

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 553 987**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/34 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2004** **E 04807616 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.09.2015** **EP 1712240**

54 Título: **Preparación farmacéutica de base acuosa estable que contiene anticuerpo**

30 Prioridad:

25.12.2003 JP 2003431400

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

15.12.2015

73 Titular/es:

KYOWA HAKKO KIRIN CO., LTD. (100.0%)
1-6-1, OHTEMACHI, CHIYODA-KU
TOKYO, JP

72 Inventor/es:

ISHIKAWA, TOMOYOSHI;
UENO, AKIHIRO;
KIMURA, SATORU y
UEKI, YOSUKE

74 Agente/Representante:

MARTÍN BADAJOZ, Irene

ES 2 553 987 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

Preparación farmacéutica de base acuosa estable que contiene anticuerpo

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere a una formulación médica líquida estable que contiene un anticuerpo.

Antecedentes de la técnica

10 Con el avance reciente en la bioingeniería, el uso total de la tecnología de recombinación de ADN ha permitido la producción en masa de proteínas altamente puras para uso médico. Sin embargo, las proteínas difieren de las moléculas sintetizadas químicamente convencionales en cuanto a sus altos pesos moleculares y estructuras tridimensionales complicadas. El almacenamiento estable de una proteína en un estado tal que se mantenga su actividad biológica requiere una tecnología especial establecida en vista de las propiedades físicas de las proteínas. 15 En el caso de una formulación líquida que contiene una proteína que se mantiene estable, se requiere que se protejan muchos grupos funcionales diferentes contenidos en la proteína y que se mantenga su estructura de orden superior, que está implicada en su actividad. Los anticuerpos se encuentran entre las proteínas que son útiles desde un punto de vista médico. Un ejemplo de un método para estabilizar un anticuerpo es un método mediante el cual se estabiliza una proteína mediante liofilización tal como se divulga en la publicación de patente JP (Kohyo) n.º 2001/503781 A (documento WO98/22136). Sin embargo, la administración y el trabajo preliminar para formulaciones liofilizadas son complicados en centros clínicos. Por tanto, tal operación complicada impone cargas mentales y temporales a los profesionales sanitarios. Además, existe una preocupación en cuanto al riesgo de contaminación bacteriana debido a los procedimientos necesarios. En contraposición a las formulaciones liofilizadas, las 25 formulaciones en disolución requieren un trabajo preliminar sencillo antes de la administración. Así, se disminuye el riesgo de contaminación bacteriana. En los centros médicos, se desean formulaciones de proteína que sean estables en un estado en disolución.

Los siguientes documentos se refieren a formulaciones de proteína que son estables en un estado en disolución.

30 Cleland *et al.*, The Development of Stable Protein Preparation: A Close Look at Protein Aggregation, Deamination and Oxidation (Therapeutic Drug Carrier System vol. 10, n.º 4, 1993, págs. 307-377) proporciona una visión general referente a la degradación de proteínas y opiniones sobre medidas para reducir la degradación de proteínas. Sin embargo, este documento no divulga que una formulación médica líquida de un anticuerpo no contenga ninguna sal, ni divulga un tampón glutamato o un tampón citrato con un pH de entre 5,0 y 6,0 usado en ese documento.

El documento WO98/56418 divulga una formulación médica líquida no liofilizada que contiene un anticuerpo terapéuticamente eficaz, un tampón acetato, un tensioactivo y un poliol. Sin embargo, el documento no divulga que el ácido glutámico o ácido cítrico sea adecuado como agente tamponante para mantener el pH.

40 La patente JP n.º 2547556 divulga una formulación de γ -globulina que contiene un tampón acetato y sorbitol. Sin embargo, el documento no divulga que un agente tamponante para mantener el pH contenga ácido glutámico o ácido cítrico. Además, el documento no divulga que la adición de un tensioactivo sea adecuada.

45 El documento WO97/04801 divulga una formulación liofilizada adecuada para administración subcutánea después de reconstituirse. Sin embargo, el documento no divulga ni que la formulación sea una formulación no liofilizada ni que se use ácido glutámico o ácido cítrico con un pH de entre 5,0 y 6,0 como agente tamponante para mantener el pH.

50 Una "formulación estable" no contiene componentes que sean tóxicos para un paciente al que se le administra la formulación. Además, tal formulación contiene un principio activo que conserva su estabilidad química y/o física y/o biológica durante el almacenamiento a través de la adición de un aditivo distinto del principio activo, que no perturba la homeostasis del paciente en la medida de lo posible. "Aditivos distintos del principio activo, que no perturban la homeostasis del paciente en la medida de lo posible" significa una sustancia con seguridad que se ha confirmado 55 suficientemente basándose en el rendimiento terapéutico anterior real o una sustancia con seguridad que puede predecirse suficientemente a través de la evaluación de la toxicidad para células o animales o mediante otros métodos incluso cuando la sustancia carece de rendimiento en la administración anterior real. Además, "mantener la homeostasis del paciente" significa que ningún aditivo distinto del principio activo tiene ninguna actividad biológica que sea inaceptable para un paciente y/o que tal aditivo es isotónico (que tiene esencialmente la misma presión osmótica que la de sangre humana), si es posible.

Se mide la estabilidad de proteínas mediante diversos métodos de análisis tal como se describe generalmente en New Protein Purification, Principles and Practice, redactado por RK Scopes, Springer-Verlag Tokyo, por ejemplo. Puede someterse a prueba la "estabilidad química" mediante la detección y cuantificación del estado químicamente 65 alterado de una proteína. Los ejemplos de alteraciones químicas incluyen: modificación del tamaño tal como corte que puede evaluarse mediante cromatografía de exclusión molecular o SDS-PAGE; cambios en la carga eléctrica

(provocados por desamidación, por ejemplo) que puede evaluarse mediante cromatografía de intercambio iónico; y cambios en estados hidrófilos/hidrófobos (provocados por oxidación, por ejemplo) que pueden evaluarse mediante cromatografía hidrófoba. "Estabilidad física" significa que no hay generación de materia extraña insoluble y/o turbidez y/o agregados, lo que puede evaluarse mediante inspección visual del color y/o la transparencia y/o cromatografía de exclusión molecular. La "estabilidad biológica" puede evaluarse sometiendo a prueba la actividad de unión a un antígeno. Tal actividad de unión puede evaluarse mediante cromatografía de exclusión molecular o ELISA, por ejemplo.

Los anticuerpos están incluidos entre las proteínas que son terapéuticamente útiles. Se ha intentado usar un anticuerpo que tiene la acción de inducir muerte celular o citotoxicidad a través de la unión a una proteína expresada en superficies celulares para el tratamiento de cáncer o similar. Actualmente, se usan anticuerpos monoclonales tales como un anticuerpo quimérico (rituximab) que selecciona como diana CD20 que es un receptor que existe en membranas celulares y un anticuerpo humanizado que selecciona como diana Her2/neu para enfermedades tales como tumores malignos, y se reconocen sus efectos terapéuticos. Tal como se divulga en el documento WO2003/033538, se cree que también es útil un anticuerpo monoclonal (anticuerpo anti-HLA-DR) contra HLA-DR que es un tipo de moléculas de clase II (CMH) de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH). Un anticuerpo se caracteriza por una semivida en sangre prolongada y alta especificidad frente a un antígeno, de modo que es particularmente útil como agente antineoplásico. Por ejemplo, en el caso de un anticuerpo que selecciona como diana un antígeno específico de tumor, se deduce que tal anticuerpo se acumula en tumores después de la administración. Así, puede esperarse que el sistema inmunitario ataque a las células cancerosas mediante citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) o citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). Además, la unión previa de un medicamento tal como un radionúclido o una sustancia citotóxica a un anticuerpo permite el suministro eficaz del medicamento unido a un sitio tumoral. Simultáneamente, también puede esperarse el alivio de los efectos secundarios por una reducción en la cantidad de medicamento que llega a otros tejidos no específicos. Cuando un antígeno específico de tumor tiene la actividad de inducir muerte celular o similar, se administra un anticuerpo que tiene actividad agonista. Además, cuando un antígeno específico de tumor está implicado en la proliferación y supervivencia celulares, se administra un anticuerpo que tiene actividad de neutralización. Así, se esperan la acumulación específica de tumor de un anticuerpo y la detención de la proliferación del tumor o la degeneración del tumor debido a una actividad del anticuerpo. Tal como se describió anteriormente, se cree que un anticuerpo sería apropiado para su uso como agente antineoplásico por sus características.

Además, una molécula de clase II (CMH) de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) se une a un fragmento peptídico de antígeno y entonces presenta tal fragmento peptídico de antígeno a una célula T cooperadora (CD4+) (célula "Th") (véase Babbin B. *et al.*, Nature (1985), 317, 359-361). Se ha notificado que un anticuerpo monoclonal específico para la molécula de CMH de clase II es un inhibidor selectivo muy fuerte en la respuesta inmunitaria de la célula Th *in vitro* (véase Baxevanis CN, *et al.*, Immunogenetics (1980), 11, 617-625). Desde el descubrimiento de tales anticuerpos monoclonales, se ha pensado que eran fármacos que podían usarse para la terapia de inmunosupresión selectiva para enfermedades autoinmunitarias tales como reumatismo crónico. Estudios iniciales *in vivo* han revelado los efectos útiles de estos anticuerpos monoclonales sobre las respuestas hetero y autoinmunitarias de células Th (véanse Rosenbaum JT. *et al.*, J. Exp. Med. (1981), 154, 1694-1702; Waldor MK. *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1983), 80, 2713-2717; Jonker M. *et al.*, J. Autoimmun. (1988), 1, 399-414; Stevens HP. *et al.*, Transplant. Proc. (1990), 22, 1783-1784). Estudios adicionales usando primates han revelado que tales anticuerpos monoclonales suprimen reacciones de injerto contra huésped en trasplantes alogénicos (Billing R. & Chatterjee S. (1983), Transplant. Proc., 15, 649-650; Jonker M. *et al.*, Transplant Proc. (1991), 23, 264-265). Actualmente, agentes inmunosupresores tales como ciclosporina A y FK506 se usan clínicamente para suprimir el rechazo en el momento del trasplante de órganos. Estos agentes inmunosupresores son problemáticos porque suprimen de manera no específica reacciones inmunitarias de modo que provocan fuertes efectos secundarios. Tal como se divulga en el documento WO2003/033538, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal (anticuerpo anti-HLA-DR) contra HLA-DR, que es un tipo de molécula de clase II (CMH) de complejo mayor de histocompatibilidad (CMH), suprime de manera específica la inmunoreactividad mediada por HLA-DR. Por tanto, se cree que el anticuerpo anti-HLA-DR es muy útil. Por consiguiente, los anticuerpos son apropiados para su uso como agentes inmunosupresores que provocan menos efectos secundarios por sus características.

Tal como se describió anteriormente, se han estudiado muchos anticuerpos adecuados para uso terapéutico, se han desarrollado y aplicado de manera práctica, de modo que los anticuerpos se usan más frecuentemente en centros médicos. En tales circunstancias actuales, se requiere una formulación médica líquida estable caracterizada por una operación conveniente para la administración y el trabajo preliminar y un bajo riesgo de contaminación bacteriana. En particular, se requiere en la técnica una formulación médica líquida estable que contenga un anticuerpo adecuado para uso terapéutico, tal como un anticuerpo anti-HLA-DR.

Documento de patente 1: WO98/56418

Documento de patente 2: Patente JP n.º 2547556

Documento de patente 3: WO97/04801

Documento no de patente 1: Therapeutic Drug Carrier System vol. 10, n.º 4, 1993, págs. 307-377

Divulgación de la invención

Problemas que han de resolverse por la invención

Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación médica líquida estable que contiene un anticuerpo. De manera específica, un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación médica líquida estable que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo en un tampón glutamato, sorbitol, polisorbato 80, y tiene un pH de entre 4,0 y 6,0.

Medios para resolver los problemas

Como resultado de intensos estudios referentes a tal formulación médica líquida estable que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, los presentes inventores han tenido éxito en la estabilización del anticuerpo contenido en tal formulación médica líquida. Por tanto, los presentes inventores han completado la presente invención. La presente invención proporciona:

[1]. Una formulación médica líquida estable, que contiene en un tampón glutamato una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo, un sorbitol como agente de isotonización, y polisorbato 80 como tensioactivo y tiene un pH de entre 4,0 y 6,0.

[2]. La formulación médica líquida estable según [1], en la que la concentración del tampón es de entre 1 mM y 50 mM.

[3]. La formulación médica líquida estable según [1] o [2], que no contiene ninguna sal como agente de isotonización.

[4]. La formulación médica líquida estable según uno cualquiera de [1] a [3], en la que la presión osmótica es de entre 250 mOsm y 350 mOsm.

[5]. La formulación médica líquida estable según uno cualquiera de [1] a [4], en la que la concentración de polisorbato 80 es de entre 0,02 mg/ml y 0,10 mg/ml.

[6]. La formulación médica líquida estable según uno cualquiera de [1] a [5], en la que el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico.

[7]. La formulación médica líquida estable según uno cualquiera de [1] a [6], en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.

[8]. La formulación médica líquida estable según uno cualquiera de [1] a [7], en la que el anticuerpo es IgG.

[9]. La formulación médica líquida estable según [8], en la que la subclase de IgG es una cualquiera de IgG1, IgG2 o IgG4.

[10]. La formulación médica líquida estable según [8] o [9], en la que el aminoácido en la posición 331 (numeración basada en el sistema de numeración de la UE) en la región constante de cadena pesada se ha sustituido por Ser.

[11]. La formulación médica líquida estable según uno cualquiera de [1] a [10], en la que el anticuerpo es un anticuerpo contra HLA-DR.

[12]. La formulación médica líquida estable según uno cualquiera de [1] a [11], en la que el anticuerpo es un anticuerpo contra CD40.

[13]. La formulación médica líquida estable según uno cualquiera de [1] a [12], en la que la concentración del anticuerpo es de entre aproximadamente 1 y 200 mg/ml.

[14]. Una formulación médica líquida estable según uno cualquiera de [1] a [13], que tiene un pH de entre 4,5 y 6,0.

[15]. La formulación médica líquida estable según uno cualquiera de [1] a [14], que contiene al menos 1 tipo de agente de estabilización seleccionado del grupo que consiste en glicina, metionina, clorhidrato de cisteína, leucina, clorhidrato de lisina, clorhidrato de arginina, ácido aspártico, ácido ascórbico, EDTA, y sales de los mismos.

Según la presente divulgación, se proporciona una formulación médica líquida estable, que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo y ácido glutámico para mantener un pH de entre 4,0 y 6,0. La formulación es estable al menos a una baja temperatura (de 2°C a 8°C) durante 1 año o más. De manera específica, la

formulación es estable al menos a 25°C durante 3 meses y/o a 40°C durante 1 mes. La formulación también es estable contra la congelación y descongelación y la vibración.

La presente divulgación también se refiere a un producto dotado de un recipiente que conserva una formulación médica líquida estable que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo y un tampón glutamato o citrato para mantener un pH de entre 4,0 y 6,0.

Además, la presente divulgación se refiere a un método para estabilizar un anticuerpo en una formulación médica líquida, que comprende combinar una cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo y un tampón glutamato para mantener un pH de entre 4,0 y 6,0.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un método terapéutico, preventivo o de diagnóstico, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente eficaz de la formulación médica líquida divulgada en el presente documento a un mamífero. Cuando el anticuerpo es un anticuerpo anti-HLA-DR, los ejemplos de enfermedades que van a prevenirse, tratarse o diagnosticarse incluyen tumores tales como leucemia (incluyendo leucemia linfocítica crónica y leucemia linfocítica aguda), linfomas (incluyendo linfoma no Hodgkin, linfoma de Hodgkin, linfomas de células T, linfomas de células B, linfoma de Burkitt, linfoma maligno, linfoma difuso y linfoma folicular) y mielomas (incluyendo mieloma múltiple). Los ejemplos adicionales de enfermedades que van a prevenirse o tratarse incluyen inmunosupresión en el momento del trasplante de órganos. (Ha de prevenirse o tratarse el rechazo o EICH en el momento del trasplante de islotes del páncreas, riñón, hígado, corazón, o similar.) Los ejemplos adicionales de enfermedades que van a prevenirse o tratarse incluyen enfermedades autoinmunitarias (por ejemplo, reumatismo, arteriosclerosis, esclerosis múltiple, lupus eritematoso sistémico, trombocitemia idiopática y enfermedad de Crohn) y alergias tales como asma.

Estos aspectos los entienden claramente los expertos en la técnica.

Efecto de la invención

Tal como se describe en los ejemplos, una formulación que contiene un anticuerpo según la invención de la presente solicitud es estable, incluso cuando se almacena la formulación a 25°C o 40°C durante 1 mes. Es estable sin aumentos en la agregación, la degradación, un producto de desamidación o un producto de oxidación del anticuerpo durante tal periodo de almacenamiento. Además, también se confirmó que se conserva la actividad biológica del anticuerpo. Tal como se muestra en los ejemplos, el anticuerpo en la formulación se mantiene de manera estable a una temperatura de almacenamiento general de 25°C o menos ajustando el pH de la formulación médica líquida entre 4,0 y 6,0.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra cambios en la cantidad de agregación cuando se almacena a 25°C o 40°C cada formulación médica líquida que contiene un anticuerpo anti-HLA-DR. Se midió la cantidad de agregación mediante HPLC de exclusión molecular. Los resultados muestran que una formulación de tampón glutamato y una formulación de tampón citrato eran estables.

La figura 2 muestra cambios en la cantidad de agregación cuando se almacenó cada formulación médica líquida que contiene un anticuerpo anti-HLA-DR a 25°C o 40°C. Se midió la cantidad de agregación mediante HPLC de exclusión molecular. Los resultados muestran que una formulación de tampón glutamato era estable a un pH de entre 4,0 y 6,0.

La figura 3 muestra cambios en la cantidad de degradación cuando se almacenó cada formulación médica líquida que contiene un anticuerpo anti-HLA-DR a 25°C o 40°C. Se midió la cantidad de degradación mediante HPLC de exclusión molecular.

La figura 4 muestra cambios en la cantidad de un producto de desamidación cuando se almacenó cada formulación médica líquida que contiene un anticuerpo anti-HLA-DR a 25°C o 40°C. Se midió la cantidad del producto de desamidación mediante HPLC de intercambio catiónico.

La figura 5 muestra cambios en la cantidad de un producto de oxidación en un sitio Fc cuando se almacenó cada formulación médica líquida que contiene un anticuerpo anti-HLA-DR a 25°C o 40°C. Se midió la cantidad de producto de oxidación en el sitio Fc mediante HPLC hidrófoba. Los resultados muestran que una formulación de tampón glutamato era estable a un pH de entre 4,0 y 6,0.

La figura 6 muestra cambios en la cantidad de agregación después de congelarse y descongelarse repetidamente cada formulación médica líquida que contiene un anticuerpo anti-HLA-DR. Se midió la cantidad de agregación mediante HPLC de exclusión molecular. Los resultados muestran que una formulación que contiene un sorbitol como agente de isotonización era estable.

La figura 7 muestra cambios en la cantidad de agregación cuando se almacena cada formulación médica líquida que contiene un anticuerpo antagonista anti-CD40 a 25°C. Se midió la cantidad de agregación mediante HPLC de exclusión molecular. Los resultados muestran que una formulación de tampón glutamato era estable a un pH de entre 4,0 y 6,0.

La figura 8 muestra cambios en la cantidad de degradación cuando se almacena cada formulación médica líquida que contiene un anticuerpo antagonista anti-CD40. Se midió la cantidad de degradación mediante HPLC de exclusión molecular. Los resultados muestran que una formulación de tampón glutamato era estable a un pH de entre 4,0 y 7,0.

Mejor modo de llevar a cabo la invención

La presente invención se explica en detalle tal como sigue.

“Formulación médica líquida” incluida en esta solicitud de patente significa una formulación en la que: un principio activo que es un anticuerpo que tiene efectos médicos está en la forma de estar disuelto en una disolución líquida; la forma permite que el principio activo sea claramente eficaz en la disolución; y la formulación no contiene ningún componente adicional que pueda perturbar la homeostasis del paciente al que se le administra la formulación. En este caso, “permite que el principio activo sea claramente eficaz” significa que el principio activo contenido mantiene su actividad y no pierde sus efectos médicos.

“Aditivo distinto del principio activo, que no perturba la homeostasis del paciente en la medida de lo posible” significa una sustancia con seguridad que se ha confirmado suficientemente mediante un rendimiento terapéutico anterior real o una sustancia con seguridad que puede predecirse suficientemente a través de la evaluación de la toxicidad frente a células o animales o mediante otros métodos incluso cuando la sustancia carece de rendimiento en administración anterior real. De manera específica, la formulación médica líquida de la presente invención puede contener un principio activo que es un anticuerpo que tiene efectos médicos y otros aditivos médica y farmacéuticamente aceptables. Además, “mantener la homeostasis del paciente” significa que ningún aditivo distinto del principio activo tiene ninguna actividad biológica que sea inaceptable para un paciente y/o que tal aditivo es isotónico (esencialmente que tiene la misma presión osmótica que la de la sangre humana), si es posible.

“Formulación estable” significa una formulación en la que un principio activo que conserva su estabilidad química y/o física y/o biológica durante el almacenamiento. Preferiblemente, la formulación es estable al menos a una baja temperatura (de entre 2°C y 8°C) durante 1 año o más, de manera específica preferiblemente a 25°C durante al menos 3 meses y/o a 40°C durante al menos 1 mes. Tal formulación también es estable frente a la congelación y descongelación, irradiación con luz y vibración. Se mide la estabilidad de proteínas mediante diversos métodos de análisis. La “estabilidad química” puede someterse a prueba mediante la detección y cuantificación del estado químicamente alterado de una proteína. Los ejemplos de alteraciones químicas incluyen: modificación del tamaño tal como corte que puede evaluarse mediante cromatografía de exclusión molecular o SDS-PAGE; cambios en la carga eléctrica (provocados por desamidación, por ejemplo) que pueden evaluarse mediante cromatografía de intercambio iónico; y cambios en estados hidrófilos/hidrófobos (provocados por oxidación, por ejemplo) que pueden evaluarse mediante cromatografía hidrófoba. “Estabilidad física” significa que no hay materia extraña insoluble y/o no se generan turbidez y/o agregados. Tal estabilidad física puede evaluarse mediante inspección visual del color y/o la transparencia y/o cromatografía de exclusión molecular. La “estabilidad biológica” puede evaluarse sometiendo a prueba la actividad de unión a un antígeno. Tal actividad de unión puede evaluarse mediante cromatografía de exclusión molecular o ELISA, por ejemplo. Cuando un anticuerpo no está alterado química ni físicamente, el anticuerpo conserva su estabilidad biológica. Por consiguiente, cuando un anticuerpo en una formulación conserva su estabilidad química y estabilidad física, puede afirmarse que la formulación es estable. De manera específica, puede confirmarse que una formulación es estable o no midiendo la presencia o ausencia de alteraciones del anticuerpo contenido en cuanto a las propiedades químicas y físicas. En el caso de una formulación estable, la agregación, la degradación, un producto de desamidación, un producto de oxidación, o similar del anticuerpo contenido no aumenta durante el almacenamiento hasta un nivel que reduzca los efectos médicos de la formulación. Además, no se observa materia extraña insoluble ni turbidez. En el caso de la formulación estable de la presente invención, la agregación, la degradación, un producto de desamidación o un producto de oxidación del anticuerpo contenido no aumenta hasta un nivel que reduzca los efectos médicos de la formulación, incluso cuando se almacena la formulación al menos a una baja temperatura (de entre 2°C y 8°C) durante 1 año o más, al menos a 25°C durante 3 meses, o a 40°C durante 1 mes. Además, incluso cuando la formulación se congela y se descongela o se hace vibrar, la agregación, la degradación, un producto de desamidación o un producto de oxidación del anticuerpo contenido no aumenta hasta un nivel que reduzca los efectos médicos de la formulación. La agregación del anticuerpo contenido en la formulación estable de la presente invención no aumenta durante el almacenamiento. Por ejemplo, cuando se almacena la formulación a 25°C o 40°C durante 1 mes y entonces se mide tal producto mediante HPLC de exclusión molecular, se desea una pequeña razón de agregación con respecto a anticuerpo en la formulación. Además, la degradación del anticuerpo contenido en la formulación estable de la presente invención no aumenta mucho durante el almacenamiento. Por ejemplo, cuando se almacena la formulación a 25°C o 40°C durante 1 mes, se desea una pequeña razón de degradación con respecto a anticuerpo en la formulación. Además, la cantidad del producto de desamidación del anticuerpo en la formulación estable de la presente invención no

aumenta mucho durante el almacenamiento. Por ejemplo, cuando se almacena la formulación a 25°C o 40°C durante 1 mes, se desea una pequeña razón de producto de desamidación con respecto a anticuerpo en la formulación. Además, el producto de oxidación en el sitio Fc del anticuerpo en la formulación estable de la presente invención no aumenta mucho durante el almacenamiento. Por ejemplo, cuando se almacena la formulación a 25°C o 40°C durante 1 mes, se desea una pequeña razón del producto de oxidación en el sitio Fc con respecto a anticuerpo en la formulación.

“Cantidad terapéuticamente eficaz” de un anticuerpo en la presente invención indica una cantidad eficaz para prevenir o tratar enfermedades, cuando el anticuerpo es eficaz para tratar tales enfermedades. “Enfermedad” significa una enfermedad con síntomas arbitrarios con respecto a qué beneficios pueden obtenerse mediante el tratamiento usando un anticuerpo. Los ejemplos de tal enfermedad incluyen enfermedades o dolencias crónicas y agudas incluyendo estados patológicos que son factores predisponentes para enfermedades de mamíferos. Una cantidad terapéuticamente eficaz de este tipo de un anticuerpo que existe en la formulación se determina en vista de la dosis y la forma de dosificación deseables, por ejemplo. Una concentración de anticuerpo ilustrativa en la formulación es de entre aproximadamente 1 mg/ml y aproximadamente 200 mg/ml, preferiblemente entre aproximadamente 5 mg/ml y aproximadamente 50 mg/ml, y lo más preferiblemente de aproximadamente 10 mg/ml y/o aproximadamente 20 mg/ml, por ejemplo.

Un “anticuerpo” incluido en esta solicitud de patente se usa en el sentido más amplio. En particular, los ejemplos de tal anticuerpo incluyen un anticuerpo monoclonal, un anticuerpo policlonal, un anticuerpo multiespecífico y un fragmento de anticuerpo, siempre que el fragmento conserve la actividad biológica deseada.

La presente invención se refiere a una formulación médica líquida estable que contiene un anticuerpo. El anticuerpo en la formulación se prepara usando una tecnología que puede usarse para la producción de anticuerpos en la técnica. De manera específica, tal tecnología implica las etapas de (1) purificar un biopolímero que va a usarse como inmunógeno y/o preparar células que expresan de manera excesiva una proteína antigénica que va a usarse como inmunógeno en las superficies celulares, (2) inmunizar animales con tal antígeno inyectándose a los animales, extraerles sangre, someter a ensayo el título de anticuerpos, determinar el momento de la escisión del bazo o similar, y luego preparar células productoras de anticuerpos, (3) preparar células de mieloma (mieloma), (4) fusionar las células productoras de anticuerpos al mieloma, (5) seleccionar un grupo de hibridomas que produzcan un anticuerpo diana, (6) permitir la división en clones celulares individuales (clonación), (7) cultivar el hibridoma para producir un anticuerpo monoclonal en grandes cantidades o generar animales a los que se ha trasplantado el hibridoma, si es necesario, (8) clonar un gen que codifica para un anticuerpo humano monoclonal a partir de una célula productora de anticuerpos tal como el hibridoma, incorporar el producto resultante en un vector apropiado, introducir el vector en un huésped (por ejemplo, líneas celulares de mamífero, *Escherichia coli*, células de levadura, células de insecto o células vegetales), y por tanto preparar un anticuerpo recombinante producido con el uso de tecnología de recombinación génica, (9) purificar el anticuerpo así obtenido, y (10) examinar la actividad fisiológica y la especificidad de reconocimiento del anticuerpo monoclonal así producido, sometiendo a prueba la propiedad del anticuerpo como reactivo de marcaje, o similar.

Un ejemplo de tal anticuerpo monoclonal incluido en el presente documento comprende una cadena pesada y/o una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos derivada de cada secuencia de aminoácidos de una cadena pesada y/o una cadena ligera que componen un anticuerpo mediante delección, sustitución o adición de 1 o varios aminoácidos. Tal alteración parcial de aminoácidos (delección, sustitución, inserción o adición) tal como se describió anteriormente puede llevarse a cabo con referencia a la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo contenido en una formulación de la presente invención mediante la alteración parcial de la secuencia de nucleótidos que codifica para la secuencia de aminoácidos. Tal alteración parcial de una secuencia de nucleótidos puede introducirse mediante un método convencional usando la conocida mutagénesis específica de sitio (Proc Natl Acad Sci U.S.A., 1984, vol. 81: 5662). En este caso, “anticuerpo” significa una inmunoglobulina en la que todas las regiones incluyendo la región variable de cadena pesada, la región constante de cadena pesada, la región variable de cadena ligera y la región constante de cadena ligera que componen la inmunoglobulina derivan de un gen que codifica para una inmunoglobulina. Los anticuerpos incluidos en esta solicitud de patente pueden ser de cualquier clase de inmunoglobulina y tienen isotipos. Los ejemplos de tales anticuerpos incluyen además anticuerpos alterados con subclases recombinadas y anticuerpos alterados en los que el aminoácido en la posición 331 (numeración basada en el sistema de numeración de la UE (véase Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication n.º 91-3242)) en la región constante de cadena pesada se ha sustituido por Ser para dar IgG1Ser o IgG2Ser. Además, los anticuerpos que también están incluidos en el presente documento tienen efectos terapéuticos potenciados adicionalmente frente a enfermedades tales como cáncer a través de la unión con: un radionúclido tal como yodo, itrio, indio o tecnecio (J. W. Goding, Monoclonal Antibodies: principles and practice, 1993 Academic Press); una toxina bacteriana tal como toxina piocianica, toxina diftérica o lisina; un agente quimioterápico tal como metotrexato, mitomicina o calicheamicina (D. J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies., 1998 T. J. International Ltd.; M. L. Grossbard, Monoclonal Antibody-Based Therapy of Cancer, 1998 Marcel Dekker Inc.); o un fármaco tal como maitansinoide (Chari *et al.*, Cancer Res., 1992, Vol. 52: 127; Liu *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 1996, vol. 93: 8681). Los fragmentos funcionales de tales anticuerpos también están incluidos en el presente documento. “Fragmento funcional” significa una parte (fragmento parcial) de un anticuerpo y significa un fragmento que conserva 1 o más acciones de un anticuerpo sobre un antígeno. Los ejemplos específicos de tal fragmento

funcional incluyen F(ab')₂, Fab', Fab, Fv, Fv con enlaces disulfuro, Fv de cadena sencilla (scFv), diacuerpo, y polímeros de los mismos (D. J. King, Applications and Engineering of Monoclonal Antibodies, 1998, T. J. International Ltd.). Alternativamente, "fragmento funcional" significa un fragmento de un anticuerpo y puede unirse a un antígeno. Un anticuerpo que va a formularse es preferiblemente esencialmente puro y es de manera deseable esencialmente homogéneo (de manera específica, no contiene ninguna proteína contaminada o similar). Un anticuerpo "esencialmente puro" es uno que representa al menos aproximadamente el 90% en peso y preferiblemente al menos aproximadamente el 95% en peso del peso total de una composición que contiene el anticuerpo. Un anticuerpo "esencialmente homogéneo" anticuerpo es uno que representa al menos aproximadamente el 99% en peso del peso total de una composición que contiene el anticuerpo.

Un anticuerpo incluido en esta solicitud de patente es preferiblemente un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quimérico. Además, tal anticuerpo es preferiblemente IgG, en el que preferiblemente la subclase de IgG es una cualquiera de IgG1, IgG2 o IgG4. Además, IgG puede tener una secuencia de aminoácidos de una región constante, de la que una parte de esa secuencia se ha sometido a delección y/o sustitución y/o inserción de aminoácido mediante alteración génica parcial. Además, un anticuerpo incluido en el presente documento es más preferiblemente un anticuerpo humano monoclonal contra HLA-DR. Todavía más preferiblemente, tal anticuerpo es un anticuerpo monoclonal humano anti-HLA-DR divulgado en el documento WO2003/033538, tal como HD3, HD4, HD6, HD7, HD8, HD10, HD4G1, HD4G2Ser, HD4G4, HD8G1, HD8G1Ser, HD8G2, HD8G2Ser o HD8G4. De estos anticuerpos, los hibridomas que producen HD4, HD6, HD8 y HD10 se depositaron a nivel internacional según FERM BP-7771, FERM BP-7772, FERM BP-7773 y FERM BP-7774, respectivamente, el 11 de octubre de 2001, ante el Organismo Internacional para el Depósito de Patentes (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón), el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada). Además, los hibridomas que producen HD3 y HD7 se depositaron a nivel internacional según FERM BP-08534 y FERM BP-08536, respectivamente, el 31 de octubre de 2003, ante el mismo Organismo Internacional para el Depósito de Patentes. Además, esta solicitud de patente incluye además anticuerpos monoclonales humanos contra CD40. Los ejemplos preferibles de tales anticuerpos monoclonales incluyen: anticuerpos antagonistas anti-CD40 divulgados en el documento WO2002-088186, tales como KM281-1-10, KM281-2-10-1-2, KM283-5, KM225-2-56, KM292-1-24, KM341-6-9, 4D11, 5H10, 11E1, 5G3, 3811, 3411, 3417 y F4-465; y anticuerpos agonistas anti-CD40 tales como KM302-1, KM341-1-19, KM643-4-11, 2053, 2105, 3821, 3822, 285, 110, 115, F1-102, F2-103, F5-77 y F5-157. De estos, los clones de hibridoma KM302-1, KM281-1-10 y KM281-2-10-1-2 se depositaron a nivel internacional el 9 de mayo de 2001, según FERM BP-7578, FERM BP-7579 y FERM BP-7580, respectivamente; los clones KM341-1-19 y 4D11 se depositaron a nivel internacional el 27 de septiembre de 2001, según FERM BP-7759 y FERM BP-7758, respectivamente; y el clon 2105 se depositó a nivel internacional el 17 de abril 2002, según FERM BP-8024 ante el Organismo Internacional para el Depósito de Patentes (Tsukuba Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, Japón), el Instituto Nacional de Ciencia y Tecnología Industrial Avanzada) según el Tratado de Budapest. Además, los plásmidos que tienen regiones variables de cadena pesada y cadena ligera de F2-103, F5-77 y F5-157 se depositaron a nivel internacional el 19 de abril de 2001, según ATCC PTA-3302 (F2-103 cadena pesada), ATCC PTA-3303 (F2-103 cadena ligera), ATCC PTA-3304 (F5-77 cadena pesada), ATCC PTA-3305 (F5-77 cadena ligera), ATCC PTA-3306 (F5-157 cadena pesada) y ATCC PTA-3307 (F5-157 cadena ligera), respectivamente, y los clones de hibridoma F1-102 y F4-465 se depositaron a nivel internacional el 24 de abril de 2001, según ATCC PTA-3337 y ATCC PTA-3338, respectivamente, ante la Colección Americana de Cultivos Tipo, 10801 University Blvd., Manassas, Virginia, EE.UU. según el Tratado de Budapest.

"Aditivos" incluidos en la presente invención incluyen todos los componentes contenidos en una formulación médica líquida distintos del principio activo. Los ejemplos de tales aditivos incluyen un agente tamponante, un agente de ajuste del pH, un agente de isotonización, un agente de estabilización, un tensioactivo, un agente antiséptico, una suspensión y un emulsionante. Además, también está incluido un componente de aditivo de un único tipo que presenta 2 o más tipos de efectos.

"Agente tamponante" indica un aditivo que funciona frente a cambios moderados en el pH con el uso de la acción de componentes ácido-base conjugados. Un tampón de la presente invención tiene preferiblemente un intervalo de pH de entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 6,0, más preferiblemente entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 6,0, todavía más preferiblemente entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,0, e incluso todavía más preferiblemente entre aproximadamente 4,5 y aproximadamente 5,0. Alternativamente, tal tampón tiene un intervalo de pH de entre aproximadamente 5,0 y aproximadamente 6,0, preferiblemente entre 5,2 y 5,8, y tiene todavía más preferiblemente un pH de aproximadamente 5,5. Cuando se usa un tampón que tiene un pH dentro de tal intervalo de pH, cualquier anticuerpo puede ser estable a 25°C o menos, lo que es una temperatura de almacenamiento general para formulaciones médicas. Además, dependiendo de los tipos de anticuerpo, tal intervalo de pH estable puede variarse a una mayor temperatura, tal como de 40°C. Por ejemplo, una disolución tampón que se usa cuando se usa un anticuerpo anti-HLA-DR tiene preferiblemente un pH de entre aproximadamente 5,0 y 6,0, más preferiblemente entre 5,2 y 5,8, y todavía más preferiblemente un pH de aproximadamente 5,5. Una disolución tampón que se usa cuando se usa un anticuerpo antagonista anti-CD40 tiene preferiblemente un intervalo de pH de entre aproximadamente 4,0 y 6,0, más preferiblemente entre aproximadamente 4,5 y 6,0, y todavía más preferiblemente entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 5,0. Los ejemplos de un agente tamponante que tiene un pH que se ajusta dentro de tal intervalo de pH incluyen glutamato (por ejemplo, glutamato de sodio), acetato (por ejemplo, acetato de sodio), succinato (por ejemplo, succinato de sodio), gluconato, ácido cítrico, citrato,

ascorbato (por ejemplo, ascorbato de sodio), y otros tampones de ácidos orgánicos. Cuando se desea una formulación estable en cuanto a la congelación y descongelación, preferiblemente, el agente tamponante no es fosfato. En la presente divulgación, el agente tamponante es preferiblemente glutamato. La concentración del agente tamponante es de entre aproximadamente 1 mM y aproximadamente 50 mM, preferiblemente entre 5 mM y 20 mM, y de la manera más adecuada es de aproximadamente 10 mM, dependiendo de la capacidad tamponante y/o la presión osmótica deseada.

“Agente de isotonización” indica un agente con el que se prepara una formulación objeto para que tenga una presión osmótica que es esencialmente la misma que la de la sangre humana. Una formulación isotónica tiene una presión osmótica de entre aproximadamente 250 y 350 mOsm y la razón de su presión osmótica con respecto a la de la solución salina fisiológica (que se determina que es de 1) es de aproximadamente 1:1. Como agentes de isotonización, generalmente se usan sales o/y un poliol. Un agente de isotonización de la presente divulgación de manera preferiblemente esencial no contiene ninguna sal pero contiene preferiblemente poliol.

“Poliol” significa una sustancia que tiene una pluralidad de grupos hidroxilo. Los ejemplos de poliol incluyen un azúcar (azúcar reductor o no reductor), un alcohol de azúcar y ácido sacárico. Un poliol adecuado que se usa en el presente documento tiene un peso molecular de aproximadamente menos de 600 kD (por ejemplo, dentro de un intervalo entre aproximadamente 120 kD y aproximadamente 400 kD). “Azúcar reductor” significa un azúcar que es capaz de reducir iones metálicos o un azúcar que contiene un grupo hemiacetal que es capaz de reaccionar covalentemente con lisina dentro de una proteína y otros grupos amino. El “azúcar no reductor” no tiene tales propiedades. Los ejemplos de tal azúcar reductor incluyen fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y glucosa. Los ejemplos de tal azúcar no reductor incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, melecitosa y rafinosa. Los ejemplos de alcohol de azúcar incluyen manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol. Los ejemplos de ácido sacárico incluyen ácido L-glucónico y su sal de metal. Un poliol preferible es un azúcar no reductor que no tiene ningún efecto químico sobre un anticuerpo en una disolución. Cuando se desea que una formulación sea estable en cuanto a la congelación y descongelación, un poliol adecuado no se cristaliza a la temperatura de congelación (por ejemplo, de -20°C) lo que desestabiliza un anticuerpo dentro de una formulación. Un sorbitol es preferible por su excelente estabilidad en disolución.

Los ejemplos de un “tensioactivo” incluyen tensioactivos no iónicos tales como polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 y 80) y poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188). La cantidad de un tensioactivo que va a añadirse en el presente documento es una cantidad que reduce la agregación de anticuerpos formulados y/o minimiza la formación de partículas en una formulación y/o reduce la adsorción. Los ejemplos de un tensioactivo en la presente divulgación incluyen preferiblemente polisorbato y más preferiblemente polisorbato 80. Un tensioactivo puede estar presente en una formulación preferiblemente a una concentración de entre 0,02 mg/ml y 0,10 mg/ml y lo más preferiblemente a una concentración de aproximadamente 0,05 mg/ml.

“Agente de estabilización” significa un aditivo que potencia adicionalmente la estabilidad química y/o física y/o biológica de un principio activo durante el almacenamiento a través de su adición en una pequeña cantidad, preferiblemente a 10 mM o menos. La formulación de la presente invención puede contener un agente de estabilización. Tal agente de estabilización se selecciona del grupo que consiste en glicina, metionina, clorhidrato de cisteína, leucina, clorhidrato de lisina, clorhidrato de arginina, ácido aspártico, ácido ascórbico, EDTA, y sales de los mismos, por ejemplo.

Una formulación usada para la administración *in vivo* debe ser estéril. Esto puede lograrse fácilmente mediante filtración (mediante la cual se hace que pasen las formulaciones a través de membranas de filtración estériles) antes o después de la preparación de la formulación.

Se administra una formulación a un mamífero o preferiblemente un humano que necesita tratamiento usando un anticuerpo mediante un método conocido en una dosis en bolo o mediante la inyección continua a lo largo de un cierto periodo de tiempo, por ejemplo. De manera específica, se administra una formulación por una vía intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral, subcutánea, intraarticular, intrasínovial, intrasubaracnoidea, oral, local o mediante inhalación. En una realización preferida, se administra una formulación por vía intravenosa a un mamífero. Para tal propósito, se inyecta una formulación usando una jeringa, por ejemplo, o mediante una vía intravenosa de infusión por goteo.

En otra realización de la presente divulgación, se proporciona un producto dotado de un recipiente que contiene la formulación líquida de la presente invención. Si es necesario, también se proporcionan instrucciones para el uso de tal recipiente. Los ejemplos de un recipiente que es adecuado en el presente documento incluyen un frasco, un vial, una ampolla y una jeringa. Tal recipiente puede formarse usando diversos materiales tales como vidrio o plástico. Un recipiente ilustrativo es un vial de vidrio de 3 ml a 20 ml. Tal recipiente para almacenar una formulación tiene una etiqueta en el recipiente o incluye una etiqueta con el recipiente. Tal etiqueta muestra instrucciones de uso. Tal producto también puede contener otro agente tamponante, un diluyente, un filtro, una aguja, una jeringa y un prospecto con instrucciones de uso. Además, tal producto puede contener además otros materiales deseables en cuanto a la comercialización y en vista de los usuarios.

Ejemplos

La presente invención se entiende además suficientemente haciendo referencia a los siguientes ejemplos. Sin embargo, estos ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención.

Ejemplo 1 Formulaciones líquidas que contienen anticuerpo anti-HLA-DR (examen del agente tamponante)

Este ejemplo describe formulaciones líquidas que contienen cada una un anticuerpo (anticuerpo anti-HLA-DR) contra HLA-DR divulgado en el documento WO2003/033538.

En este ejemplo, se prepararon las formulaciones enumeradas en la tabla 1 y luego se evaluaron los efectos de los tipos de agente tamponante sobre la estabilidad del anticuerpo.

Tabla 1 Lista de formulaciones sometidas a este estudio

	Concentración de principio activo	Agente tamponante	Agente de isotonización	Tensioactivo	pH
1	Anticuerpo anti-HLA-DR 10 mg/ml	Ácido glutámico 10 mM	D-sorbitol 262 mM	Polisorbato 80 0,05 mg/ml	5,5
2		Ácido ascórbico 10 mM			
3		Ácido cítrico 10 mM			

(1) Preparación de muestras de formulación

Los reactivos usados en este examen fueron el anticuerpo anti-HLA-DR (aproximadamente 18 mg/ml, preparado según el método divulgado en el documento WO2003/0033538 en CMC R&D Laboratories, Kirin Brewery Co., Ltd.), L-glutamato de sodio monohidratado (el Código Farmacéutico Japonés), L-histidina (Farmacopea Japonesa), citrato de sodio monohidratado (Farmacopea Japonesa), ácido ascórbico (Farmacopea Japonesa), D-sorbitol (Farmacopea Japonesa), D-manitol (Farmacopea Japonesa), ácido clorhídrico (Farmacopea Japonesa), polisorbato 80 (Farmacopea Japonesa) y agua para inyección (Farmacopea Japonesa).

Se preparó previamente una disolución de placebo que no contenía ningún principio activo para cada muestra de formulación. Se preparó cada muestra de formulación sustituyendo la disolución de placebo de formulación por una disolución de anticuerpo anti-HLA-DR usando una columna NAP (producida por Pharmacia Biotech). Se ajustaron las concentraciones de proteínas a través de conversión usando el coeficiente de $\varepsilon = 1,4$ a la absorción de DO280 nm.

Se sometió cada muestra de formulación a filtración estéril a través de un filtro de 0,22 μm (producido por Millipore Corporation) dentro de un banco de trabajo limpio. Se rellenaron viales de vidrio de 5 ml (de acuerdo con la Farmacopea Japonesa) cada uno con 1 ml de la muestra dentro de un banco de trabajo limpio mientras se mantenía la esterilidad. Además, se sometieron disoluciones (placebo) que no contenían anticuerpo anti-HLA-DR (para la dilución de muestras que van a analizarse y para muestras de blanco para análisis) a filtración estéril a través de un filtro superior de frasco de 0,22 μm (NALGENE, producido por Nalge Nunc International Corporation) dentro de un banco de trabajo limpio.

(2) Condiciones de prueba

Se sometió cada muestra de formulación a tensión según las siguientes condiciones de modo que se realizase una evaluación de la estabilidad en este ejemplo. Prueba de termoestabilidad: Se almacenaron muestras de formulación en un incubador (producido por TABAI ESPEC) controlado a 40°C o 25°C durante 1 mes.

Además, se almacenó cada muestra en un recipiente de baja temperatura controlado a 4°C hasta el inicio del análisis después de cada caso de provisión de tensión.

(3) Método de análisis

Prueba de HPLC de exclusión molecular (SEC): Se calcularon el contenido de agregación y el contenido de degradación mediante el método de cromatografía de líquidos de alta velocidad de exclusión molecular. Si era necesario, se diluyó una muestra a 1 mg/ml seguido por la inyección de 15 μl de la muestra diluida a la temperatura atmosférica. Se realizó la separación usando una columna TSKgel G3000 SWXL 30 cm X 7,8 mm (producida por TOSOH CORPORATION) y fosfato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 7,0 como fase móvil a una velocidad de flujo de 0,5 ml/minuto durante 30 minutos de tiempo de análisis. Se realizó la detección a 215 nm. Además, los productos que eluyeron antes que el pico principal se definieron como agregaciones y los productos que eluyeron después que el pico principal se definieron como degradaciones.

Prueba de HPLC de intercambio catiónico (IEC): Se calculó el contenido de producto de desamidación mediante el

método de cromatografía de líquidos de alta resolución de intercambio catiónico. Se inyectaron 60 µl de una muestra que se había diluido de manera apropiada a 5 mg/ml. Se usó TSKgel BIOAssist S (producido por TOSOH CORPORATION) como columna de separación y se realizó la detección a 280 nm. Se usó ácido tartárico 20 mM a pH 4,5 como fase móvil A y se usaron ácido tartárico 20 mM y cloruro de sodio 1 M a pH 4,5 como fase móvil B. Se llevó a cabo el análisis en las condiciones de gradiente más adecuadas. Además, los productos deteriorados que eluyeron antes que el pico principal se definieron como productos de desamidación.

Prueba de HPLC hidrófoba (HIC): Se calculó el contenido de producto de oxidación (en el sitio Fc) mediante el método de cromatografía hidrófoba. A 250 µl de una muestra que se había diluido de manera apropiada a 1 mg/ml, se le añadieron fosfato de sodio 250 mM, L-cisteína 12,5 mM, 20 µl de una disolución líquida a pH 7,0 y 2,5 µl de una disolución de papaína 2,5 mg/ml, seguido por 2 horas de tratamiento enzimático a 37°C. Por tanto, se preparó una muestra de fragmento Fc. Se inyectaron 15 µl de la muestra de fragmento Fc así preparada. Se usó TSKgel Butyl-NPR 3,5 cm X 4,6 mm (producido por TOSOH CORPORATION) como columna de separación. Se realizaron el análisis y la detección a 215 nm. Se usó Tris-(hidroximetil)aminometano 20 mM a pH 7,0 como fase móvil A y se usaron Tris-(hidroximetil)aminometano 20 mM y sulfato de amonio 2 M a pH 7,0 como fase móvil B. Se llevó a cabo el análisis en las condiciones de gradiente más adecuadas. Además, los productos deteriorados que eluyeron antes que el pico principal se definieron como productos de oxidación.

Prueba de SDS-PAGE: Si era necesario, se diluyó una disolución de prueba a 200 µg/ml. Se añadió una disolución de tratamiento de muestra de Tris-SDS (producida por Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) a la disolución de muestra en la mitad del volumen del de la disolución de muestra, preparando de ese modo una disolución de muestra sin reducción. Además, se diluyó la disolución de muestra así obtenida si era necesario. Se añadió una disolución de tratamiento de muestra de Tris-SDSβME (producida por Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) a la disolución de muestra en la mitad del volumen del de la disolución de muestra, seguido por 15 minutos de calentamiento a 65°C. Por tanto, se preparó una disolución de muestra con reducción. Se llenó un baño de electroforesis con un tampón Tris/glicina/SDS (producido por Bio-Rad Laboratories) para electroforesis. Se aplicaron 5 µl de cada disolución de muestra a gel de poliacrilamida al 4%-20% (producido por Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.). Se realizó la electroforesis con una corriente constante de aproximadamente 20 mA hasta que el azul del azul de bromofenol contenido en cada disolución de muestra migró hasta las proximidades de la parte de extremo inferior del gel. Después de la electroforesis, se tiñó con plata el gel y luego se realizó la detección. Además, para determinar pesos moleculares aproximados de las muestras y los productos deteriorados, se sometieron a electroforesis simultáneamente marcadores de peso molecular (incluyendo proteínas de 200 kDa, 116,2 kDa, 66,3 kDa, 42,4 kDa, 30,0 kDa y 17,2 kDa).

Materia extraña insoluble y turbidez: Se determinó visualmente la presencia o ausencia de materia extraña insoluble y turbidez en una posición directamente por debajo de una fuente de luz blanca con un nivel de luz de aproximadamente 5000 lux.

Razón de presión osmótica: Se midió la presión osmótica usando un medidor automatizado de presión osmótica (OSMO STATION OM-6050 producido por ARKRAY, Inc.). Se calculó la razón de la presión osmótica con respecto a la presión osmótica medida simultáneamente de solución salina fisiológica.

pH: Se realizó la medición del pH usando un medidor automatizado de pH (por ejemplo, MP-230 producido por Mettler-Toledo International Inc.). Al inicio de la medición, se realizó una calibración usando disoluciones patrón con pH 4, pH 7 y pH 9 y luego se realizó la medición del pH.

(4) Resultados

La figura 1 muestra cambios en la cantidad de agregación cuando se almacenó cada formulación médica líquida a 25°C o 40°C. Se midió la cantidad de agregación mediante HPLC de exclusión molecular. Los resultados muestran que la formulación de tampón glutamato y la formulación de tampón citrato eran estables. Además, en cuanto a otros factores para el análisis (degradación, producto de desamidación y producto de oxidación en el sitio Fc), el tampón ascorbato era inestable, aunque la formulación de tampón glutamato y la formulación de tampón citrato eran estables.

Según la inspección visual, la formulación que contiene un tampón ascorbato era de color amarillo o marrón después del almacenamiento. Las formulaciones de tampón glutamato y citrato eran estables de manera que no se observaron cambios ni antes ni después del almacenamiento. Se observaron partículas finas insolubles en un pequeño grado en todas las muestras, y las muestras eran estables de manera que no se observaron cambios ni antes ni después del almacenamiento. Además, con respecto al pH medido tras el almacenamiento a 25°C o 40°C, se observó una tendencia de desplazamiento al lado de menor pH en la formulación de tampón ascorbato. Las formulaciones de tampón glutamato y citrato eran estables, de manera que no se observaron cambios ni antes ni después del almacenamiento. En todas las muestras, la razón de presión osmótica de cada muestra con respecto a solución salina fisiológica era siempre de 1:1. No se observaron cambios ni antes ni después de la provisión de tensión.

Se reveló que la formulación que contiene un tampón ascorbato usada en ese documento era muy inestable por sus niveles significativamente altos de muchos índices que indican deterioro tal como se reveló mediante medición.

- 5 Se demostró mediante este ejemplo que el ácido glutámico o ácido cítrico es adecuado como agente tamponante para estabilizar un anticuerpo. Lo más preferiblemente, se usa ácido glutámico como agente tamponante.

Ejemplo 2 Formulaciones líquidas que contienen anticuerpo anti-HLA-DR (examen del pH)

- 10 Este ejemplo describe formulaciones líquidas que contienen cada una un anticuerpo contra HLA-DR (anticuerpo anti-HLA-DR) divulgado en el documento WO2003/033538.

En este ejemplo, se prepararon las formulaciones enumeradas en la tabla 2 y luego se evaluó en detalle el pH de la formulación adecuado.

15 Tabla 2 Lista de formulaciones sometidas a este estudio

	Concentración de principio activo	Agente tamponante	Agente de isotonización	Tensioactivo	pH
20	Anticuerpo anti-HLA-DR 10 mg/ml	Ácido glutámico 10 mM	D-sorbitol 262 mM	Polisorbato 80 0,05 mg/ml	4,0
					5,0
					5,2
					5,5
					5,8
25					6,0
					7,0

(1) Materiales y métodos

- 30 Los materiales y métodos de análisis empleados en este ejemplo son iguales a los descritos en el ejemplo 1.

(2) Condiciones de prueba

- 35 Se sometió cada muestra de formulación a tensión según las siguientes condiciones de modo que se realizase una evaluación de la estabilidad en este ejemplo.

Prueba de termoestabilidad: Se almacenaron muestras de formulación en un incubador (producido por TABAI ESPEC) controlado a 40°C o 25°C durante 1 mes.

- 40 Prueba de congelación y descongelación: Se almacenó cada muestra de formulación alternativamente en un congelador a -20°C y un recipiente de baja temperatura a 4°C, de modo que se repitieron la congelación y descongelación 3 veces. Por tanto, se prepararon muestras. Además, se confirmó si cada muestra estaba completamente congelada o descongelada mediante inspección visual en cada ciclo.

- 45 Prueba de vibración forzada: Se llevó a cabo la prueba durante 20 minutos usando un aparato de prueba de vibración (RECIPRO SHAKER SR-II producido por Taiyo Scientific Industrial Co., Ltd.) en condiciones de vibración de 300 rpm y 40 mm, de modo que se prepararon muestras.

- 50 Prueba de fotoestabilidad: Bajo una lámpara fluorescente blanca controlada para tener aproximadamente 4000 lux, se irradió cada muestra con luz de modo que se alcanzase un nivel de luz de aproximadamente 1.200.000 lux.

(3) Resultados

- 55 La figura 2 muestra cambios en la cantidad de agregación cuando se almacenó cada formulación médica líquida a 25°C o 40°C. Se midió la cantidad de agregación mediante HPLC de exclusión molecular. Los resultados muestran que la formulación de tampón glutamato era estable a un pH de entre 4,0 y 6,0. Además, la figura 3 muestra cambios en la cantidad de degradación cuando se almacenó cada formulación médica líquida a 25°C o 40°C. Se midió la cantidad de degradación mediante HPLC de exclusión molecular. Los resultados muestran que la formulación de tampón glutamato era estable a un pH de entre 4,0 y 7,0 cuando la formulación se almacenó a 25°C.
- 60 Además, en el análisis de SDS-PAGE, se obtuvieron imágenes de electroforesis, con las que pudo confirmarse una tendencia similar a la presentada en los resultados obtenidos mediante HPLC de exclusión molecular. La figura 4 muestra cambios en la cantidad de un producto de desamidación cuando se almacenó cada formulación médica líquida a 25°C o 40°C. Se midió la cantidad del producto de desamidación mediante HPLC de intercambio catiónico. Los resultados muestran que la formulación de tampón glutamato era estable a un pH de entre 4,0 y 7,0 cuando la formulación se almacenó a 25°C. La figura 5 muestra cambios en la cantidad de un producto de oxidación en un sitio Fc cuando se almacenó cada formulación médica líquida a 25°C o 40°C. Se midió la cantidad de producto de
- 65

oxidación en el sitio Fc mediante HPLC hidrófoba. Los resultados muestran que la formulación de tampón glutamato era estable a un pH de entre 4,0 y 6,0. De manera específica, la formulación de tampón glutamato era estable de manera que casi no se observó materia extraña, turbidez ni materia extraña insoluble mediante inspección visual y casi no se observaron cambios en las razones de presión osmótica o los pH ni antes ni después de la provisión de tensión.

Como resultado de la prueba de fotoestabilidad, en todas las muestras, se observaron aumentos en las cantidades de la agregación, la degradación, el producto de desamidación y el producto de oxidación en el sitio Fc después de la irradiación con luz. Estos cambios pueden suprimirse con protección frente a la luz usando una caja de papel. Por tanto, las formulaciones pueden almacenarse de manera estable tomando algunas medidas de protección frente a la luz durante el almacenamiento. Además, las formulaciones eran estables de manera que no se observaron cambios como resultado de la congelación y descongelación ni antes ni después de la provisión de tensión de vibración en cuanto a todos los factores para el análisis.

Ejemplo 3 Formulaciones que contienen anticuerpo anti-HLA-DR (examen del agente de isotonización)

Este ejemplo describe formulaciones líquidas que contienen cada una un anticuerpo (anticuerpo anti-HLA-DR) contra HLA-DR divulgado en el documento WO2003/033538.

En este ejemplo, se prepararon las formulaciones enumeradas en la tabla 3 y luego se evaluaron los efectos de los agentes de isotonización en las formulaciones sobre la estabilidad de las formulaciones.

Tabla 3 Lista de formulaciones sometidas a este estudio

	Concentración de principio activo	Agente tamponante	Agente de isotonización	Tensioactivo	pH
1	Anticuerpo anti-HLA-DR 10 mg/ml	Ácido glutámico 10 mM	Sorbitol 262 mM	Polisorbato 80 0,05 mg/ml	5,5
2			Manitol 262 mM		

(1) Materiales y métodos

Los materiales y métodos de análisis empleados en este ejemplo son iguales a los descritos en el ejemplo 1.

(2) Condiciones de prueba

Se sometieron las muestras a tensión de manera que era igual que en el método descrito en el ejemplo 2.

(3) Resultados y consideración

La figura 6 muestra cambios en la cantidad de agregación después de que cada formulación médica líquida se congelase y descongelase repetidamente. Se midió la cantidad de agregación mediante HPLC de exclusión molecular. Los resultados muestran que la formulación que contiene sorbitol como agente de isotonización era estable. No se cristaliza el sorbitol ni siquiera en el momento de la congelación. Sin embargo, se cristaliza el manitol en el momento de la congelación, de modo que puede perturbar particularmente de manera física las moléculas de anticuerpo en el momento de la congelación. Se demostró que como poliol que se usa como agente de isotonización, una sustancia tal como un sorbitol que no se cristaliza en el momento de la congelación es más adecuada. Con respecto a otras condiciones de prueba, no se observaron diferencias en cuanto a la estabilidad. Además, los inventores llevaron a cabo un examen preliminar; es decir, una prueba para comparar una sal (cloruro de sodio) como agente de isotonización con un azúcar (sorbitol) como agente de isotonización. En una prueba de termoestabilidad, los presentes inventores tuvieron conocimiento de que las formulaciones son más estables en cuanto a las cantidades de agregación, degradación y productos de desamidación generados, cuando se usan azúcares.

Por tanto, el agente de isotonización de la presente divulgación preferiblemente no contiene esencialmente ninguna sal. Un poliol preferible es un azúcar no reductor que no tiene ningún efecto químico sobre un anticuerpo en una disolución. Cuando se desea que una formulación sea estable en cuanto a la congelación y descongelación, un agente de isotonización adecuado no se cristaliza a la temperatura de congelación (por ejemplo, -20°C), lo que desestabiliza un anticuerpo en la formulación. Un sorbitol es preferible porque tiene una excelente estabilidad en disolución.

Además, los presentes inventores también han usado polisorbato 80 como tensioactivo y estudiaron los efectos de su concentración sobre la estabilidad del anticuerpo. Como resultado, la adición del tensioactivo redujo la agregación del anticuerpo formulado. Sin embargo, se observó una tendencia, mediante la cual la cantidad de producto de oxidación en el sitio Fc del anticuerpo aumentaba mediante la adición de una cantidad excesiva (0,20 mg/ml o más)

de polisorbato 80. Así, es preferible que esté presente un tensioactivo en una formulación a una concentración de entre preferiblemente 0,02 mg/ml y 0,10 mg/ml y lo más preferiblemente de aproximadamente 0,05 mg/ml

Además, los presentes inventores llevaron a cabo un examen preliminar; es decir, un examen referente a la adición de un agente de estabilización (glicina, metionina, clorhidrato de cisteína, leucina, clorhidrato de lisina, clorhidrato de arginina, ácido aspártico, ácido ascórbico o EDTA), además de los ejemplos anteriores. Por ejemplo, se observó un efecto adicional de supresión de partículas finas insolubles con la adición de glicina. Además, se obtuvo un efecto de metionina en la supresión de la generación de un producto de oxidación. Por consiguiente, la presente invención también puede contener estos agentes de estabilización.

Además, los presentes inventores también han llevado a cabo un examen similar usando un anticuerpo IgG1 humano completo recombinante (anticuerpo anti-HSA) contra HSA. Por tanto, los presentes inventores han confirmado que la presente invención puede realizarse de manera satisfactoria con cualquier tipo de anticuerpo. Además, los presentes inventores han examinado formulaciones médicas líquidas usando el anticuerpo anti-HSA. De manera específica, los presentes inventores han examinado las formulaciones con concentraciones de anticuerpo que oscilan entre 1 mg/ml y 100 mg/ml. Por tanto, se ha revelado que los métodos revelados por la presente invención pueden realizarse de manera satisfactoria con cualquier concentración de anticuerpo.

Ejemplo 4 Preparación de formulaciones médicas que contienen anticuerpo

Los ejemplos de preparación de formulaciones médicas líquidas estables que contienen anticuerpos son tal como se describen a continuación.

Se transformaron células CHO con un gen que codifica para un anticuerpo (HD3, HD4, HD6, HD7, HD8, HD10, HD4G1, HD4G2Ser, HD4G4, HD8G1, HD8G1Ser, HD8G2, HD8G2Ser o HD8G4) usado en la presente invención de modo que fuese capaz de expresar y producir el anticuerpo. Se purificó cada uno de estos anticuerpos mediante el método divulgado en el documento WO2003/033538 a partir de los sobrenadantes de cultivo de las células CHO. Se concentró un anticuerpo así purificado a aproximadamente 10 mg/ml, seguido por la sustitución por un tampón glutamato 10 mM, D-sorbitol 262 mM y un tampón con un pH de 5,5 usando una membrana de ultrafiltración. Se concentró el anticuerpo contenido en una disolución recogida después de la sustitución del tampón y se preparó a una concentración de anticuerpo de 20 mg/ml. Se añadió polisorbato 80 a 0,05 mg/ml, de modo que se obtuvo una formulación médica líquida que contenía el anticuerpo a 20 mg/ml. Además, se diluyó la formulación de anticuerpo 20 mg/ml anterior con una formulación médica líquida (disolución de tampón glutamato 10 mM, D-sorbitol 262 mM y polisorbato 80 0,05 mg/ml) que no contenía anticuerpos. Por tanto, se prepararon formulaciones médicas líquidas con cualquier concentración de anticuerpo. La tabla 4 (A a N) a continuación enumera ejemplos de las composiciones de cada formulación médica líquida (1 ml) que contienen anticuerpos a una concentración de 10 mg/ml.

Tabla 4

A Composición de formulación médica líquida que contiene HD3

HD3	10 mg
Glutamato de sodio monohidratado	1,87 mg
Ácido clorhídrico	0,057 mg
D-sorbitol	47,73 mg
Polisorbato 80	0,05 mg
Agua destilada para inyección	(1 ml)

B Composición de formulación médica líquida que contiene HD4

HD4	10 mg
Glutamato de sodio monohidratado	1,87 mg
Ácido clorhídrico	0,057 mg
D-sorbitol	47,73 mg
Polisorbato 80	0,05 mg
Agua destilada para inyección	(1 ml)

C Composición de formulación médica líquida que contiene HD6

HD6	10 mg
Glutamato de sodio monohidratado	1,87 mg
Ácido clorhídrico	0,057 mg
D-sorbitol	47,73 mg
Polisorbato 80	0,05 mg
Agua destilada para inyección	(1 ml)

D Composición de formulación médica líquida que contiene HD7

5	HD7	10 mg
	Glutamato de sodio monohidratado	1,87 mg
	Ácido clorhídrico	0,057 mg
	D-sorbitol	47,73 mg
	Polisorbato 80	0,05 mg
	Agua destilada para inyección	(1 ml)

E Composición de formulación médica líquida que contiene HD8

10	HD8	10 mg
	Glutamato de sodio monohidratado	1,87 mg
	Ácido clorhídrico	0,057 mg
15	D-sorbitol	47,73 mg
	Polisorbato 80	0,05 mg
	Agua destilada para inyección	(1 ml)

F Composición de HD10-que contiene formulación médica líquida HD10

20	HD10	10 mg
	Glutamato de sodio monohidratado	1,87 mg
	Ácido clorhídrico	0,057 mg
	D-sorbitol	47,73 mg
25	Polisorbato 80	0,05 mg
	Agua destilada para inyección	(1 ml)

G Composición de formulación médica líquida que contiene HD4G1

30	HD4G1	10 mg
	Glutamato de sodio monohidratado	1,87 mg
	Ácido clorhídrico	0,057 mg
	D-sorbitol	47,73 mg
	Polisorbato 80	0,05 mg
	Agua destilada para inyección	(1 ml)

H Composición de formulación médica líquida que contiene HD4G2ser

35	HD4G2ser	10 mg
	Glutamato de sodio monohidratado	1,87 mg
	Ácido clorhídrico	0,057 mg
40	D-sorbitol	47,73 mg
	Polisorbato 80	0,05 mg
	Agua destilada para inyección	(1 ml)

I Composición de formulación médica líquida que contiene HD4G4

45	HD4G4	10 mg
	Glutamato de sodio monohidratado	1,87 mg
	Ácido clorhídrico	0,057 mg
	D-sorbitol	47,73 mg
50	Polisorbato 80	0,05 mg
	Agua destilada para inyección	(1 ml)

J Composición de formulación médica líquida que contiene HD8G1

55	HD8G1	10 mg
	Glutamato de sodio monohidratado	1,87 mg
	Ácido clorhídrico	0,057 mg
	D-sorbitol	47,73 mg
	Polisorbato 80	0,05 mg
	Agua destilada para inyección	(1 ml)

K Composición de formulación médica líquida que contiene HD8G1ser

60	HD8G1ser	10 mg
	Glutamato de sodio monohidratado	1,87 mg
	Ácido clorhídrico	0,057 mg
65	D-sorbitol	47,73 mg
	Polisorbato 80	0,05 mg
	Agua destilada para inyección	(1 ml)

L Composición de formulación médica líquida que contiene HD8G2

5	HD8G2	10 mg
	Glutamato de sodio monohidratado	1,87 mg
	Ácido clorhídrico	0,057 mg
	D-sorbitol	47,73 mg
	Polisorbato 80	0,05 mg
	Agua destilada para inyección	(1 ml)

M Composición de formulación médica líquida que contiene HD8G2ser

10	HD8G2ser	10 mg
	Glutamato de sodio monohidratado	1,87 mg
	Ácido clorhídrico	0,057 mg
15	D-sorbitol	47,73 mg
	Polisorbato 80	0,05 mg
	Agua destilada para inyección	(1 ml)

N Composición de formulación médica líquida que contiene HD8G4

20	HD8G4	10 mg
	Glutamato de sodio monohidratado	1,87 mg
	Ácido clorhídrico	0,057 mg
	D-sorbitol	47,73 mg
25	Polisorbato 80	0,05 mg
	Agua destilada para inyección	(1 ml)

Se esterilizaron las formulaciones líquidas así obtenidas usando membranas de filtración estériles. Con el uso de una máquina de llenado automatizada en condiciones estériles o similares, se llenaron viales esterilizados previamente con estas formulaciones. Se selló cada vial con un tapón de goma y luego se enroscó una tapa de aluminio de manera apretada, de modo que se obtuvo una formulación médica líquida que contiene anticuerpo estéril.

Ejemplo 5

Formulaciones líquidas que contienen anticuerpo anti-CD40

Este ejemplo describe formulaciones líquidas que contienen cada una un anticuerpo (anticuerpo antagonista anti-CD40) contra CD40 divulgado en el documento WO 02/088186.

En este ejemplo, se prepararon las formulaciones enumeradas en la tabla 5 y luego se evaluó el efecto del pH sobre la estabilidad del anticuerpo.

Tabla 5 Lista de formulaciones sometidas a este estudio

	Concentración de principio activo	Agente tamponante	Agente de isotonicación	Tensioactivo	pH
1	Anticuerpo antagonista anti-CD40 10 mg/ml	Ácido glutámico 10 mM	D-sorbitol 262 mM	Polisorbato 80 0,05 mg/ml	4,0
2					4,5
3					5,0
4					5,5
5					6,0
6					7,0

Preparación de muestras de formulación

Los reactivos usados en este examen fueron el anticuerpo antagonista anti-CD40 (aproximadamente 15 mg/ml, preparado según el método divulgado en el documento WO 02-088186 en CMC R&D Laboratories, Kirin Brewery Co., Ltd.), L-glutamato de sodio monohidratado (el Código Farmacéutico Japonés), D-sorbitol (Farmacopea Japonesa), hidróxido de sodio (Farmacopea Japonesa), ácido clorhídrico (Farmacopea Japonesa), polisorbato 80 (Farmacopea Japonesa) y agua para inyección (Farmacopea Japonesa).

Se preparó previamente una disolución de placebo que no contenía ningún principio activo para cada muestra de formulación. Se preparó cada muestra de formulación sustituyendo la disolución de placebo de formulación por un anticuerpo antagonista anti-CD40 usando una columna NAP (producida por Pharmacia Biotech). Se ajustaron las concentraciones de proteínas a través de conversión usando el coeficiente $\varepsilon = 1,65$ a la absorción de DO280 nm.

Se sometió cada muestra de formulación a filtración estéril a través de un filtro de 0,22 µm (producido por Millipore Corporation) dentro de un banco de trabajo limpio. Se rellenaron viales de vidrio de 5 ml (FUJI GLASS CO., LTD., White U-KB2CS (sin recubrimiento)) cada uno con 1 ml de la muestra dentro de un banco de trabajo limpio mientras se mantenía la esterilidad. Además, se sometieron disoluciones (placebo) que no contenían anticuerpo antagonista anti-CD40 (para la dilución de las muestras que van a analizarse y para muestras de blanco para el análisis) a filtración estéril a través de un filtro superior de frasco de 0,22 µm (NALGENE, producido por Nalge Nunc International Corporation) dentro de un banco de trabajo limpio.

Condiciones de prueba

Se sometió cada muestra de formulación a tensión según las siguientes condiciones de modo que se realizase una evaluación de la estabilidad en este ejemplo.

Prueba de termoestabilidad: Se almacenaron muestras de formulación en un incubador (producido por TABAI ESPEC) controlado a 40°C o 25°C durante 1 mes.

Además, se almacenó cada muestra en un recipiente de baja temperatura controlado a 4°C hasta el inicio del análisis después de cada caso de provisión de tensión.

Método de análisis

Prueba de HPLC de exclusión molecular (SEC): Se calcularon el contenido de agregación y el contenido de degradación mediante el método de cromatografía de líquidos de alta velocidad de exclusión molecular. Si era necesario, se diluyó una muestra a 1 mg/ml seguido por la inyección de 15 µl de la muestra diluida a la temperatura atmosférica. Se realizó la separación usando una columna TSKgel G3000 SWXL 30 cm X 7,8 mm (producida por TOSOH CORPORATION) y fosfato de sodio 20 mM y cloruro de sodio 500 mM a pH 7,0 como fase móvil a una velocidad de flujo de 0,5 ml/minuto durante 30 minutos de tiempo de análisis. Se realizó la detección a 215 nm. Además, los productos que eluyeron antes que el pico principal se definieron como agregaciones y los productos que eluyeron después que el pico principal se definieron como degradaciones.

Prueba de SDS-PAGE: Si era necesario, se diluyó una disolución de prueba a 200 µg/ml. Se añadió una disolución de tratamiento de muestra de Tris-SDS (producida por Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) a la disolución de muestra en la mitad del volumen del de la disolución de muestra, preparando de ese modo una disolución de muestra sin reducción. Además, se diluyó la disolución de muestra así obtenida si era necesario. Se añadió una disolución de tratamiento de muestra de Tris-SDSβME (producida por Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.) a la disolución de muestra en la mitad del volumen del de la disolución de muestra, seguido por 15 minutos de calentamiento a 65°C. Por tanto, se preparó una disolución de muestra con reducción. Se llenó un baño de electroforesis con un tampón Tris/glicina/SDS (producido por Bio-Rad Laboratories) para electroforesis. Se aplicaron 5 µl de cada disolución de muestra a gel de poliacrilamida al 4%-20% (producido por Daiichi Pure Chemicals Co., Ltd.). Se realizó la electroforesis con una corriente constante de aproximadamente 20 mA hasta que el azul del azul de bromofenol contenido en cada disolución de muestra migró hasta las proximidades de la parte de extremo inferior del gel. Después de la electroforesis, se tiñó con plata el gel y luego se realizó la detección. Además, para determinar pesos moleculares aproximados de las muestras y los productos deteriorados, se sometieron a electroforesis simultáneamente marcadores de peso molecular (incluyendo proteínas de 200,0 kDa, 116,2 kDa, 66,3 kDa, 42,4 kDa, 30,0 kDa y 17,2 kDa).

Razón de presión osmótica: Se midió la presión osmótica usando un medidor automatizado de presión osmótica (OSMO STATION OM-6050 producido por ARKRAY, Inc.). Se calculó la razón de la presión osmótica con respecto a la presión osmótica medida simultáneamente de solución salina fisiológica.

pH: Se realizó la medición del pH usando un medidor automatizado de pH (por ejemplo, MP-230 producido por Mettler-Toledo International Inc.). Al inicio de la medición, se realizó una calibración usando disoluciones patrón con pH 4, pH 7 y pH 9 y luego se realizó la medición del pH.

Resultados y consideración

La figura 7 muestra la cantidad de agregación cuando se almacenó cada formulación médica líquida a 25°C. Se midió la cantidad de agregación mediante HPLC de exclusión molecular. Los resultados muestran que las formulaciones médicas líquidas eran estables a un pH de entre 4,0 y 6,0. La figura 8 muestra la cantidad de degradación cuando se almacenó cada formulación médica líquida a 40°C. Se midió la cantidad de degradación mediante HPLC de exclusión molecular. Se detectó degradación en cantidades traza independientemente del pH. Además, en todas las muestras, los pH medidos tras el almacenamiento a 25°C o 40°C eran estables de manera que no se observaron cambios en el pH ni antes ni después del almacenamiento. En todas las muestras, la razón de presión osmótica con respecto a la de solución salina fisiológica era siempre de aproximadamente 1:1. No se

observaron cambios ni antes ni después de la provisión de tensión.

REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n m3dica l3quida estable, que contiene en un tamp3n glutamato una cantidad terap3uticamente eficaz de un anticuerpo, un sorbitol como agente de isotonicaci3n, y polisorbato 80 como tensioactivo y tiene un pH de entre 4,0 y 6,0.
2. Formulaci3n m3dica l3quida estable seg3n la reivindicaci3n 1, en la que la concentraci3n del tamp3n es de entre 1 mM y 50 mM.
3. Formulaci3n m3dica l3quida estable seg3n la reivindicaci3n 1 3 2, que no contiene ninguna sal como agente de isotonicaci3n.
4. Formulaci3n m3dica l3quida estable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la presi3n osm3tica es de entre 250 mOsm y 350 mOsm.
5. Formulaci3n m3dica l3quida estable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la concentraci3n de polisorbato 80 es de entre 0,02 mg/ml y 0,10 mg/ml.
6. Formulaci3n m3dica l3quida estable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el anticuerpo es un anticuerpo humano, un anticuerpo humanizado o un anticuerpo quim3rico.
7. Formulaci3n m3dica l3quida estable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el anticuerpo es un anticuerpo monoclonal.
8. Formulaci3n m3dica l3quida estable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el anticuerpo es IgG.
9. Formulaci3n m3dica l3quida estable seg3n la reivindicaci3n 8, en la que la subclase de IgG es una cualquiera de IgG1, IgG2 o IgG4.
10. Formulaci3n m3dica l3quida estable seg3n la reivindicaci3n 8 3 9, en la que el amino3cido en la posici3n 331 (numeraci3n basada en el sistema de numeraci3n de la UE) en la regi3n constante de cadena pesada se ha sustituido por Ser.
11. Formulaci3n m3dica l3quida estable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que el anticuerpo es un anticuerpo contra HLA-DR.
12. Formulaci3n m3dica l3quida estable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el anticuerpo es un anticuerpo contra CD40.
13. Formulaci3n m3dica l3quida estable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la concentraci3n del anticuerpo es de entre aproximadamente 1 y 200 mg/ml.
14. Formulaci3n m3dica l3quida estable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, que tiene un pH de entre 4,5 y 6,0.
15. Formulaci3n m3dica l3quida estable seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14, que contiene al menos 1 tipo de agente de estabilizaci3n seleccionado del grupo que consiste en glicina, metionina, clorhidrato de ciste3na, leucina, clorhidrato de lisina, clorhidrato de arginina, 3cido asp3rtico, 3cido asc3rbico, EDTA, y sales de los mismos.

Fig. 1

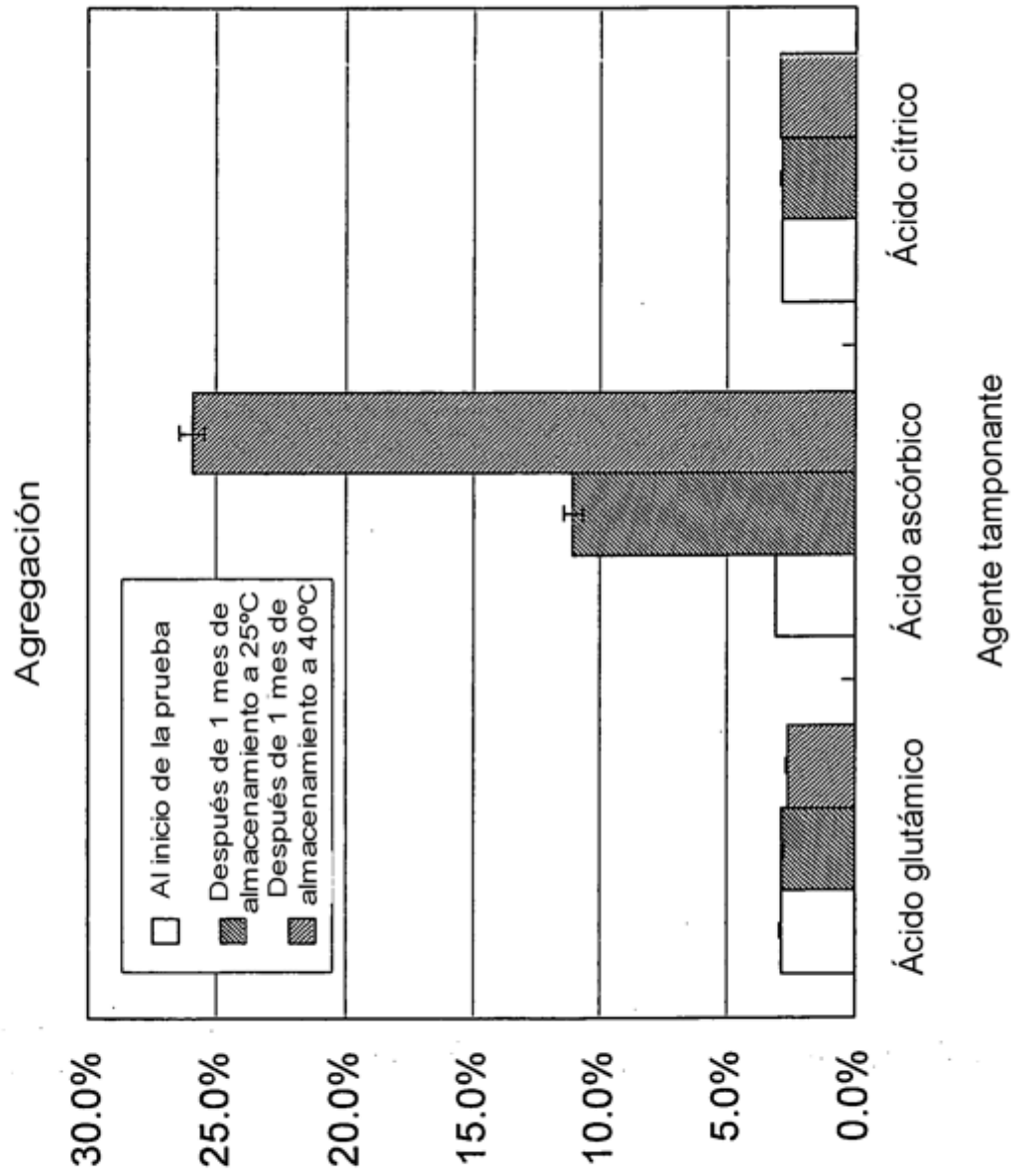


Fig. 2

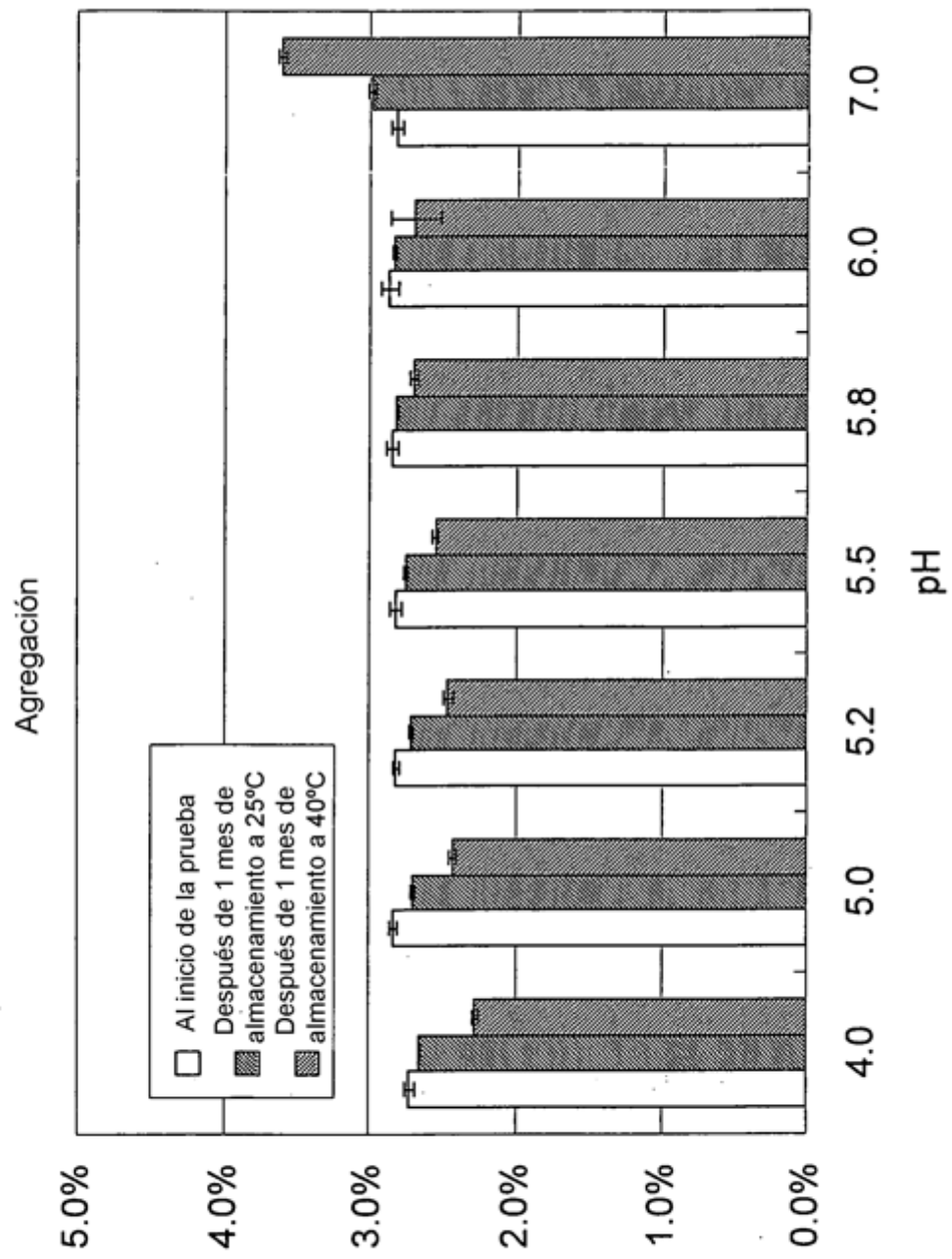


Fig. 3

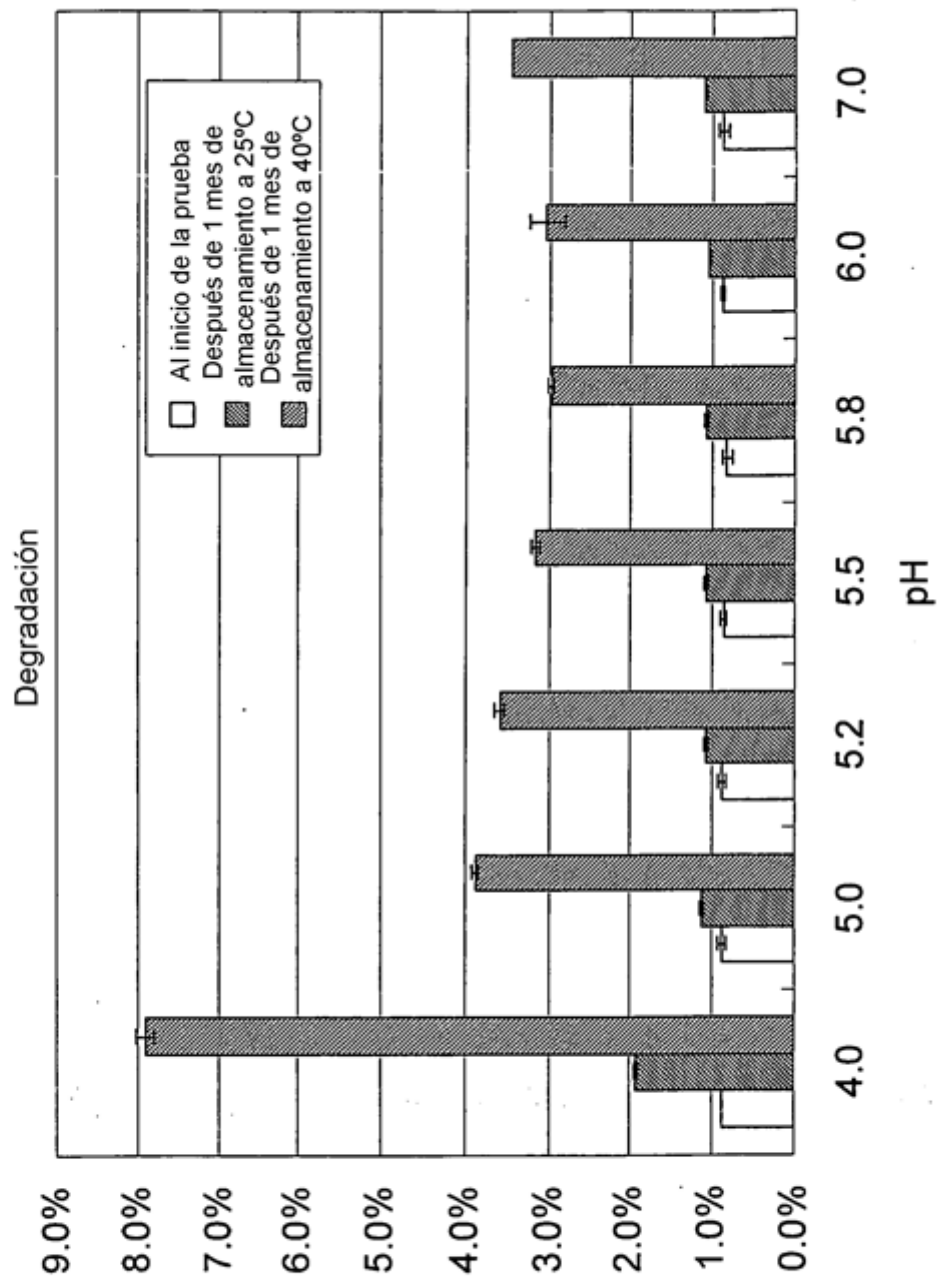


Fig. 4

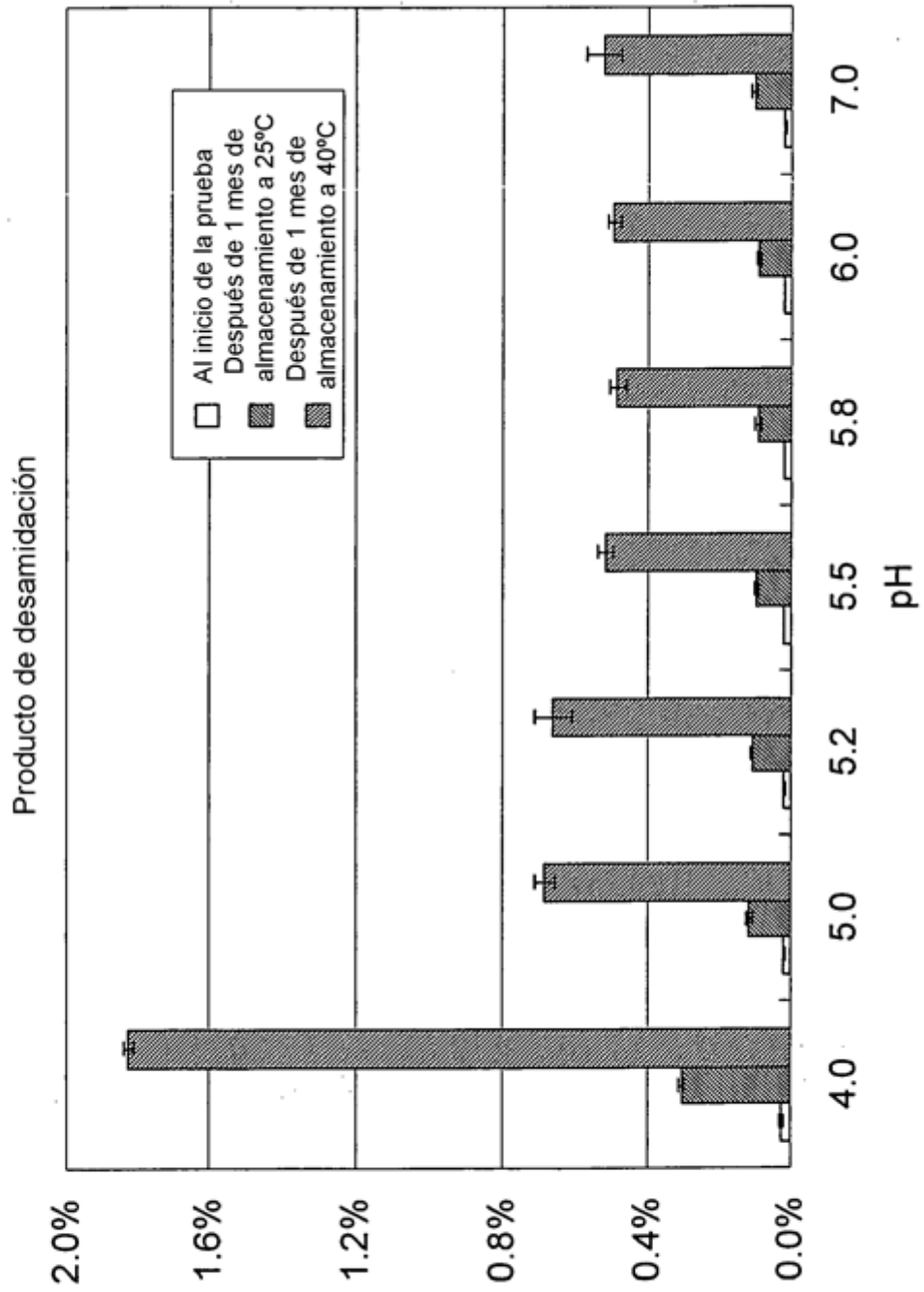


Fig. 5

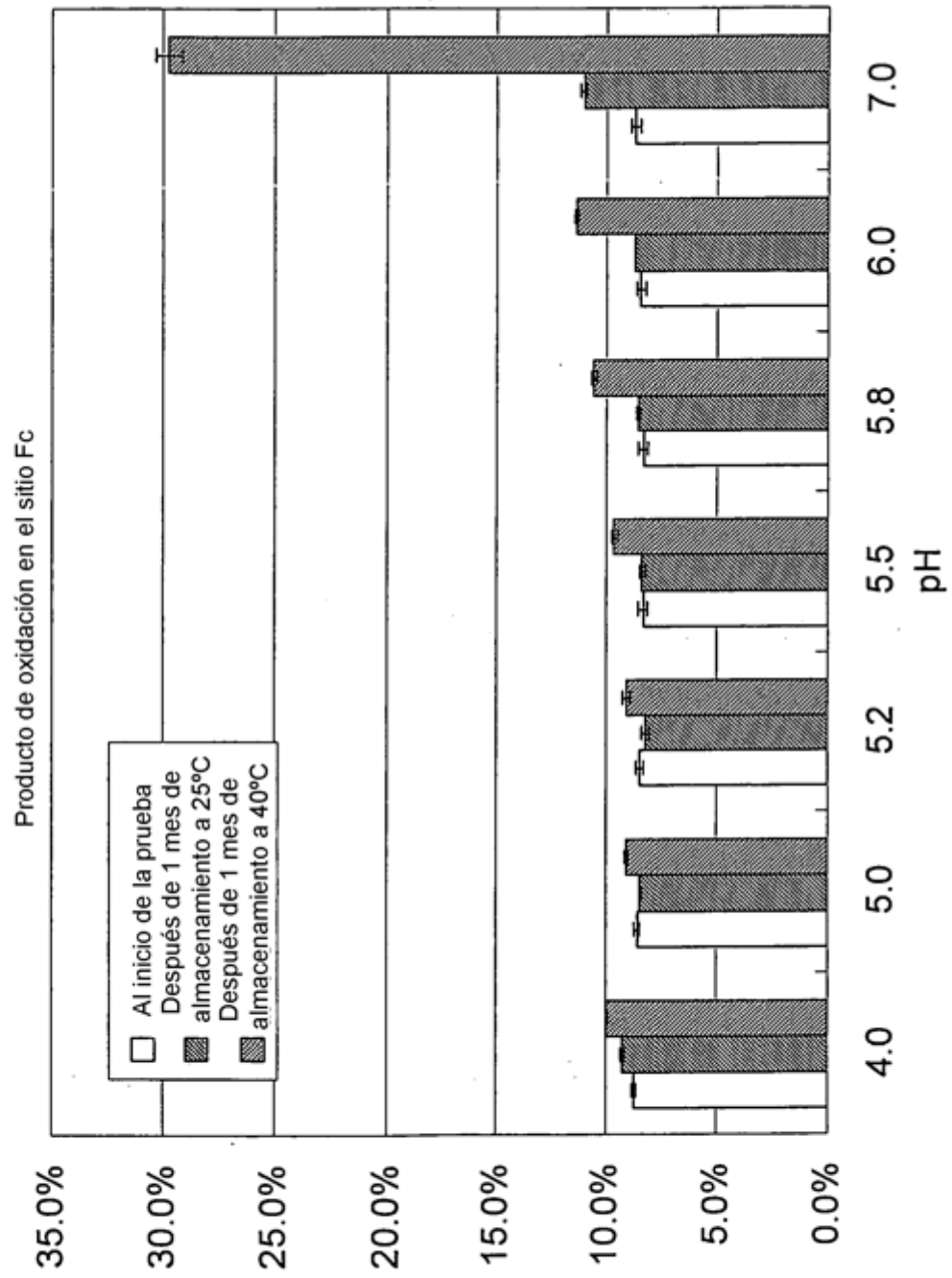


Fig. 6

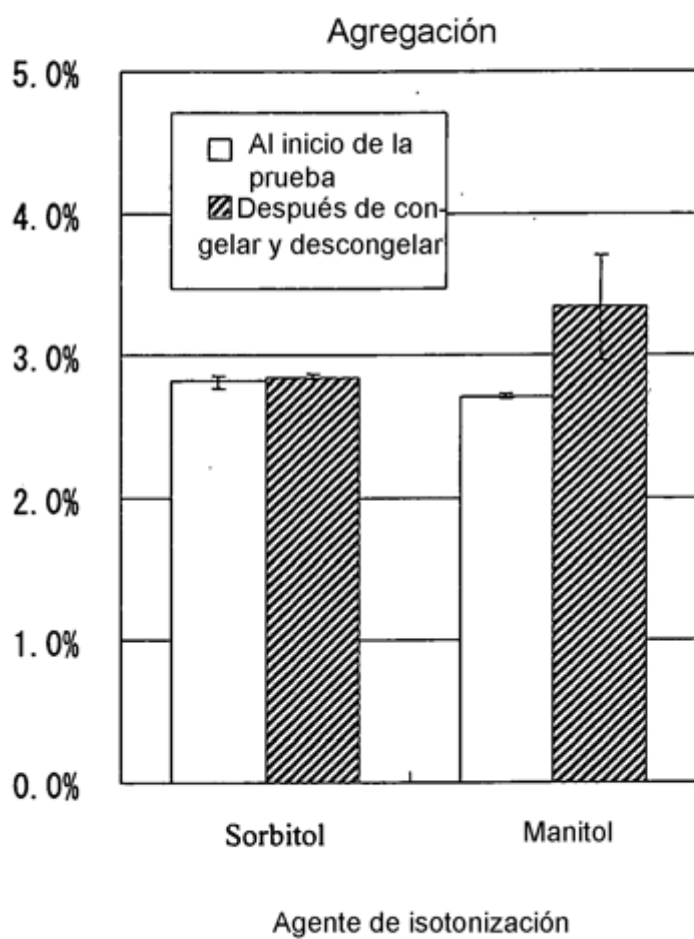


Fig. 7

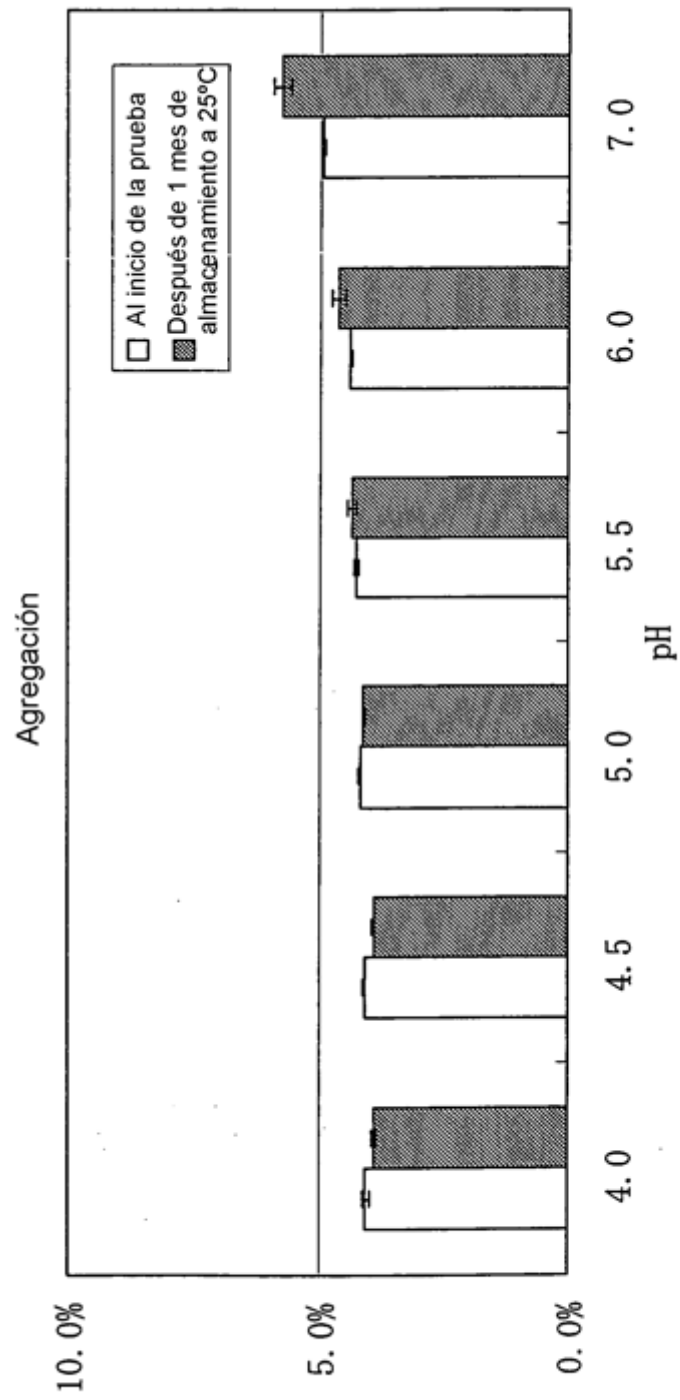


Fig. 8

