vial de 5 mL (Muestras 59-61)

Evaluación: Ensayo de resistencia al calor

15 Condiciones de almacenamiento: a 50°C durante 1 mes (50°C - 1M) (GPC)

Tabla 13: Composición de las formulaciones sometidas a ensayo

Núm. muestra	59	60	61
Anticuerpo anti-HM1.24 (mg/mL)	10	10	10
Polisorbato 80 (%)	0,05	0,05	0,05
Tampón acetato (mM)	10	10	10
pH	6,0	6,0	6,0
Cloruro de sodio (mM)	100	150	200

Tabla 14: Resultados de la evaluación del ensayo de resistencia al calor (50°C - 1M)

Núm. muestra	NaCl (mM)	Residuo (%)	Productos de agregación (%)	Producto de descomposición 1 (%)	Producto de descomposición 2 (%)
59	100	90,6	7,0	4,5	1,9
60	150	89,2	7,6	4,5	2,0
61	200	88,9	7,8	4,7	2,1

Durante el intervalo de concentración de cloruro de sodio (23 a 200 mM) sometido a ensayo, no hubo diferencias en la estabilidad de las formulaciones de anticuerpos anti-HM1.24.

Ejemplo 5: Dependencia de la concentración de ácido acético

5 El ensayo de resistencia al calor se llevó a cabo para estudiar el efecto de la concentración de ácido acético en la estabilidad del anticuerpo anti-HM1.24.

(1) Ensayo sobre formulaciones de 10 mg/mL

10 La evaluación se llevó a cabo como sigue. Las Tablas 15 y 16 muestran la composición de las formulaciones sometidas a ensayo y los resultados obtenidos, respectivamente.

Muestra de ensayo: 1 mL por vial de 5 mL (Muestras 59, 62 y 63)

Evaluación: Ensayo de resistencia al calor

Condiciones de almacenamiento: a 50°C durante 1 mes (50°C - 1M) (GPC)

15

Tabla 15: Composición de las formulaciones sometidas a ensayo

Núm. muestra	59	62	63
Anticuerpo anti-HM1.24 (mg/mL)	10	10	10
Polisorbato 80 (%)	0,05	0,05	0,05
Tampón acetato (mM)	10	20	50
pH	6,0	6,0	6,0
Cloruro de sodio (mM)	100	100	100

Tabla 16: Resultados de la evaluación del ensayo de resistencia al calor (50°C - 1M)

Núm. muestra	Ácido acético (mM)	Residuo (%)	Productos de agregación (%)	Producto de descomposición 1 (%)	Producto de descomposición 2 (%)
59	10	90,6	7,0	4,5	1,9
62	20	89,7	7,9	4,8	2,1
63	50	89,0	8,3	4,9	2,1

20

Basándose en estos resultados, se confirmó que las formulaciones de anticuerpos anti-HM1.24 eran estables en el intervalo de ácido acético 10 a 50 mM.

25

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. El uso de ácido acético para suprimir la formación de materia insoluble visible y/o partículas insolubles causada por iones Fe presentes en una formulación en disolución que contiene anticuerpos, en donde la formulación en disolución que contiene anticuerpos comprende ácido acético y un agente tensioactivo como estabilizadores, en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 o un anticuerpo anti-antígeno HM1.24 y en donde la concentración de ácido acético está en el intervalo de 5 a 100 mM.
- 10 2. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la concentración de ácido acético está en el intervalo de 10 a 50 mM.
3. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente tensioactivo es Polisorbato 80 o 20, o un poloxámero.
- 15 4. El uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde la concentración del agente tensioactivo está en el intervalo de 0,01 a 10 mg/mL.
5. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende además cloruro de sodio.
- 20 6. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el anticuerpo es un anticuerpo recombinante.
7. El uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo humano.
- 25 8. El uso de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde el anticuerpo es un anticuerpo de clase IgG.
9. El uso de acuerdo con la reivindicación 8, en donde el anticuerpo de clase IgG es un anticuerpo de clase IgG1.
- 30 10. El uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-antígeno HM1.24.
11. El uso de acuerdo con la reivindicación 10, en donde la formulación en disolución que contiene anticuerpo comprende de 10 a 50 mM de ácido acético y de 0,01 a 10 mg/mL de Polisorbato 80 como estabilizadores.

35