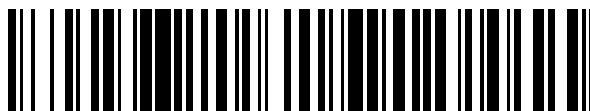


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 564 281**

51 Int. Cl.:

A61K 9/08 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.03.2013 E 13707176 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.02.2016 EP 2822587**

54 Título: **Formulación de anticuerpos Abeta**

30 Prioridad:

08.03.2012 EP 12158602

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

21.03.2016

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

GOLDBACH, PIERRE;
MAHLER, HANNS-CHRISTIAN y
MUELLER, ROBERT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 564 281 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulación de anticuerpos Abeta

5 La presente invención se refiere a una formulación farmacéutica de una molécula de anticuerpo y/o de una mezcla de moléculas de anticuerpo contra el péptido amiloide-beta (Abeta).

10 Las moléculas de anticuerpos, como parte del grupo de productos farmacéuticos proteicos, son muy sensibles a la degradación física y química, por ejemplo la desnaturalización, la agregación, la desamidación, la oxidación y la hidrólisis. La estabilidad de una proteína dependerá de las características de la proteína propiamente dicha, p.ej. la secuencia de aminoácidos, y de los factores externos, por ejemplo la temperatura, el pH del disolvente, los excipientes, las interfaces o las relaciones de cizallamiento. Por consiguiente, es importante definir las condiciones óptimas de formulación para proteger la proteína de las reacciones de degradación durante la obtención (fabricación), almacenado y administración (Manning, M.C., Patel, K. y col., "Stability of protein pharmaceuticals", Pharm. Res. 6(11), 903-18, 1989; Zheng, J.Y. y Janis, L.J., "Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298", Int. Pharm., 2005). La administración de anticuerpos por vía subcutánea o intramuscular requiere una concentración elevada de proteína en la formulación final debido a que a menudo se precisan dosis elevadas, que tienen que incluirse en volúmenes limitados de administración, (Shire, S.J., Shahrokh, Z. y col., "Challenges in the development of high protein concentration formulations", J. Pharm. Sci. 93(6), 1390-1402, 2004; Roskos, L.K., Davis C.G. y col., "The clinical pharmacology of therapeutic antibodies", Drug Development Research 61(3), 108-120, 2004). La fabricación a escala industrial de concentraciones elevadas de proteínas puede conseguirse por procesos de ultrafiltración, procesos de secado, por ejemplo por liofilización o secado por atomización y por procesos de precipitación, (véase Shire, S.J., Shahrokh, Z. y col., "Challenges in the development of high protein concentration formulations", J. Pharm. Sci. 93(6), 1390-1402, 2004).

25 En el documento WO 2008/071394 se describen composiciones de anticuerpos Abeta.

30 Es un objeto de la presente invención proporcionar una formulación estable, muy concentrada de anticuerpo Abeta o de mezclas de tales anticuerpos, que permita la administración subcutánea del anticuerpo a un paciente.

35 La formulación de la presente invención tiene una buena estabilidad durante un almacenaje de 8 meses a 2-8°C y 25°C sin formación de partículas visibles. Pueden aplicarse la agitación y múltiples pasos de congelación-descongelación a la formulación líquida para simular las condiciones de estrés físico, a las que potencialmente puede estar sometido el producto farmacológico durante la fabricación o el transporte.

40 La formulación farmacéutica de la presente invención contiene como tensioactivo un poloxámero para reducir la agregación de los anticuerpos y la formación de partículas. El término "poloxámero" se emplea aquí para indicar un copolímero de tres bloques de polioxietileno-polioxipropileno, conocido como poloxámero 188, suministrado con el nombre comercial de PLURONIC[®] F68 por la empresa BASF (Parsippany, N.J.). Otros poloxámeros que pueden utilizarse en las formulaciones de la presente invención incluyen al poloxámero 403 (suministrado como PLURONIC[®] P123), poloxámero 407 (suministrado como PLURONIC[®] P127), poloxámero 402 (suministrado como PLURONIC[®] P122), poloxámero 181 (suministrado como PLURONIC[®] L61), poloxámero 401 (suministrado como PLURONIC[®] L121), poloxámero 185 (suministrado como PLURONIC[®] P65) y poloxámero 338 (suministrado como PLURONIC[®] F108).

45 La presente invención una formulación farmacéutica de anticuerpo, líquida y estable, que contiene:

50 - 50 mg/ml – 200 mg/ml de un anticuerpo Abeta según la reivindicación 1,
- 0,01 % – 0,1% de un poloxámero, con preferencia del poloxámero 188,
- 5 mM – 50 mM de un tampón,
- 100 mM – 300 mM de un estabilizante,
a un pH de 4,5 – 7,0.

55 En una forma particular de ejecución de la presente invención, la concentración de anticuerpo Abeta se sitúa aprox. entre 100 mg/ml y 200 mg/ml, con preferencia en torno a 150 mg/ml.

En una forma particular de ejecución de la presente invención, el poloxámero está presente en una concentración comprendida entre aprox. el 0,02% y el 0,06%, con preferencia en torno al 0,04 %.

60 En una forma particular de ejecución de la presente invención, el tampón es un tampón de acetato sódico o un tampón de histidina, con preferencia un tampón de histidina/clorhidrato de histidina.

En una forma particular de ejecución de la presente invención, el tampón tiene una concentración aproximada de 10 a 30 mM, con preferencia en torno a 20 mM.

65 En una forma particular de ejecución de la presente invención, el pH de la formulación se sitúa entre 5 6, con preferencia en torno a 5,5.

En una forma particular de ejecución de la presente invención, el estabilizante se elige entre azúcares y aminoácidos.

5 En una forma particular de ejecución de la presente invención, el estabilizante se elige entre trehalosa y arginina.

En una forma particular de ejecución de la presente invención, el estabilizante tiene una concentración comprendida entre aprox. 100 mM y 300 mM.

10 En una forma particular de ejecución de la presente invención, el estabilizante es trehalosa y tiene una concentración comprendida entre aprox. 150 mM y 250 mM, con preferencia en torno a 200 mM.

En una forma particular de ejecución de la presente invención, el estabilizante es arginina y tiene una concentración comprendida entre aprox. 100 mM y 150 mM, con preferencia en torno a 135 mM.

15 En una forma particular de ejecución de la presente invención, el anticuerpo Abeta es un anticuerpo monoclonal formado por una cadena larga y una cadena corta.

En una forma particular de ejecución de la presente invención, la cadena larga del anticuerpo Abeta contiene un dominio VH que contiene:

20

- una CDR1 que contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 4,
- una CDR2 que contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 5,
- una secuencia CDR3 que contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 6.

25 En una forma particular de ejecución de la presente invención, la cadena corta del anticuerpo Abeta contiene un dominio VL que contiene:

30

- una CDR1 que contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 7,
- una CDR2 que contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 8,
- una secuencia CDR3 que contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 9.

En una forma particular de ejecución de la presente invención, el dominio VH del anticuerpo Abeta contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 2 y el dominio VL del anticuerpo Abeta contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 3.

35

En una forma particular de ejecución de la presente invención, la cadena larga del anticuerpo Abeta contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 10.

40

En una forma particular de ejecución de la presente invención, la cadena corta del anticuerpo Abeta contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 11.

En una forma particular de ejecución de la presente invención, el anticuerpo monoclonal Abeta es una mezcla de anticuerpos Abeta monoglicosilados y anticuerpos Abeta biglicosilados, dicho anticuerpo monoglicosilado contiene una asparagina glicosilada (Asn) en la posición 52 de la Seq. Id. No. 2 en el dominio VH de un sitio de unión de anticuerpo y dicho anticuerpo biglicosilado contiene una asparagina glicosilada (Asn) en la posición 52 de la Seq. Id. No. 2 en el dominio VH de ambos sitios de unión de anticuerpo y dicha mezcla contiene menos del 5% de anticuerpo no glicosilado en la posición 52 de la Seq. Id. No. 2 en el dominio VH.

45

En una forma particular de ejecución, la presente invención proporciona el uso de la formulación farmacéutica de la presente invención para la administración subcutánea del anticuerpo Abeta.

50

Los términos "Abeta anticuerpo" y "un anticuerpo que se une a Abeta" indican un anticuerpo que es capaz de unirse a un péptido A β con una afinidad suficiente para que el anticuerpo sea útil como agente de diagnóstico y/o terapéutico dirigido contra el péptido A β .

55

Conviene notar que A β tiene varias formas existentes en la naturaleza, entre ellas las formas humanas se denominan A β 39, A β 40, A β 41, A β 42 y A β 43 tal como se ha mencionado antes. La forma más prominente, la A β 42, tiene esta secuencia de aminoácidos (empezando por el extremo N):

60 DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA (Seq. Id. No. 1). En los A β 41, A β 40, A β 39 están ausentes del extremo C los aminoácidos A, IA y VIA, respectivamente. En la forma A β 43, un resto treonina adicional está presente en el extremo C de la secuencia recién representada (Seq. Id. No. 1).

65 El término "anticuerpo Abeta monoglicosilado" indica una molécula de anticuerpo que contiene una N-glicosilación en la posición 52 de la Seq. Id. No. 2 en una región (VH) de una molécula individual de anticuerpo; véase también la figura 1. El término "anticuerpo Abeta biglicosilado" define una molécula de anticuerpo que está N-glicosilada en la posición 52 de la Seq. Id. No. 2 en las dos regiones variables de la cadena larga" (figura 1). Las moléculas de anticuerpo que carecen de la N-glicosilación en los dos dominios de cadena larga (VH) se llaman "anticuerpos no glicosilados" (figura 1). El anticuerpo monoglicosilado, el anticuerpo biglicosilado y el anticuerpo no glicosilado

pueden tener secuencias de aminoácidos idénticas o secuencias de aminoácidos diferentes. El anticuerpo monoglicosilado y el anticuerpo biglicosilado se denominan también aquí “isoformas de anticuerpo glicosilado”. Una molécula de anticuerpo purificada, caracterizada porque por lo menos un sitio de unión al antígeno contiene una glicosilación en la región variable de la cadena larga (VH) es un anticuerpo monoglicosilado que está libre de o está asociado en un grado muy bajo con una isoforma elegida entre un anticuerpo biglicosilado y un anticuerpo no glicosilado, es decir, un “anticuerpo monoglicosilado purificado”. En el contexto de esta invención, un anticuerpo biglicosilado está libre de o está asociado en un grado muy bajo con una isoforma elegida entre un anticuerpo monoglicosilado y un anticuerpo no glicosilado, es decir, “anticuerpo biglicosilado purificado”.

5 El término “anticuerpo” abarca las diversas formas de estructuras de anticuerpo, incluidos, pero sin limitarse a ellos, los anticuerpos enteros y los fragmentos de anticuerpo. El anticuerpo según la invención es con preferencia un anticuerpo humanizado, anticuerpo quimérico o un anticuerpo de ingeniería genética, en el supuesto de que retenga las propiedades características de la invención.

10 Los “fragmentos de anticuerpo” contienen una porción del anticuerpo de longitud completa, con preferencia el dominio variable del mismo, o por lo menos el sitio del mismo que se une al antígeno. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los diacuerpos, las moléculas de anticuerpo de una sola cadena y los anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los anticuerpos scFv se han descrito p.ej. en Houston, J.S., *Methods in Enzymol.* 203, 46-96, 1991). Además, los fragmentos de anticuerpo contienen polipéptidos de una sola cadena, que tienen las características de un dominio V_H, a saber, que son capaces de ensamblarse con un dominio V_L, o de un dominio VL que se une al Aβ, a saber, que es capaz de ensamblarse con un dominio VH para formar un sitio funcional de unión al antígeno, con lo cual ya proporciona la propiedad.

15 Los términos “anticuerpo monoclonal” o “composición de anticuerpo monoclonal” se emplean aquí para indicar una preparación de moléculas de anticuerpo que tiene una sola composición de aminoácidos.

20 El término “anticuerpo quimérico” indica un anticuerpo que contiene una región variable, es decir, una región de unión, de una fuente o especie y por lo menos una porción de una región constante derivada de una fuente o especie diferente, preparada normalmente por técnicas de DNA recombinante. Son preferidos los anticuerpos quiméricos que contienen una región variable murina y una región constante humana. Otras formas preferidas de “anticuerpos quiméricos” abarcadas por la presente invención son aquellas, en las que la región constante se ha modificado o cambiado con respecto a la del anticuerpo original para generar las propiedades de la invención, en especial en los que respecta a la unión a C1q y/o a la unión al receptor de Fc (FcR). Tales anticuerpos quiméricos se denominan también “anticuerpos de clase cambiada” (class-switched antibodies). Los anticuerpos quiméricos son el producto de genes de inmunoglobulina expresados que contienen segmentos de DNA que codifican a las regiones variables de inmunoglobulina y segmentos de DNA que codifican a las regiones constantes de inmunoglobulina. Los métodos de obtención de anticuerpos quiméricos incluyen las técnicas convencionales de DNA recombinante y de transfección genética, que son bien conocidas en la técnica, véase p.ej. Morrison, S.L. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851-6855, 1984; US 5,202,238 y US 5,204,244.

25 El término “anticuerpo humanizado” indica anticuerpos, en los que las regiones de estructura o “regiones determinantes de complementariedad” (CDR) se han modificado para que contengan la CDR de una inmunoglobulina de especificidad diferente con respecto a la de la inmunoglobulina original. En una forma preferida de ejecución, se injerta una CDR murina en la región de estructura de un anticuerpo humano para obtener el “anticuerpo humanizado”, véase p.ej. Riechmann, L. y col., *Nature* 332, 323-327, 1988; y Neuberger, M.S. y col., *Nature* 314, 268-270, 1985. Las CDR especialmente preferidas corresponden a las que representan secuencias que reconocen a los antígenos antes mencionados de los anticuerpos quiméricos. Otras formas de “anticuerpos humanizados” contemplados en la presente invención son aquellas, en las que la región constante se ha modificado o cambiado adicionalmente con respecto al anticuerpo original para generar propiedades según la invención, en especial en lo que respecta a la unión con el C1q y/o a la unión con el receptor de Fc (FcR).

30 El término “anticuerpo humano” se emplea aquí para indicar anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de las secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos son bien conocidos en el estado de la técnica (van Dijk, M.A. y van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 368-374, 2001). Los anticuerpos humanos pueden obtenerse también en animales transgénicos (p.ej., ratones) que, después de la inmunización, son capaces de producir un repertorio completo o una selección de anticuerpos humanos en ausencia de producción endógena de inmunoglobulina. La transferencia de la disposición genética de la inmunoglobulina de la línea germinal humana a dichos ratones mutantes de línea germinal puede traducirse en la producción de anticuerpos humanos después del contacto con el antígeno (ver, p.ej., Jakobovits, A. y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2551-2555, 1993; Jakobovits, A. y col., *Nature* 362, 255-258, 1993; Bruggemann, M. y col., *Year Immunol.* 7, 33-40, 1993). Los anticuerpos humanos pueden producirse también en bibliotecas de exposición de fagos (Hoogenboom, H.R. y Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227, 381-388, 1992; Marks, J.D. y col., *J. Mol. Biol.* 222, 581-597, 1991). Se dispone también de las técnicas de Cole, A. y col. y Boerner, P. y col. para la obtención de anticuerpos monoclonales humanos (Cole, A. y col., *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan L. Liss, p. 77, 1985; y Boerner, P. y col., *J. Immunol.* 147, 86-95, 1991). Tal como se ha mencionado antes para los anticuerpos quiméricos y humanizados según la invención, el término “anticuerpo humano” se emplea aquí para indicar los anticuerpos que se han modificado en la región constante para generar propiedades según la invención, en especial en lo que respecta a la unión al C1q y/o a la unión al FcR, p.ej. por “cambio de clase”, es decir, cambio o mutación de partes del Fc (p.ej. de la IgG1 a la IgG4 y/o mutación IgG1/IgG4).

El término “epítoto” incluye cualquier determinante de polipéptido capaz de unirse específicamente a un anticuerpo. En ciertas formas de ejecución, el determinante de epítoto incluye agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas, como son los aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, fosforilo o sulfonilo y, en ciertas formas de ejecución, pueden tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características específicas de carga. Un epítoto es una región de un antígeno que está unida a un anticuerpo.

El “dominio variable” (dominio variable de una cadena corta (V_L), dominio variable de una cadena larga (V_H)) se emplea aquí para indicar cada uno de los pares de cadenas cortas y largas que intervienen directamente en la fijación del anticuerpo sobre el antígeno. Los dominios de cadenas variables humanas, cortas y largas, tienen la misma estructura general y cada dominio contiene cuatro regiones de estructura (FR), cuyas secuencias están muy conservadas, conectadas por tres “regiones hipervariables” (o regiones determinantes de complementariedad, CDR). Las regiones estructurales adoptan una conformación de lámina β y las CDR pueden formar bucles que conecten la estructura de lámina β . Las CDR de cada cadena se mantienen en su estructura tridimensional gracias a las regiones de estructura y junto con las CDR de la otra cadena forman el sitio de unión al antígeno. Las regiones CDR3 de cadena larga y corta del anticuerpo desempeñan un rol especialmente importante en la especificidad de unión/afinidad de los anticuerpos según la invención y por ello constituyen otro objeto de la invención.

La expresión “porción de un anticuerpo que se une al antígeno” se emplea aquí para indicar los restos aminoácido de un anticuerpo que producen la unión con el antígeno. La porción de un anticuerpo que se une al antígeno contiene restos aminoácido de las “regiones determinantes de complementariedad” o “CDR”. Las regiones de “estructura” o “FR” son aquellas regiones de dominio variable distintas de los restos de región hipervariable que se acaban de definir. Por lo tanto, las cadenas cortas y largas de un anticuerpo abarcan desde el extremo N al extremo C los dominios FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 y FR4. En especial, la CDR3 de cadena larga es la región que más contribuye a la fijación sobre el antígeno y define las propiedades del anticuerpo. Las regiones CDR y FR se determinan con arreglo a la definición estándar de Kabat y col., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5ª ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) y/o los restos de un “bucle hipervariable”.

El término “estabilizante” indica un excipiente farmacéutico aceptable, que protege el ingrediente farmacéutico activo y/o la formulación de la degradación química y/o física durante la fabricación, el almacenaje y la aplicación. Los mecanismos de la degradación química y física de los productos farmacéuticos proteicos se han revisado por parte de Cleland, J.L., Powell M.F. y col., “The development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation”, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* **10**(4), 307-77, 1993; Wang, W., “Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals”, *Int. J. Pharm.* **185**(2), 129-88, 1999; Wang, W., “Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals”, *Int. J. Pharm.* **203**(1-2), 1-60, 2000; y Chi, E.Y., Krishnan, S. y col., “Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation”, *Pharm. Res.* **20**(9), 1325-36, 2003. Los estabilizantes incluyen, pero no se limitan a: azúcares, aminoácidos, polioles, tensioactivos, antioxidantes, conservantes, ciclodextrinas, polietilenglicoles, p.ej. PEG 3000, 3350, 4000, 6000, albúmina, p.ej. albúmina de suero humano (HSA), albúmina de suero bovino (BSA), sales, p.ej. cloruro sódico, cloruro magnésico, cloruro cálcico, quelantes, p.ej. EDTA, que se definen a continuación. Tal como se ha mencionado anteriormente, los estabilizantes pueden estar presentes en la formulación en una cantidad comprendida entre 10 y 500 mM, con preferencia entre 10 y 300 mM y con mayor preferencia en una cantidad comprendida entre 100 mM y 300 mM.

Una “formulación farmacéutica líquida estable de anticuerpo” es una formulación líquida de anticuerpo que no sufre cambios significativos a temperatura refrigerada (2-8°C) durante por lo menos 12 meses, en particular 2 años y más en particular 3 años. Los criterios de estabilidad son los siguientes: no se degrada más del 10%, en particular más del 5% del anticuerpo monómero, porcentaje determinado por cromatografía de exclusión de tamaño (HPLC-SEC). Además, la solución es incolora o entre transparente y ligeramente opalescente cuando se observa visualmente. La concentración de proteína de la formulación no sufre un cambio superior a +/- 10%. No se forma una agregación superior al 10%, en particular no superior al 5%. La estabilidad se mide por métodos ya conocidos de la técnica, por ejemplo espectroscopía UV, cromatografía de exclusión de tamaño (HPLC-SEC), cromatografía de intercambio iónico (HPLC-IE), turbidimetría e inspección visual.

Métodos y composiciones recombinantes

Los anticuerpos pueden producirse por métodos y composiciones recombinantes, p.ej. los descritos en la patente US-4,816,567. En una forma de ejecución se proporciona un ácido nucleico aislado que codifica a un anticuerpo anti-[[PRO]] aquí descrito. Este ácido nucleico puede codificar una secuencia de aminoácidos que contiene la VL y/o una secuencia de aminoácidos que contiene la VH del anticuerpo (p.ej. las cadenas corta y/o larga del anticuerpo). En otra forma de ejecución se proporcionan uno o más vectores (p.ej. vectores de expresión) que contienen dicho ácido nucleico. En otra forma de ejecución se proporciona una célula hospedante que contiene dicho ácido nucleico. En una forma de ejecución, una célula hospedante contiene (p.ej. se ha transformado con): (1) un vector que contiene un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que contiene la VL del anticuerpo y una secuencia de aminoácidos que contiene la VH del anticuerpo, o (2) un primer vector que contiene un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que contiene la VL del anticuerpo y un segundo vector que contiene un ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos que contiene la VH del anticuerpo. En una forma de ejecución, la célula hospedante es eucariota, p.ej. una célula de ovario de hámster chino (CHO) o una célula linfóide (p.ej. célula Y0, NS0, Sp20). En una forma de ejecución se proporciona un método de obtención de un anticuerpo

anti-[[PRO]], dicho método consiste en cultivar una célula hospedante que contiene un ácido nucleico que codifica al anticuerpo, proporcionado previamente, en condiciones idóneas para la expresión del anticuerpo, y opcionalmente recuperar el anticuerpo de la célula hospedante (o del medio de cultivo de las células hospedantes).

5 Para la producción recombinante de un anticuerpo anti-Abeta, se aísla un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, p.ej. del modo antes descrito, y se inserta en uno o más vectores para la posterior clonación y/o expresión en una célula hospedante. Dicho ácido nucleico puede aislarse y secuenciarse fácilmente aplicando procedimientos convencionales (p.ej. empleando sondas de oligonucleótido, que sean capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas largas y cortas del anticuerpo).

10 Las células hospedantes idóneas para la clonación o expresión de vectores que codifican a anticuerpo incluyen las células procariotas o eucariotas aquí descritas. Por ejemplo, los anticuerpos pueden producirse en bacterias, en particular cuando no se necesitan la glicosilación ni la función efectora de la Fc. Para la expresión de fragmentos de anticuerpo y polipéptidos en bacterias, véase p.ej. las patentes US-5,648,237, 5,789,199, y 5,840,523 (véase también Charlton, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, coord., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, que describe la expresión de fragmentos de anticuerpo en *E. coli*). Después de la expresión, el anticuerpo puede aislarse de la pasta de células bacterianas en forma de fracción soluble y después puede seguir purificándose.

20 Además de los procariotas, los microbios eucariotas, por ejemplo los hongos filamentosos y las levaduras, son apropiados como hospedantes de clonación o expresión de vectores codificadores de anticuerpo, incluidas las cepas de hongos y levaduras, cuyos mecanismos de glicosilación se hayan "humanizado", lo cual se traduce en la producción de un anticuerpo que tiene un patrón de glicosilación parcial o totalmente humano, véase Gerngross, *Nat. Biotech.* 22, 1409-1414, 2004 y Li y col., *Nat. Biotech.* 24, 210-215, 2006.

25 Las células hospedantes idóneas para la expresión de anticuerpos glicosilados se derivan también de organismos multicelulares (invertebrados y vertebrados). Los ejemplos de células de invertebrados incluyen las células vegetales y de insectos. Se han identificado numerosas cepas de baculovirus, que pueden utilizarse en combinación con células de insectos, en particular para la transfección de células de *Spodoptera frugiperda*.

30 Pueden utilizarse también como hospedantes los cultivos de células vegetales, véase p.ej. las patentes US-5,959,177, 6,040,498, 6,420,548, 7,125,978 y 6,417,429 (que describen la tecnología llamada PLANTIBODIES™ para producir anticuerpos en plantas transgénicas).

35 Las células de vertebrados pueden actuar también como hospedantes. Pueden ser útiles por ejemplo las líneas celulares de mamíferos que se adaptan al cultivo en suspensión. Otros ejemplos de líneas celulares hospedantes de mamíferos que pueden ser útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada con SV40 (COS-7); la línea de riñón embrionario humano (293 ó las células 293 descritas p.ej. en Graham y col., *J. Gen. Virol.* 36, 59, 1977); las células de riñón de hámster bebé (BHK); las células sertoli de ratón (células TM4 descritas p.ej. en Mather, *Biol. Reprod.* 23, 243-251, 1980); células de riñón de mono (CV1); células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma cervical humano (HELA); células de riñón canino (MDCK; células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); células de tumor de mama murino (MMT 060562); células TRI descritas p.ej. en Mather y col., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383, 44-68, 1982; células MRC 5; y células FS4. Otras líneas celulares hospedantes de mamífero que pueden ser útiles incluyen las células de ovario de hámster chino (CHO), incluidas las células DHFR-CHO (Urlaub y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4216, 1980); y las líneas celulares de mieloma, por ejemplo las Y0, NS0 y Sp2/0. Una visión de conjunto de ciertas líneas celulares hospedantes de mamífero útiles para la producción de anticuerpos se encontrará p.ej. en Yazaki y Wu, *Methods in Molecular Biology*, vol. 248 (B.K.C. Lo, coord., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268, 2003.

50 Ejemplos

Las formulaciones líquidas de producto farmacológico para la administración subcutánea según la invención se desarrollan del modo siguiente.

55 Ejemplo 1: Preparación de formulaciones líquidas

Se preparan las siguientes formulaciones líquidas de Abeta con una concentración de proteína de 150 mg/ml:

Código	Tampón	Tensioactivo	Excipiente
F1	acetato sódico 20 mM de pH 5,5	0,02% de polisorbato 20	200 mM de trehalosa
F2		0,02% de polisorbato 20	210 mM de sorbita
F3		0,02% de polisorbato 20	135 mM de arginina
F4		0,02% de polisorbato 80	200 mM de trehalosa
F5		0,02% de polisorbato 80	210 mM de sorbita
F6		0,02% de polisorbato 80	135 mM de arginina
F7		0,04% de poloxámero 188	200 mM de trehalosa
F8		0,04% de poloxámero 188	135 mM de arginina
F9	histidina/ clorhidrato de histidina 20 mM	0,02% de polisorbato 20	200 mM de trehalosa

F10	de pH 5,5	0,02% de polisorbato 20	210 mM de sorbita
F11		0,02% de polisorbato 20	135 mM de arginina
F12		0,02% de polisorbato 80	200 mM de trehalosa
F13		0,02% de polisorbato 80	210 mM de sorbita
F14		0,02% de polisorbato 80	135 mM de arginina
F15		0,04% de poloxámero 188	200 mM de trehalosa
F16		0,04% de poloxámero 188	135 mM de arginina

El anticuerpo preparado y obtenido del modo descrito en WO 2007/068429 se aporta concentración de aprox. 50-60 mg/ml en un tampón de histidina 10 mM de pH aprox. 5,5. El anticuerpo Abeta empleado en los ejemplos contiene las CDR, el dominio VH, el dominio VL, la cadena larga y la cadena corta especificados en el listado de secuencias de la presente solicitud (Seq. Id. No. 2 – 11).

Para la preparación de las formulaciones líquidas se sustituye el tampón del Abeta por un tampón de diafiltración que contiene la composición anticipada del tampón y se concentra por diafiltración hasta una concentración de anticuerpo de aprox. 200 mg/ml. Una vez finalizada la operación de diafiltración se añaden los excipientes (p.ej. trehalosa) en forma de soluciones patrón a la solución del anticuerpo. Después se añade el tensioactivo en forma de solución patrón de 50 a 125 veces más concentrada. Finalmente se ajusta la concentración de proteína con un tampón hasta que la concentración final del Abeta sea de aprox. 150 mg/ml.

Todas las formulaciones se filtran en condiciones estériles a través de filtros de baja fijación de proteínas de 0,22 µm y se envasan en condiciones asépticas en viales de vidrio estériles de 6 ml, que se cierran con tapones de caucho recubierto con ETFE (copolímero de etileno-tetrafluoretileno) y capuchones de aluminio corrugado de tipo "alucrimp". El volumen envasado es de aprox. 2,4 ml. Se almacenan estas formulaciones en diferentes condiciones climáticas (5°C, 25°C y 40°C) durante diferentes intervalos de tiempo y se someten a estrés (1 semana con una frecuencia de agitación de 200 rpm a 5°C y 25°C) y métodos de estrés por congelación-descongelación (cinco ciclos de congelación a -80°C y descongelación a +5°C). Se analizan las muestras antes y después de la realización de los ensayos de estrés y también después del almacenaje por los métodos analíticos siguientes:

- espectrofotometría UV;
- cromatografía de exclusión de tamaños (SEC);
- cromatografía de intercambio iónico (IEC);
- transparencia y opalescencia de la solución;
- inspección visual.

La espectroscopía UV, empleada para determinar el contenido de proteínas, se realiza en un espectrofotómetro Perkin Elmer λ35 UV en un intervalo de longitudes de onda de 240 nm a 400 nm. Se diluyen las muestras de proteína tal cual hasta aprox. 0,5 mg/ml con el correspondiente tampón de formulación. Se calcula la concentración de proteína con arreglo a la ecuación 1.

$$\text{Ecuación 1: contenido de proteína} = \frac{A(280) - A(320) \times \text{dil. factor}}{\epsilon \left\langle \frac{\text{cm}^2}{\text{mg}} \right\rangle \times d \langle \text{cm} \rangle}$$

Se corrige la absorción de luz UV a 280 nm con la dispersión de la luz a 320 nm y se multiplica por el factor de dilución (= "dil. factor"), que se ha determinado a partir de las masas pesadas y las densidades de la muestra tal cual y el tampón de dilución. Se divide el numerador por el producto de la longitud del trayecto que atraviesa la cubeta d y el coeficiente de extinción ε.

Se realiza la cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) para detectar las especies de peso molecular elevado (agregados) y los productos de peso molecular bajo (LMW) resultantes de la hidrólisis de las formulaciones. El método requiere un instrumento HPLC de tipo Waters Alliance 2695 con un detector de absorbancia dual de tipo Waters W2487 y equipado con una columna TosoHaas TSK G3000SWXL. Se separan los monómeros intactos, los agregados y los productos de hidrólisis en un perfil de elución isocrática, empleando como fase móvil K₂HPO₄ 0,2 M, KCl 0,25 M, de pH 7,0, y realizando la detección en una longitud de onda = 280 nm.

Se realiza la cromatografía de intercambio iónico (IEC) para detectar los productos de degradación química que alteran la carga neta del Abeta en las formulaciones. El método requiere un instrumento HPLC de tipo Waters Alliance 2695 con un detector de absorbancia dual de tipo Waters W2487 (longitud de onda de detección = 280 nm) y equipado con una columna Mono S TM 5/50GL (Amersham Biosciences). Como fases móviles A y B se emplean ácido malónico/malonato 50 mM, de pH 5,3 y acetato Na 1 M en la fase móvil A de pH 5,3, respectivamente, con un caudal de 0,1 ml/min.

Programa del gradiente:

min	fase móvil A	fase móvil B
0	100	0
1	100	0

ES 2 564 281 T3

20	48	52
22	48	52
24	0	100
25	0	100
26	100	0
30	100	0

La transparencia y el grado de opalescencia se miden en unidades de turbidez de formazina (FTU9 por el método de la nefelometría. Se transfiere la muestra tal cual a un tubo de vidrio transparente de 11 mm de diámetro que se introduce en un turbidímetro de tipo HACH 2100AN.

5

Se inspeccionan las muestras para detectar la presencia de partículas visibles empleando un instrumento de inspección visual de tipo Seidenader V90-T.

Composiciones y datos de estabilidad de formulaciones líquidas de producto farmacológico Abeta según esta invención

5 La F1 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de acetato sódico, 200 mM de trehalosa, 0,02% de polisorbato 20, de pH 5,5

Condición de almacenamiento	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	151,8	2,3	97,0	0,7	23,7	23,7	3,3	
agitación 5°C	1 semana	-	2,3	96,7	1,0	-	-	3,5	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	150,0	2,3	96,9	0,9	-	-	3,3	prácticamente libre de partículas
congelación/descongel.	5 ciclos	-	2,4	96,8	0,8	-	-	3,8	prácticamente libre de partículas
5°C	8 meses	-	2,8	97,1	0,1	23,2	23,2	6,5	con muchas partículas
25°C	8 meses	-	3,5	94,5	2,0	15,8	15,8	6,5	con muchas partículas
40°C	8 meses	152,0	9,5	79,6	11,0	3,4	3,4	7,8	con muchas partículas

ES 2 564 281 T3

La F2 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de acetato sódico, 210 mM de sorbita, 0,02% de polisorbato 20, de pH 5,5.

Condición de almacenamiento	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	153,2	2,2	97,2	0,7	45,3	23,7	3,6	prácticamente libre de partículas
agitación 5°C	1 semana	-	2,3	96,9	0,8	-	-	3,6	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	152,1	2,3	97,1	0,8	-	-	3,9	prácticamente libre de partículas
congelación/ descongel.	5 ciclos	-	2,2	96,9	0,8	-	-	4,2	prácticamente libre de partículas
5°C	8 meses	-	2,7	97,2	0,1	47,7	23,1	7,8	con muchas partículas
25°C	8 meses	-	3,6	94,4	2,1	61,0	15,6	7,0	con muchas partículas
40°C	8 meses	151,8	10,3	78,6	11,1	67,9	3,5	7,5	con muchas partículas

ES 2 564 281 T3

La F3 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de acetato sódico, 135 mM de arginina, 0,02% de polisorbato 20, de pH 5,5.

Condición de almacenado	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	154,5	1,8	97,5	0,7	45,8	23,8	11,4	prácticamente libre de partículas
agitación 5°C	1 semana	-	1,9	97,3	0,9	-	-	11,9	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	153,1	1,9	97,4	0,8	-	-	11,3	prácticamente libre de partículas
congelación/descongel.	5 ciclos	-	1,8	97,3	0,8	-	-	10,9	prácticamente libre de partículas
5°C	8 meses	-	2,3	97,6	0,1	23,4	13,3	13,3	con muchas partículas
25°C	8 meses	-	2,7	95,1	2,2	17,6	13,4	13,4	con muchas partículas
40°C	8 meses	152,1	8,6	78,5	12,9	4,8	12,1	12,1	con muchas partículas

ES 2 564 281 T3

La F4 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de acetato sódico, 200 mM de trehalosa, 0,02% de polisorbato 80, de pH 5,5.

Condición de almacenamiento	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño		HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles	
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)			pico 2 (%)
-	inicial	152,3	2,2	97,1	0,7	45,3	23,8	3,8	prácticamente libre de partículas
agitación 5°C	1 semana	-	2,2	97,0	0,8	-	-	3,4	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	151,4	2,2	97,1	0,7	-	-	3,8	prácticamente libre de partículas
congelación/descongel.	5 ciclos	-	2,4	96,8	0,8	-	-	3,5	prácticamente libre de partículas
5°C	8 meses	-	2,8	97,1	0,1	47,7	23,2	3,6	prácticamente libre de partículas
25°C	8 meses	-	3,5	94,5	2,0	60,7	15,7	5,2	con muchas partículas
40°C	8 meses	149,3	9,8	79,0	11,2	68,0	3,5	7,2	con muchas partículas

ES 2 564 281 T3

La F5 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de acetato sódico, 210 mM de sorbita, 0,02% de polisorbato 80, de pH 5,5.

Condición de almacenamiento	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	153,4	2,0	97,4	0,6	45,9	23,8	4,2	prácticamente libre de partículas
agitación 5°C	1 semana	-	2,1	97,0	0,9	-	-	4,2	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	153,1	2,1	97,1	0,8	-	-	4,0	prácticamente libre de partículas
congelación/ descongel.	5 ciclos	-	2,3	97,0	0,8	-	-	4,0	prácticamente libre de partículas
5°C	8 meses	-	2,8	97,2	0,1	47,7	23,2	4,2	prácticamente libre de partículas
25°C	8 meses	-	3,5	94,5	2,0	60,9	15,6	5,6	con muchas partículas
40°C	8 meses	151,1	10,2	78,7	11,1	67,9	3,5	9,4	con muchas partículas

ES 2 564 281 T3

La F6 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de acetato sódico, 135 mM de arginina, 0,02% de polisorbato 80, de pH 5,5.

Condición de almacenamiento	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	155.2	1.7	97.7	0.6	46.0	23.8	11.1	prácticamente libre de partículas
agitación 5°C	1 semana	-	1.8	97.5	0.8	-	-	10.9	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	152.0	1.7	97.6	0.7	-	-	11.1	prácticamente libre de partículas
congelación/descongel.	5 ciclos	-	1.9	97.3	0.8	-	-	11.0	prácticamente libre de partículas
5°C	8 meses	-	2.3	97.7	0.1	46.7	23.3	10.6	con muchas partículas
25°C	8 meses	-	2.7	95.0	2.2	57.2	17.6	11.1	prácticamente libre de partículas
40°C	8 meses	152.9	9.1	77.9	13.1	65.6	4.9	12.0	con muchas partículas

ES 2 564 281 T3

La F7 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de acetato sódico, 200 mM de trehalosa, 0,04% de poloxámero 188, de pH 5,5.

Condición de almacenamiento	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	149,5	2,0	97,9	0,2	49,9	23,9	3,88	prácticamente libre de partículas
agitación 5°C	1 semana	--	2,1	97,8	0,1	-	-	3,50	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	147,75	2,2	97,6	0,2	-	-	3,32	prácticamente libre de partículas
congelación/descongel.	5 ciclos	-	2,1	97,8	0,1	-	-	3,43	prácticamente libre de partículas
5°C	8 meses	--	2,4	97,2	0,4	53,1	23,8	13,3	prácticamente libre de partículas
25°C	8 meses	--	3,3	94,0	2,8	62,3	17,1	4,14	prácticamente libre de partículas

ES 2 564 281 T3

La F8 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de acetato sódico, 135 mM de arginina, 0,04% de poloxámero 188, de pH 5,5.

Condición de almacenamiento	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	148,90	1,7	98,1	0,1	50,5	23,9	12,9	prácticamente libre de partículas
agitación 5°C	1 semana	-	1,8	98,0	0,1	-	-	12,6	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	144,89	1,9	98,0	0,2	-	-	12,2	prácticamente libre de partículas
congelación/descongel.	5 ciclos	-	1,8	98,0	0,1	-	-	13,30	prácticamente libre de partículas
5°C	8 meses	-	2,0	97,6	0,4	51,6	23,9	15,1	prácticamente libre de partículas
25°C	8 meses	-	2,6	94,4	3,0	59,2	19,0	13,1	prácticamente libre de partículas
40°C	8 meses	150,32	9,6	75,3	15,1	66,0	3,9	17,1	prácticamente libre de partículas

ES 2 564 281 T3

La F9 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de histidina, 200 mM de trehalosa, 0,02% de polisorbato 20, de pH 5,5.

Condición de almacenamiento	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	150,7	1,7	97,7	0,7	44,9	23,7	4,4	
agitación 5°C	1 semana	-	1,7	97,6	0,7	-	-	4,0	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	149,0	1,7	97,5	0,7	-	-	4,7	prácticamente libre de partículas
congelación/ descongel. 5°C	5 ciclos	-	1,9	97,3	0,8	-	-	4,4	prácticamente libre de partículas
	8 meses	-	2,2	97,7	0,1	47,7	23,3	7,4	con muchas partículas
25°C	8 meses	-	2,9	95,0	2,1	58,3	17,9	7,7	con muchas partículas
40°C	8 meses	150,2	9,0	78,3	12,8	66,7	5,1	7,4	con muchas partículas

ES 2 564 281 T3

La F10 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de histidina, 210 mM de sorbita, 0,02% de polisorbato 20, de pH 5,5.

Condición de almacenamiento	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	152,6	1,7	97,7	0,7	46,3	23,7	4,82	prácticamente libre de partículas
agitación 5°C	1 semana	-	1,7	97,6	0,7	-	-	4,80	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	151,4	1,7	97,6	0,7	-	-	4,45	prácticamente libre de partículas
congelación/descongel.	5 ciclos	-	1,9	97,4	0,8	-	-	4,67	prácticamente libre de partículas
5°C	8 meses	-	2,2	97,7	0,1	47,5	23,3	7,38	con muchas partículas
25°C	8 meses	-	2,9	95,1	2,0	58,5	17,8	7,69	con muchas partículas
40°C	8 meses	152,0	8,7	78,4	12,9	66,5	5,1	7,48	con muchas partículas

ES 2 564 281 T3

La F11 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de histidina, 135 mM de arginina, 0,02% de polisorbato 20, de pH 5,5.

Condición de almacenamiento	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	154,1	1,5	97,9	0,6	45,2	23,8	11,5	prácticamente libre de partículas
agitación 5°C	1 semana	-	1,6	97,7	0,7	-	-	11,4	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	152,0	1,6	97,7	0,7	-	-	10,8	prácticamente libre de partículas
congelación/ descongel.	5 ciclos	-	1,7	97,6	0,8	-	-	11,4	prácticamente libre de partículas
5°C	8 meses	-	2,0	97,9	0,1	46,6	23,4	13,1	con muchas partículas
25°C	8 meses	-	2,4	95,4	2,2	55,8	18,7	15,0	con muchas partículas
40°C	8 meses	153,5	8,0	77,7	14,3	66,5	5,1	11,8	con muchas partículas

ES 2 564 281 T3

La F12 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de histidina, 200 mM de trehalosa, 0,02% de polisorbato 80, de pH 5,5.

Condición de almacenamiento	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	151,0	1,7	97,6	0,7	45,5	23,7	4,53	prácticamente libre de partículas
agitación 5°C	1 semana	-	1,7	97,6	0,7	-	-	4,40	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	151,3	1,7	97,5	0,8	-	-	4,20	prácticamente libre de partículas
congelación/descongel.	5 ciclos	-	2,0	97,2	0,8	-	-	4,41	prácticamente libre de partículas
5°C	8 meses	-	2,2	97,7	0,1	47,7	23,3	4,43	con muchas partículas
25°C	8 meses	-	2,9	94,9	2,1	58,3	17,9	6,24	con muchas partículas
40°C	8 meses	150,9	9,1	78,2	12,8	66,8	5,1	9,88	con muchas partículas

ES 2 564 281 T3

La F13 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de histidina, 210 mM de sorbita, 0,02% de polisorbato 80, de pH 5,5.

Condición de almacenamiento	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	153,2	1,7	97,6	0,7	46,1	23,7	4,68	prácticamente libre de partículas
agitación 5°C	1 semana	-	1,7	97,6	0,7	-	-	4,47	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	152,2	1,8	97,5	0,7	-	-	4,73	prácticamente libre de partículas
congelación/descongel.	5 ciclos	-	1,9	97,3	0,8	-	-	4,54	prácticamente libre de partículas
5°C	8 meses	-	2,2	97,7	0,1	47,5	23,3	5,24	con muchas partículas
25°C	8 meses	-	2,9	95,0	2,1	58,5	17,8	6,33	con muchas partículas
40°C	8 meses	152,1	8,8	78,2	13,0	66,6	5,2	10,8	con muchas partículas

ES 2 564 281 T3

La F14 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de histidina, 135 mM de arginina, 0,02% de polisorbato 80, de pH 5,5.

Condición de almacenamiento	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	154.7	1.6	97.7	0.8	45.7	23.8	11.3	prácticamente libre de partículas
agitación 5°C	1 semana	-	1.6	97.7	0.7	-	-	10.9	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	153.0	1.6	97.6	0.8	-	-	11.8	prácticamente libre de partículas
congelación/ descongel.	5 ciclos	-	1.8	97.5	0.8	-	-	10.9	prácticamente libre de partículas
5°C	8 meses	-	2.0	97.9	0.1	46.7	23.3	11.1	con muchas partículas
25°C	8 meses	-	2.5	95.3	2.3	55.9	18.7	11.4	con muchas partículas
40°C	8 meses	155.1	8.5	76.7	14.7	64.2	6.6	13.3	con muchas partículas

ES 2 564 281 T3

La F15 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de histidina, 200 mM de trehalosa, 0,04% de poloxámero 188, de pH 5,5.

Condición de almacenado	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	151.1	1.8	98.1	0.2	50.5	23.9	4.94	prácticamente libre de partículas
agitación 5°C	1 semana	-	1.9	98.0	0.1	-	-	4.42	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	150.7	2.0	97.8	0.2	-	-	4.06	prácticamente libre de partículas
congelación/descongel. 5°C	5 ciclos	-	1.9	98.0	0.1	-	-	4.25	prácticamente libre de partículas
25°C	8 meses	-	2.1	97.5	0.4	51.9	23.9	n.d.	prácticamente libre de partículas
40°C	8 meses	-	2.9	94.2	2.9	59.6	19.6	5.40	prácticamente libre de partículas
	8 meses	152.3	9.7	74.4	15.9	66.5	5.0	6.36	prácticamente libre de partículas

ES 2 564 281 T3

La F16 es una formulación líquida con una composición de 150 mg/ml de Abeta, 20 mM de histidina, 135 mM de arginina, 0,04% de poloxámero 188, de pH 5,5.

Condición de almacenado	Tiempo almacenado	Conc. proteína (mg/ml)	HPLC exclusión de tamaño			HPLC intercambio iónico		Turbidez (FTU)	Partículas visibles
			HMW (%)	monómero (%)	LMW (%)	pico 1 (%)	pico 2 (%)		
-	inicial	151,8	1,6	98,2	0,2	-	50,4	23,9	prácticamente libre de partículas
agitación 5°C	1 semana	-	1,7	98,1	0,1	-	-	-	prácticamente libre de partículas
agitación 25°C	1 semana	147,9	1,8	98,1	0,2	-	-	-	prácticamente libre de partículas
congelación/ descongel. 5°C	5 ciclos	-	1,7	98,1	0,1	-	-	-	prácticamente libre de partículas
25°C	8 meses	-	1,9	97,7	0,4	-	51,8	23,9	prácticamente libre de partículas
40°C	8 meses	-	2,3	94,6	3,1	-	57,5	20,6	prácticamente libre de partículas
	8 meses	152,2	8,9	72,5	18,6	-	62,6	7,3	prácticamente libre de partículas

5

Los datos de estabilidad recién presentados indican que todas las formulaciones que contienen el polisorbato 20 y el polisorbato 80 desarrollan partículas visibles después de 8 meses de almacenado a 5°C, 25°C o 40°C. Por otro lado, las formulaciones que contienen poloxámero están prácticamente libres de partículas visibles después de un almacenado de 8 meses a 5°C, 25°C y 40°C. Por consiguiente, el poloxámero es capaz de prevenir la formación de partículas visibles en las formulaciones de anticuerpo Abeta.

10

Secuencias de aminoácidos descritos en esta solicitud:

Secuencia de aminoácidos	Seq. Id. No.
péptido Abeta Aβ	1

dominio VH de anticuerpo Abeta	2
dominio VL de anticuerpo Abeta	3
CDR1 de dominio VH de anticuerpo Abeta	4
CDR2 de dominio VH de anticuerpo Abeta	5
CDR3 de dominio VH de anticuerpo Abeta	6
CDR1 de dominio VL de anticuerpo Abeta	7
CDR2 de dominio VL de anticuerpo Abeta	8
CDR3 de dominio VL de anticuerpo Abeta	9
cadena larga de anticuerpo Abeta	10
cadena corta de anticuerpo Abeta	11

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> F. Hoffmann-La Roche AG
 <120> Formulaci3n de anticuerpo
 <130> 27381 WO

10 <150> EP12158602.8
 <151> 2012-03-08
 <160> 11

15 <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
 <211> 41
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> P3ptido Abeta 42

25 <400> 1

Asp Ala Glu Phe Arg His Asp Ser Gly Tyr Glu Val His His Gln Lys
 1 5 10 15

30 Leu Val Phe Phe Ala Glu Asp Val Gly Ser Asn Lys Gly Ala Ile Ile
 20 25 30

Gly Leu Met Val Gly Gly Trp Ile Ala
 35 35 40

<210> 2
 <211> 126
 <212> PRT
 40 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Dominio VH del anticuerpo Abeta

45 <400> 2

Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

50 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

55 Ser Ala Ile Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

ES 2 564 281 T3

<211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5 <220>
 <223> CDR3 de VH de anticuerpo Abeta
 <400> 6
 10 Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr Val Arg Tyr Phe Asp
 1 5 10 15
 Val
 15 <210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 20 <220>
 <223> CDR1 de VL de anticuerpo Abeta
 <400> 7
 25 Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10
 30 <210> 8
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 35 <220>
 <223> CDR2 de VL de anticuerpo Abeta
 <400> 8
 40 Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
 1 5
 45 <210> 9
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 50 <220>
 <223> CDR3 de VL de anticuerpo Abeta
 <400> 9
 55 Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro Ile
 1 5
 60 <210> 10
 <211> 459
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Cadena larga de anticuerpo Abeta
 <400> 10
 65 Gln Val Glu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

ES 2 564 281 T3

	20	25	30	
5	Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45			
	Ser Ala Ile Asn Ala Ser Asn Ala Ser Gly Thr Arg Thr Tyr Tyr Ala 50 55 60			
10	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn 65 70 80			
	Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val 85 90 95			
15	Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Lys Gly Asn Thr His Lys Pro Tyr Gly Tyr 100 105 110			
	Val Arg Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser 115 120 125			
20	Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser 130 135 140			
	Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp 145 150 155 160			
25	Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr 165 170 175			
30	Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr 180 185 190			
	Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln 195 200 205			
35	Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp 210 215 220			
	Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro 225 230 235 240			
40	Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro 245 250 255			
45	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr 260 265 270			
	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn 275 280 285			
50	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg 290 295 300			
	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val 305 310 315 320			
	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser 325 330 335			
60	Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys 340 345 350			
	Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp 355 360 365			
65	Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe 370 375 380			
	Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu 385 390 395 400			
70				

ES 2 564 281 T3

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 405 410 415
 5 Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 420 425 430
 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 435 440 445
 10 Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 450 455
 <210> 11
 15 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 20 <223> Cadena corta de anticuerpo Abeta
 <400> 11
 25 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
 20 25 30
 30 Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
 50 55 60
 35 Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
 65 70 75 80
 40 Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Ile Tyr Asn Met Pro
 85 90 95
 Ile Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
 100 105 110
 45 Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
 115 120 125
 Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
 130 135 140
 50 Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
 145 150 155 160
 55 Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
 165 170 175
 Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
 180 185 190
 60 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 195 200 205
 Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215
 65

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica líquida estable de anticuerpo que contiene:
- 5 - de 50 mg/ml a 200 mg/ml de un anticuerpo Abeta,
 - del 0,01 % al 0,1% de un poloxámero, con preferencia del poloxámero 188,
 - de 5 mM a 50 mM de un tampón,
 - de 100 mM a 300 mM de un estabilizante,
- 10 de un pH comprendido aprox. entre 4,5 y 7,0,
 en la que el anticuerpo Abeta es un anticuerpo monoclonal que contiene una cadena larga y una cadena corta, dicha cadena larga del anticuerpo Abeta contiene un dominio VH que contiene:
- 15 - una CDR1 que contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 4,
 - una CDR2 que contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 5,
 - una secuencia CDR3 que contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 6.
- y dicha cadena corta del anticuerpo Abeta contiene un dominio VL que contiene:
- 20 - una CDR1 que contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 7,
 - una CDR2 que contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 8,
 - una secuencia CDR3 que contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 9.
2. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, cuya concentración de anticuerpo Abeta se sitúa aprox. entre
 25 100 mg/ml y 200 mg/ml, con preferencia en torno a 150 mg/ml.
3. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1 ó 2, en la que el poloxámero está presente en una
 concentración comprendida aprox. entre el 0,02% y el 0,06%, con preferencia en torno al 0,04 %.
4. La formulación farmacéutica de las reivindicaciones de 1 a 3, en la que el tampón es un tampón de acetato sódico
 30 o un tampón de histidina, con preferencia un tampón de histidina/clorhidrato de histidina.
5. La formulación farmacéutica de las reivindicaciones de 1 a 4, en la que el tampón tiene una concentración
 comprendida entre aprox. 10 y 30 mM, con preferencia en torno a 20 mM.
- 35 6. La formulación farmacéutica de las reivindicaciones de 1 a 5, en la que el pH de la formulación se sitúa entre 5 y
 6, con preferencia en torno a 5,5.
7. La formulación farmacéutica de las reivindicaciones de 1 a 6, cuyo estabilizante se elige entre azúcares y
 40 aminoácidos.
8. La formulación farmacéutica de la reivindicación 7, cuyo estabilizante se elige entre trehalosa y arginina.
9. La formulación farmacéutica de la reivindicación 7 ó 8, cuyo estabilizante tiene una concentración comprendida
 45 entre aprox. 100 mM y 300 mM.
10. La formulación farmacéutica de la reivindicación 8 ó 9, cuyo estabilizante es la trehalosa y tiene una
 concentración comprendida entre aprox. 150 mM y 250 mM, con preferencia en torno a 200 mM.
11. La formulación farmacéutica de la reivindicación 8 ó 9, cuyo estabilizante es la arginina y tiene una concentración
 50 comprendida entre aprox. 100 mM y 150 mM, con preferencia en torno a 135 mM.
12. La formulación farmacéutica de las reivindicaciones de 1 a 11, en la que el dominio VH del anticuerpo Abeta
 contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 2 y el dominio VL del anticuerpo Abeta contiene la
 55 secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 3.
13. La formulación farmacéutica de las reivindicaciones de 1 a 12, en la que la cadena larga del anticuerpo Abeta
 contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 10.
14. La formulación farmacéutica de las reivindicaciones de 1 a 13, en la que la cadena corta del anticuerpo Abeta
 60 contiene la secuencia de aminoácidos de la Seq. Id. No. 11.
15. La formulación farmacéutica de las reivindicaciones de 1 a 14, en la que el anticuerpo monoclonal Abeta es una
 mezcla de anticuerpos Abeta monoglicosilados y anticuerpos Abeta biglicosilados, dicho anticuerpo monoglicosilado
 65 contiene una asparagina glicosilada (Asn) en la posición 52 de la Seq. Id. No. 2 en el dominio VH de un sitio de
 unión de anticuerpo y en la que el anticuerpo biglicosilado contiene una asparagina glicosilada (Asn) en la posición
 52 de la Seq. Id. No. 2 en el dominio VH de los dos sitios de unión del anticuerpo y dicha mezcla contiene menos del
 5% de un anticuerpo no glicosilado en la posición 52 de la Seq. Id. No. 2 en el dominio VH.