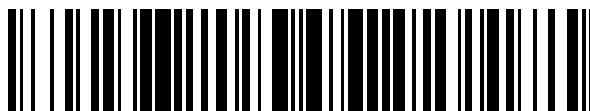


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 579 835**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2009 E 09764858 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2376533**

54 Título: **Formulación de anticuerpo**

30 Prioridad:

10.12.2008 EP 08170884

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

17.08.2016

73 Titular/es:

**NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH**

72 Inventor/es:

**MOMM, JOACHIM y
WALLNY, HANS-JOACHIM**

74 Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 579 835 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 anticuerpo

- 5 La presente invención se refiere a novedosas formulaciones farmacéuticas, en particular novedosas formulaciones farmacéuticas en donde el ingrediente activo comprende anticuerpos humanos para la interleucina-1-beta humana (IL-1 β), en particular los anticuerpos descritos en la Publicación Internacional Número WO 2002/016436.
- 10 Los anticuerpos, como otros productos terapéuticos de proteína, son moléculas complejas y, en general, se tienen que utilizar grandes cantidades de anticuerpos en las formulaciones farmacéuticas debido a su dosis terapéuticamente efectiva en los mamíferos, en particular en los seres humanos. Las formulaciones líquidas de productos terapéuticos de proteína deben mantener intacta la actividad biológica de los productos terapéuticos de proteína y deben proteger a los grupos funcionales de los productos terapéuticos de proteína de la degradación durante la elaboración y la vida de anaquel. Las sendas de degradación para las proteínas pueden involucrar inestabilidad química o inestabilidad física.
- 15 Las primeras sugerencias acerca de la manera de resolver los problemas de la inestabilidad de las formulaciones de los productos terapéuticos de proteína incluían la liofilización del producto de fármaco, seguida por la reconstitución inmediatamente o poco antes de la administración. Sin embargo, la formulación reconstituida requiere ser reproducible, estable y fisiológicamente activa con el objeto de lograr una preparación segura con resultados terapéuticos efectivos.
- De una manera conveniente, las formulaciones farmacéuticas líquidas de los productos terapéuticos de proteína, es decir, los anticuerpos, deben ser estables a largo plazo, y deben contener una cantidad segura y efectiva del compuesto farmacéutico.
- 20 Daugherty et al. (Advanced Drug Delivery Reviews 58, 2006 pp 686-706) describe agrupaciones para obtener formulaciones líquidas estables de anticuerpos. La WO 03/039485 se refiere a formulaciones líquidas de anticuerpos IgG, e.g. Zenapax™ (anti-CD25). La WO 03/105894 se refiere a formulaciones líquidas de anticuerpos IgG1 de Synagis™ (proteína F anti-RSV).
- 25 Un problema apreciado durante mucho tiempo con las formulaciones líquidas de los productos terapéuticos de proteína es el de la aglomeración, en donde las moléculas de proteína se adhieren físicamente entre sí, por ejemplo, dando como resultado la formación de una materia insoluble opaca o precipitación, la cual puede mostrar reacciones inmunológicas indeseadas. Adicionalmente, un problema importante causado por la formación del aglomerado es que, durante la administración, la formulación puede bloquear las jeringas o las bombas, y las puede hacer inseguras para los pacientes.
- 30 Por consiguiente, existe una necesidad de formulaciones que comprendan productos terapéuticos de proteína, en particular anticuerpos que sean estables a largo plazo, que estén libres de aglomeración en altas concentraciones de anticuerpos. La presente invención resuelve la necesidad identificada anteriormente mediante la provisión de una formulación novedosa que comprende un anticuerpo, que está libre aglomerados de proteína, que es estable, y que tiene una viscosidad suficientemente baja, y que, por consiguiente, es adecuada para su administración a mamíferos, en particular a sujetos humanos. La interleucina-1 β (IL-1beta o IL-1 β o Interleucina-1 β tienen el mismo significado en la presente) es un potente inmunomodulador que media un gran número de respuestas inmunitarias e inflamatorias. La producción inapropiada o excesiva de IL-1 β está asociada con la patología de diferentes enfermedades y trastornos, tales como septicemia, choque séptico o endotóxico, alergias, asma, pérdida ósea, isquemia, embolia, artritis reumatoide, y otros trastornos inflamatorios. Se han propuesto anticuerpos para IL-1 β para utilizarse en el tratamiento de las enfermedades y los trastornos mediados por la IL-1; véase, por ejemplo, la WO 95/01997 y la discusión en la introducción de la misma, y la WO 02/16436.
- 35 40 El anticuerpo para IL-1 β particularmente preferido para las formulaciones de la presente invención es el anticuerpo ACZ885 como se describe posteriormente en la presente en la SEQ ID NO: 1 y en la SEQ ID NO: 2, o los fragmentos funcionales de las mismas que conserven afinidad por el antígeno, tales como F(ab)₂, Fab, scFv, los dominios VH, y las regiones determinantes de complementariedad (CDRs). Los péptidos de señalización en Seq. Id. No. 1 y Seq. Id. No. 2 se muestran en *itálica* de acuerdo con WO 02/16436.
- 45 Es un objeto de la presente invención proporcionar una formulación de anticuerpo que sea estable después de su almacenamiento y suministro. De acuerdo con la presente invención, una formulación estable es una formulación en donde el anticuerpo de la misma retiene esencialmente su estabilidad e integridad física y química después de su almacenamiento. Por ejemplo, la cantidad de sustancias e impurezas relacionadas con el producto en seguida de la liofilización y del almacenamiento, o del almacenamiento en el caso de la formulación líquida, es de aproximadamente el

2 al 5 por ciento, de preferencia del 2 al 3 por ciento. La estabilidad de la formulación de anticuerpo se puede medir utilizando ensayos de actividad biológica, y en donde la actividad biológica después de su almacenamiento es de aproximadamente el 80 al 125 por ciento de la actividad original. La actividad biológica del anticuerpo en la formulación de la invención después de su almacenamiento se mide en un ensayo de gen reportero, utilizando la línea celular genéticamente modificada, como se describe en la sección de Ejemplos posteriormente en la presente.

Es un objeto adicional proporcionar una formulación de anticuerpo líquida estable que sea adecuada para su administración subcutánea. De preferencia, la formulación líquida también es adecuada para su liofilización y su reconstitución subsiguiente. También es un objeto proporcionar una formulación que sea estable durante cuando menos el tiempo en el cual se administrará a un mamífero, en particular a un sujeto humano.

En general, se prefiere utilizar pequeños volúmenes de la formulación farmacéutica para inyección subcutánea (usualmente de 1.0 mililitros a 1.2 mililitros como máximo). En el caso de las formulaciones que comprenden anticuerpos, por ejemplo, terapias de anticuerpos de dosis alta, la administración subcutánea requiere formulaciones de anticuerpos de alta concentración (por ejemplo, de 50 miligramos/mililitro a 150 miligramos/mililitro o más). Debido a las altas concentraciones de anticuerpos requeridas, las formulaciones que comprenden anticuerpos presentan desafíos en relación con la estabilidad física y química del anticuerpo, la formación de aglomerados, y las dificultades con la elaboración, el almacenamiento, y el suministro de la formulación de anticuerpo. La mayor viscosidad de las formulaciones de proteína tiene implicaciones negativas por el procesamiento, por ejemplo, la procesabilidad del líquido a través del suministro del fármaco al paciente, por ejemplo, en una alta viscosidad, la formulación líquida ya no pasa a través del calibre de una aguja sin dificultad, provocando malestar al paciente; duración de la inyección; y utilidad del auto-inyector. Adicionalmente, se desean formulaciones de anticuerpos en una concentración relativamente alta con viscosidades adecuadamente bajas como un requisito previo para una fácil elaboración, almacenamiento, y administración. El término "viscosidad", como se utiliza en la presente, puede ser "viscosidad cinemática" o "viscosidad absoluta". Comúnmente, la viscosidad cinemática se expresa en centistokes (cSt). La unidad SI de viscosidad cinemática es mm^2/s , que es de 1 cSt. La viscosidad absoluta se expresa en unidades de centipoise (cP). La unidad SI de viscosidad absoluta es el milipascal-segundo (mPa-s), en donde 1 cP = 1 mPa-s.

Por consiguiente, la presente invención proporciona formulaciones que comprenden anticuerpos de IL-1 β y que son estables y están libres de aglomerados en altas concentraciones de anticuerpos, mientras que tienen una viscosidad suficientemente baja.

Una formulación de anticuerpo farmacéutica líquida debe exhibir una variedad de características previamente definidas. Una de las principales preocupaciones en los productos de fármaco líquidos es la estabilidad, debido a que las proteínas tienden a formar aglomerados solubles e insolubles durante la elaboración y el almacenamiento. En adición, se pueden presentar diferentes reacciones químicas en solución (desamidación, oxidación, sujeción, isomerización, etc.) que conducen a un aumento en los niveles de productos de degradación y/o pérdida de bioactividad. De preferencia, una formulación de anticuerpo líquida debe exhibir una vida de anaquel de más de 18 meses. Más preferiblemente, una formulación de ACZ885 líquida debe exhibir una vida de anaquel de más de 24 meses. La vida de anaquel y la actividad de un anticuerpo de IL-1 β se define en el ensayo de bioactividad de la sección de Ejemplos, en donde la actividad debe permanecer entre el 80 por ciento y el 125 por ciento de la actividad original.

Una formulación de anticuerpo, en particular una formulación de anticuerpo de ACZ885 debe exhibir una vida de anaquel de aproximadamente 36 a 60 meses a 2-8°C. De preferencia, la formulación líquida de ACZ885 debe exhibir una vida de anaquel de aproximadamente 24 a 36 meses a 2-8°C. De preferencia, la formulación liofilizada de ACZ885 debe exhibir una vida de anaquel de preferencia de aproximadamente hasta 60 meses a 2-8°C. Los principales factores que determinan la vida de anaquel usualmente son la formación de subproductos y productos de degradación y pérdida de bioactividad. La formulación de la presente invención logra estos niveles de estabilidad deseados.

Aparte de una estabilidad física y química suficiente, la formulación debe ser de un valor de pH y una osmolaridad aceptables (de 250 a 500 mOsm/kg) para aplicación subcutánea. Sin embargo se reportó en la literatura que las preparaciones con una alta osmolaridad (de hasta 1100 mOsm/kg) se podría administrar subcutáneamente sin aumentar de una manera significativa la percepción del dolor o la duración de las quemaduras después de la inyección. También se sabe que una alta concentración de anticuerpos aumentaría la viscosidad de la formulación y también la aglomeración. La formulación farmacéutica adecuada de acuerdo con la invención tiene una viscosidad de aproximadamente menos de 16 mPas, de preferencia de 3 a 16 mPas, y muy preferiblemente de 3 a 10 mPas.

De acuerdo con la presente invención, de una manera sorprendente, ahora se ha encontrado que se pueden obtener formulaciones de anticuerpos particularmente estables que tienen propiedades convenientes en la conservación de la actividad del anticuerpo durante un largo período de almacenamiento, evitando la aglomeración, y teniendo una

viscosidad adecuada a pesar de las altas concentraciones de anticuerpos. La presente invención proporciona, en su aspecto más amplio, una formulación farmacéutica (formulación de la invención) que comprende un anticuerpo, como ingrediente activo, y un sistema regulador del pH, un estabilizante, y un tensoactivo. La formulación de la invención es líquida.

5 La presente invención se refiere a una formulación novedosa, la cual comprende anticuerpos para IL-1 β , como ingrediente activo, y un sistema regulador del pH, en donde el valor del pH es de 5.5 a 7.5, de preferencia de 5.5 a 7, preferiblemente de 6.2 a 6.8. De una manera más específica, la invención se refiere a una formulación farmacéutica novedosa, la cual comprende el anticuerpo ACZ885, como ingrediente activo, y un sistema regulador del pH, en donde el valor del pH es de 5.5 a 7.5, de preferencia de 5.5 a 7, preferiblemente de 6.2 a 6.8.

10 Ahora hemos descubierto que se puede preparar una formulación estable utilizando un sistema regulador, dando como resultado una formulación que tiene un pH de 5.5 a 7.5, de preferencia de 5.5 a 7, preferiblemente de 6.2 a 6.8. En un aspecto particular, el pH es cualquier valor de pH dentro de aquéllos enumerados anteriormente; por ejemplo, 6.2, 6.3, 6.4, 6.5, 6.6, 6.7, 6.8.

15 La concentración del sistema regulador adecuado utilizado para la formulación de acuerdo con la presente invención es de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 40 mM, dependiendo, por ejemplo, del regulador y de la estabilidad deseada de la formulación. En la modalidad preferida, el sistema regulador es histidina; y la histidina se utiliza de preferencia en una concentración de 10 a 50 mM, de preferencia de 15 a 40 mM, preferiblemente de 20 a 30 mM.

20 La formulación de la invención comprende además un estabilizante. El estabilizante de acuerdo con la presente invención es manitol. La concentración de manitol usada para la formulación de acuerdo con la presente invención es de aproximadamente 50 a 300 mM, de preferencia de 180 a 300 mM, y muy preferiblemente de aproximadamente 270 mM de manitol.

25 La formulación de la invención puede comprender opcionalmente además uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende agente de volumen, sal, tensoactivo y conservador. Un agente de volumen es un compuesto que agrega masa a una formulación farmacéutica y contribuye a la estructura física de la formulación en la forma liofilizada. Los agentes de volumen adecuados de acuerdo con la presente invención incluyen manitol, glicina, polietilenglicol, y sorbitol. La concentración del agente de volumen utilizado para la formulación de acuerdo con la presente invención es de 20 a 90 mM.

30 El uso de un tensoactivo puede reducir la aglomeración de la proteína reconstituida y/o puede reducir la formación de particulados en la formulación reconstituida. La cantidad de tensoactivo agregada es tal que reduce la aglomeración de la proteína reconstituida y minimiza la formación de particulados después de la reconstitución.

35 Los tensoactivos adecuados de acuerdo con la presente invención incluyen polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20 u 80); poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188); Triton; dodecil-sulfato de sodio (SDS); lauril-sulfato de sodio; octil-glicósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil-, o estearil-sulfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil-, o cetil-betaína; lauro-amido-propil-, cocamido-propil-, linoleamido-propil-, miristamido-propil-, palmido-propil-, o iso-estearamido-propil-betaína (por ejemplo, lauro-amido-propilo); miristamido-propil-, palmido-propil-, o iso-estearamido-propil-dimetil-amina; metil-cocoil-aurato de sodio, o metil-oleil-aurato de disodio; y la serie MONAQUAT® (Mona Industries, Inc., Paterson, Nueva Jersey), poli-etil-glicol, poli-propil-glicol, y copolímeros de etileno y propilenglicol (por ejemplo, Pluronic, PF68, etc.). En una modalidad preferida, el tensoactivo se puede seleccionar a partir del grupo que
40 consiste en: polisorbatos 20 y polisorbatos 80,

La concentración del tensoactivo utilizado para la formulación de acuerdo con la presente invención es de aproximadamente el 0.001 al 0.5 por ciento, o de aproximadamente el 0.005 al 0.10 por ciento, de preferencia del 0.01 al 0.10%, más preferiblemente de aproximadamente el 0.04 al 0.06 por ciento en peso por volumen de la formulación.

45 Opcionalmente se pueden utilizar conservadores en las formulaciones de la invención. Los conservadores adecuados para utilizarse en la formulación de la invención incluyen cloruro de octadecil-dimetil-bencil-amonio, cloruro de hexametonio, cloruro de bensalconio (una mezcla de cloruros de alquil-bencil-dimetil-amonio, en donde los grupos alquilo son compuestos de cadena larga), y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservadores incluyen alcoholes aromáticos, tales como fenol, alcohol butílico y bencílico, alquil-parabenos, tales como metil- o propil-parabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol, y m-cresol.

- 5 Se pueden incluir otros vehículos, excipientes, o estabilizantes farmacéuticamente aceptables, tales como aquéllos descritos en Remington's Science and Practice of Pharmacy, 21^a Edición, (2005) o Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding, 3^a Edición (2008) en la formulación de la invención, en el entendido de que no afecten adversamente a las características deseadas de la formulación. Los vehículos, excipientes o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas, e incluyen además agentes reguladores; conservadores; co-solventes; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; agentes quelantes, tales como EDTA; complejos de metales (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); polímeros biodegradables, tales como poliésteres; y/o contra-iones formadores de sales, tales como sodio.
- 10 La invención proporciona, en un aspecto, una formulación líquida estable, la cual comprende, el anticuerpo para IL-1 β , ACZ885 en donde el pH de la formulación líquida o reconstituida es de 5.5 a 7.5, de preferencia de 5.5 a 7, preferiblemente de 6.2 a 6.8, con el objeto de lograr suficiente estabilidad, aglomeración mínima y viscosidad aceptablemente baja. La formulación adicionalmente comprende manitol como un estabilizador y uno o más excipientes seleccionados de un grupo que consiste de un agente voluminoso, sal, surfactante y conservador como se describe aquí anteriormente.
- 15 La invención, por consiguiente, proporciona una formulación farmacéutica, la cual comprende:
- a) un anticuerpo para IL-1 β ACZ885; utilizado en una concentración de aproximadamente 10 a 150 miligramos/mililitro; y
 - b) un sistema regulador, de histidina, a una concentración de aproximadamente 10 a 50 mM; y en donde el pH del sistema regulador es cualquier valor de pH dentro de 5.5 a 7.5, de preferencia 6.2 a 6.8; y :
 - c) un estabilizante, de manitol, a una concentración de aproximadamente 50 a 300 mM; y opcionalmente,
- 20 d) excipientes adicionales seleccionados a partir del grupo que comprende agente de volumen, sal, tensoactivo y conservador.
- En ciertas modalidades de la invención, se utiliza un agente de volumen (por ejemplo, manitol o glicina) en la preparación de la formulación previamente liofilizada. El agente de volumen puede permitir la producción de una torta liofilizada uniforme sin bolsas excesivas en la misma.
- 25 Una formulación líquida preferida de la presente invención proporciona una formulación que comprende ACZ885 en una concentración: de 10 a 150 miligramos/mililitro, manitol 270 mM, histidina 20 mM, y polisorbato 80 al 0.04 por ciento, en donde el pH de la formulación es de 6.5.
- En una modalidad, la formulación puede ser administrada por vía subcutánea.
- 30 Las formulaciones de la invención son útiles para la profilaxis y el tratamiento de las enfermedades o condiciones médicas mediadas por IL-1, por ejemplo, condiciones inflamatorias, alergias y condiciones alérgicas, reacciones de hipersensibilidad, enfermedades autoinmunes, infecciones graves, y rechazo de trasplante de órganos o tejidos.
- Es un objeto de la presente invención proporcionar el uso de la formulación de la invención, para el tratamiento de las enfermedades o condiciones médicas mediadas por IL-1.
- 35 Por ejemplo, las formulaciones de la invención se pueden usar para el tratamiento de los receptores de trasplantes de corazón, pulmón, corazón-pulmón combinados, hígado, riñón, páncreas, piel o córnea, incluyendo rechazo de aloinjerto o rechazo de xenoinjerto, y para la prevención de la enfermedad del injerto contra el huésped, tal como en seguida de trasplante de médula ósea, y arterio-esclerosis asociada con trasplante de órgano.
- 40 Las formulaciones de la invención son particularmente útiles para el tratamiento, la prevención, o la mitigación de enfermedades autoinmunes y de condiciones inflamatorias, en particular las condiciones inflamatorias con una etiología que incluya un componente autoinmune, tales como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis crónica progrediente, y artritis deformante), y enfermedades reumáticas, incluyendo condiciones inflamatorias y enfermedades reumáticas que involucren pérdida ósea, dolor inflamatorio, hipersensibilidad (incluyendo tanto hipersensibilidad de las vías respiratorias como hipersensibilidad dérmica), y alergias. Las enfermedades autoinmunes específicas para las cuales se pueden emplear las formulaciones de la invención incluyen trastornos hematológicos autoinmunes (incluyendo, por ejemplo,
- 45 anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia de glóbulos rojos puros, y trombocitopenia idiopática), lupus eritematoso sistémico, policondritis, esclerodoma, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, hepatitis activa crónica, miastenia

grave, soriasis, síndrome de Steven-Johnson, prurito idiopático, enfermedad inflamatoria autoinmune del intestino (incluyendo, por ejemplo, colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn, y Síndrome de intestino irritable), oftalmopatía endocrina, enfermedad de Graves, sarcoidosis, esclerosis múltiple, cirrosis biliar primaria, diabetes juvenil (diabetes mellitus tipo I), uveítis (anterior y posterior), queratoconjuntivitis sicca y queratoconjuntivitis vernal, fibrosis pulmonar intersticial, artritis sorriática, y glomerulonefritis (con y sin síndrome nefrótico, por ejemplo, incluyendo síndrome nefrótico idiopático o nefropatía de cambio mínimo).

5

Las formulaciones de la invención también son útiles para el tratamiento, la prevención, o la mitigación de asma, bronquitis, neumoconiosis, enfisema pulmonar, y otras enfermedades obstructivas o inflamatorias de las vías respiratorias

10 Las formulaciones de la invención son útiles para el tratamiento de reacciones inflamatorias agudas e hiper-agudas indeseables que sean mediadas por IL-1 o que involucren la producción de IL-1, en especial de IL-1 β , o la promoción de la liberación de TNF por parte de la IL-1, por ejemplo, infecciones agudas, por ejemplo, choque séptico (por ejemplo, choque endotóxico, y síndrome de insuficiencia respiratoria de adultos), meningitis, neumonía; y quemaduras graves; y para el tratamiento de caquexia o síndrome de consunción asociado con liberación patológica de TNF, a consecuencia de infección, cáncer, o disfunción de órganos, en especial caquexia relacionada con SIDA, por ejemplo, asociada con, o a consecuencia de, infección por VIH.

15

Las formulaciones de la invención son particularmente útiles para el tratamiento de las enfermedades del metabolismo óseo, incluyendo osteoartritis, osteoporosis, y otras artritis inflamatorias, y pérdida ósea en general, incluyendo pérdida ósea relacionada con la edad, y en particular enfermedad periodontal.

20 Las formulaciones de la invención son útiles en la prevención y el tratamiento de síndromes auto-inflamatorios en los pacientes, tales como en los mamíferos, en particular en los seres humanos. Los síndromes auto-inflamatorios de acuerdo con la invención son, por ejemplo, pero no limitándose a, un grupo de trastornos heredados caracterizados por episodios recurrentes de inflamación, que, en contraste con las enfermedades autoinmunes, carecen de una alta titulación de auto-anticuerpos o de células-T específicas del antígeno. Adicionalmente, los síndromes auto-inflamatorios de acuerdo con la invención, muestran un aumento en la secreción de IL-1 β (pérdida de la función reguladora negativa de la pirina que parece mutada en estas enfermedades), activación de NF κ B y apoptosis de leucocitos deteriorada). Los síndromes auto-inflamatorios de acuerdo con la invención son los síndromes de Muckle-Wells (MWS), LADA (diabetes autoinmune latente en adultos), síndrome auto-inflamatorio frío familiar (FCAS), síndromes periódicos asociados con criopirina (CAPS), síndrome inflamatorio de múltiples sistemas de establecimiento neonatal (NOMID), síndrome neurológico, cutáneo, articular infantil crónico (CINCA), fiebre del Mediterráneo familiar (FMF) y/o cierta forma de artritis juvenil, tal como artritis idiopática juvenil de establecimiento sistémico (SJIA), cierta forma de artritis reumatoide juvenil, tal como artritis reumatoide idiopática juvenil de establecimiento sistémico y/o cierta forma de artritis reumatoide de adultos.

25

30

De preferencia, las formulaciones de la invención son útiles en la prevención y el tratamiento de artritis reumatoide juvenil y artritis reumatoide de adultos y/o Síndrome de Muckle Wells. Las formulaciones de la invención también pueden ser útiles en el tratamiento de diabetes tipo 2, en donde los estudios clínicos y pre-clínicos muestran una mejor función de los islotes mediante el bloqueo de la IL-1. Las formulaciones de la invención también son útiles en el tratamiento de diferentes patologías relacionadas con la diabetes, tales como retinopatía, sanado de heridas, enfermedades vasculares, (incluyendo restenosis arterial después de implante vascular (stent) o angioplastia), disfunción renal, enfermedad crónica del riñón, y síndrome metabólico y obesidad. Las formulaciones de la invención también pueden ser útiles en el tratamiento de migraña, sinovitis, gota, pseudo-gota / artritis gotosa o condrocalcinosis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), daño pulmonar inducido por ventilación, diferentes condiciones de dolor, tales como dolor resistente a la morfina, dolor neuropático, dolor por parto prematuro, dolor discogénico, dolor inflamatorio, dolor de cabeza, o migraña. La IL-1 β está involucrada en la percepción del dolor y amplifica las señales neurogénicas. Adicionalmente, las formulaciones de la invención son útiles en el tratamiento de aterosclerosis, cólico renal agudo, cólico biliar y dolor relacionado con estos trastornos.

35

40

45

Las formulaciones de la invención pueden ser útiles en el tratamiento de los síndromes de fiebre periódicos: fiebre del Mediterráneo familiar (FMF), síndrome periódico asociado con los receptores del factor de necrosis tumoral (TRAPS), síndrome de hiperinmunoglobulina D (HIDS), también denominado como síndrome de fiebre periódico asociado con la cinasa de mevalonato, síndrome auto-inflamatorio frío familiar, y síndrome de fiebre periódica, estomatitis aftosa, faringitis, adenitis (PFAPA), en donde la IL-1 β es una citoquina dominante. Otras enfermedades en donde la IL-1 β es una citoquina dominante y que se pueden tratar de acuerdo con la invención, con las formulaciones de la invención, comprenden síndrome anti-sintetasa, síndrome de activación de macrófagos MAS, enfermedad de Behçet, síndrome de Blau, síndrome de PAPA, síndrome de Schnitzler, síndrome de Sweet. El bloqueo del receptor-ligando de IL-1 β y los

50

- 5 compuestos de IL-1beta de la invención también se pueden utilizar para tratar vasculitidas; arteritis de células gigantes (GCA), púrpura de Henoch-Schoenlein, vasculitis sistémica primaria enfermedad de Kawasaki (síndrome de ganglio linfático mucocutáneo), arteritis de Takayasu, poliarteritis nodosa, vasculitis crioglobulinémica esencial, poliangiitis microscópica (MPA) y síndrome de Churg–Strauss (CSS), vasculitis con urticaria. Adicionalmente, las formulaciones de la invención son útiles en el tratamiento de las enfermedades autoinmunes como sarcoidosis, pénfigo, espondilitis anquilosante, enfermedad de Alzheimer, amiloidosis, amiloidosis secundaria, y enfermedad de Stille de establecimiento en adultos (AOSD).
- 10 Las formulaciones de la invención se pueden utilizar para tratar las enfermedades asociadas con HLA-B27, tales como, pero no limitándose a, soriasis, espondilitis anquilosante, Morbus Reiter, y artritis enteropática. Los compuestos de IL-1beta de acuerdo con la invención se pueden utilizar para tratar fiebre reumática, polimialgia reumática y arteritis de células gigantes. Finalmente, las formulaciones de la invención se pueden utilizar para tratar infecciones, en particular infecciones bacterianas e infecciones virales, más particularmente, infecciones bacterianas asociadas con síntomas u observaciones artríticas, tales como, pero no limitándose a, osteomielitis hematogénica, artritis infecciosa, artritis tuberculósica.
- 15 Para las indicaciones anteriores, la dosificación apropiada variará dependiendo, por ejemplo, del anticuerpo particular para IL-1 β que se vaya a emplear, del huésped, del modo de administración, y de la naturaleza y gravedad de la condición que se esté tratando. La frecuencia de dosificación para los usos profilácticos normalmente estará en el intervalo de aproximadamente una vez por semana hasta aproximadamente una vez cada 3 meses, más usualmente en el intervalo de aproximadamente una vez cada 2 semanas hasta aproximadamente una vez cada 10 semanas, por ejemplo, una vez cada 4 a 8 semanas.
- 20 La formulación de la invención se administra adecuadamente al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos, y se puede administrar al paciente en cualquier tiempo desde el diagnóstico en adelante; se puede administrar como el único tratamiento o en conjunto con otros fármacos o terapias útiles en el tratamiento de las condiciones como se describen anteriormente en la presente.
- 25 Un tratamiento profiláctico típicamente comprende administrar la formulación de la invención desde una vez al mes hasta una vez cada 2 a 3 meses, o con menor frecuencia.
- 30 La formulación de la invención que comprende el ACZ885 se administra de preferencia por la vía intravenosa, pero también por la vía mediante inyección subcutánea o intramuscular. Para estos propósitos, la formulación se puede inyectar utilizando una jeringa. Por ejemplo, la formulación que comprende el ACZ885 se administra utilizando una jeringa auto-inyectora normal, la cual puede ser previamente llenada, opcionalmente en un paquete estéril, opcionalmente las jeringas con dispositivos de seguridad. También se prevén los parches de micro-agujas y recubiertos con depósitos como dispositivos de administración adecuados.
- 35 La formulación de la invención se puede administrar a un mamífero, de preferencia a un ser humano, que necesite el tratamiento con el anticuerpo para IL-1 β , es decir, ACZ885, de acuerdo con los métodos conocidos, tales como administración intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un período de tiempo, por las vías intramuscular, intraperitoneal, intraceroespinal, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica, o mediante inhalación.
- 40 Las formulaciones para utilizarse para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles, antes o en seguida de la liofilización y reconstitución. De una manera alternativa, se puede llevar a cabo la esterilización de toda la mezcla pasando los ingredientes por autoclave, con la excepción del anticuerpo, a aproximadamente 120°C durante aproximadamente 30 minutos, por ejemplo.
- 45 La formulación de la invención que comprende el ACZ885 de preferencia se administra mediante inyección subcutánea en los tratamientos de artritis reumatoide en adultos (RA), artritis reumatoide juvenil (SJIA, pJIA), enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), síndromes periódicos asociados con criopirina (CAPS), síndrome de Muckle-Wells (MWS), osteoartritis (OA), y potencialmente diabetes tipo 2 y gota.
- El término tratamiento se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas.
- El término mamífero para los propósitos del tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, de deportes, o de mascota, tales

5 como perros, caballos, gatos, reses, etc. De preferencia, el mamífero es un ser humano. Un trastorno es cualquier condición que se beneficiaría con el tratamiento con un anticuerpo para IL-1 β . Éste incluye los trastornos o las enfermedades crónicas y agudas, incluyendo las condiciones patológicas que predispongan al mamífero al trastorno en cuestión. Los ejemplos no limitantes de los trastornos que se van a tratar en la presente incluyen las enfermedades y trastornos anteriormente mencionados.

Una cantidad terapéuticamente efectiva es cuando menos la concentración mínima requerida para efectuar una mejora o prevención mensurable de un trastorno particular.

Leyendas de las Figuras:

10 La Figura 1 muestra un panorama de los resultados obtenidos mediante la RP-HPLC (superior), y la SEC (inferior) para la formulación de ACZ885 después de su almacenamiento durante 4 semanas a 40°C.

La Figura 2 muestra un panorama de los resultados obtenidos para la potencia relativa de la formulación de ACZ885 después de su almacenamiento durante 4 semanas a 40°C.

EJEMPLOS

Preparación de una formulación líquida y su liofilizado

15 Se desarrolla una formulación de ACZ885 que permite tanto su administración intravenosa después de la reconstitución, como la subsiguiente dilución y administración subcutánea después de la reconstitución. Se seleccionaron cuatro sistemas reguladores diferentes (sistemas reguladores de citrato, histidina, succinato de sodio, y fosfato de sodio/potasio, concentración de 40 mM cada uno), para probar su idoneidad para las formulaciones de ACZ885.

20 Se emplean ciclos de agitación y de congelación/ descongelación como pruebas de estrés, para clasificar el orden de idoneidad de los sistemas reguladores con respecto a la aglomeración de proteína.

La aglomeración de proteína se podría evitar más eficientemente utilizando el regulador de histidina o de citrato en un intervalo de pH de 5.0 a 7, como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1

Resultados analíticos del rastreo de los sistemas reguladores

Sal reguladora	valores pKa	pH (planeado)	pH (medido)	Suma de Aglomerados mediante SEC [%]
Histidina	pK _a = 6.1, grupo imidazol	6.0	5.8	0.37
		6.5	6.2	0.21
		7.0	6.6	0.38
Succinato	pK _{a1} = 4.19, pK _{a2} = 5.57	5.0	5.2	0.39
		5.5	5.6	0.39

Sal reguladora	valores pKa	pH (planeado)	pH (medido)	Suma de Aglomerados mediante SEC [%]
		6.0	6.0	0.42
Fosfato	pK _{a2} = 7.21	6.0	6.2	0.47
		6.5	6.7	0.74
		7.0	7.0	3.94
Citrato	pK _{a2} = 4.76, pK _{a3} = 6.40	5.0	5.3	0.38
		5.5	5.7	0.40
		6.0	6.2	0.39

Se investigó un intervalo de pH de 3.5 a 8.0 con pasos crecientes de 0.5 unidades. Después de un almacenamiento de 4 semanas a 40°C, se concluyeron diferentes pHs óptimos de 6.2 a 6.8 basándose en los resultados a partir de diferentes técnicas analíticas aplicadas, como se muestra en la Figura 1.

5

Tabla 2

Resultados analíticos para la liofilización

Códi-go	Regulador (20 mM)	Sacarosa agregada	Viscosidad [mPas]	Osmolaridad [mOsm]	Suma de Aglomerados mediante SEC [%]
F1	Histidina pH 6.2	--	14.8	382	5.4
F2	Histidina pH 6.2	90 mM	11.0	392	0.6

Código	Regulador (20 mM)	Sacarosa agregada	Viscosidad [mPas]	Osmolaridad [mOsm]	Suma de Aglomerados mediante SEC [%]
F3	Citrato pH 6.0	--	13.2	386	3.9
F4	Citrato pH 6.0	90 mM	11.0	445	0.6

Los resultados para las muestras reguladas por histidina y citrato fueron similares. El regulador de citrato puede ser crítico en las formulaciones subcutáneas debido al aumento en la percepción del dolor después de la aplicación; por consiguiente, se puede preferir la histidina sobre el citrato para las aplicaciones subcutáneas.

5 Después de la selección de los sistemas reguladores adecuados, se investigó el impacto de los estabilizantes sobre la aglomeración de proteína. Las formulaciones que contenían sacarosa, glicina, manitol, sorbitol o trehalosa se analizaron después de 6 y 16 semanas de almacenamiento a 5°C y 40°C. Se observó una coloración amarilla para las formulaciones que contenían sacarosa almacenadas a 40°C, probablemente debido a la reacción de Maillard entre los grupos amino de proteína o histidina y el azúcar reductor. Se seleccionaron las formulaciones que contenían sacarosa o manitol para la formulación liofilizada y reconstituida. Las formulaciones que contenían manitol se seleccionaron para la formulación líquida.

15 Se llevaron a cabo estudios adicionales para evaluar la influencia de la concentración del tensoactivo sobre la estabilidad físico-química de la formulación de la invención. Los datos de la materia en partículas que se encuentran más adelante mostraron los valores más altos para la formulación sin tensoactivo, indicando que el Tween es benéfico para la estabilidad física de las muestras. En una concentración del 0.10 por ciento de Tween, los datos de la materia en partículas tienden a ser más altos comparándose con los niveles más bajos.

Tabla 3

Resultados analíticos para Tween: Partículas subdivisibles por oscurecimiento de luz (materia en partículas) después de 10 meses

Concentración de Tween	5°C			25°C		
	Partículas / mL > 1.0 µm	Partículas / mL > 1.0 µm	Partículas / mL > 10.9 µm	Partículas / mL > 25.7 µm	Partículas / mL > 10.9 µm	Partículas / mL > 25.7 µm
Sin Tween	6353	11644	14	0	3	0
0.01% Tween 80	862	2044	0	0	2	0
0.04% Tween 80	1217	2077	2	0	0	0
0.10% Tween 80	2180	2424	0	0	3	0
0.01% Tween 20	1349	2105	0	0	0	0
0.04% Tween 20	1410	1077	1	0	2	0
0.10% Tween 20	1071	2382	2	0	2	0

5

Las muestras de la formulación líquida que contenía 150 miligramos/mililitro de ACZ885, Histidina 20 mM, Manitol 270 mM, Tween 80 al 0.04 por ciento (masa/volumen), con un pH de 6.5 se almacenaron a 5°C, 25°C y 40°C durante hasta 24 meses. A 5°C, no se pudieron detectar cantidades mayores de aglomerados tanto solubles como insolubles. La bioactividad, determinada utilizando el ensayo de gen reportero como se describe posteriormente en la presente, estuvo dentro del 70 al 125 por ciento. Estos datos (véanse las Tablas 4 a 6) mostraron que la formulación probada fue estable después de su almacenamiento durante 24 meses.

Tabla 4

Datos analíticos del rastreo, 5°C

Períodos de almacenamiento	Inicio	2 meses	4 meses	10 meses	16.5 meses	24 meses
Ensayo mediante SEC [mg/mL]	152.2	155.0	151.9	153.0	153.0	151.9
Ensayo de gen reportero [%]	121	n. d.	97	99	110	99 (n=4)
Apariencia de la solución: color	Incolora	Incolora	Ligera- mente castaña (B8-B9)	Ligera- mente castaña (B8-B9)	Ligera- mente castaña (B8)	Castaña (B5-B6) Sin partí- culas visibles
Turbiedad	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	Fuerte- mente opales- cente (23 NTU)	opales- cente (17 NTU)
LLS [Da]	155'750	151'800	147'400	142'300	147'800	155'700
Valor de pH	6.7	6.7	6.6	6.6	6.6	6.6
Subproductos y productos de degradación mediante SEC [%]	AP1: 0.3 -	AP1: 0.4 -	AP1: 0.4 DPx: 1.2	AP1: 0.6 DPx: no resuelto	AP1: 0.6 DPx: no resuelto	AP1: 0.8 DPx: 0.2

ES 2 579 835 T3

Períodos de almacenamiento	Inicio	2 meses	4 meses	10 meses	16.5 meses	24 meses
	-	-	-	-	-	DP3: 0.2
Impurezas mediante SDS-PAGE [%]	0.8	0.8	0.8	0.8	0.9	1.1
Impurezas mediante el Bioanalizador [%]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	H1: 0.7 M1: 3.1 M2: 0.3 M3: 0.7 L1: 0.0 L2: 0.3 suma: 5.2	H1: 0.7 M1: 2.1 M2: 0.0 M3: 0.6 L1: 0.0 L2: 0.3 suma: 3.8
CEX [%]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0K: 48.7 1K: 19.6 2K: 15.8 Suma Otra: 15.9	0K: 43.4 1K: 19.1 2K: 10.5 Suma Otra: 27.0

APx a DP3: Peso molecular desde el más alto hasta el más bajo; AP1: Dímero, DPx: P100, DP3: P50.

Tabla 5

Datos analíticos del rastreo, 25°C

Períodos de almacenamiento	Inicio	2 meses	4 meses	10 meses	16.5 meses	24 meses
Ensayo mediante SEC [mg/mL]	152.2	146.7	145.8	149.8	141.8	134.2
Ensayo de gen reportero [%]	121	n.d.	100	85	74	70 (n=4)
Apariencia de la solución: color	Incolora	Incolora	Ligera-mente castaña (B8-B9)	Ligera-mente castaña (B8-B9)	Ligera-mente castaña (B6)	Castaña (B5-B6) Sin partículas visibles
Turbiedad	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	fuerte-mente opalescente (22 NTU)	fuerte-mente opalescente (24 NTU)
LLS [Da]	155'750	150'250	152'250	148'700	172'250	189'800
Valor de pH	6.7	6.7	6.6	6.6	6.6	6.6
Subproductos y productos de degradación mediante SEC [%]	- - AP1: 0.3 - - -	- - AP1: 0.7 - - DP3: 0.1	- - AP1: 0.9 - DPx: 1.4 DP3: 0.2	- - AP1: 1.8 AP: 0.2 DPx: 3.7 DP3:0.6	- - AP1: 2.6 AP: 0.2 DPx: 1.7 DP3: 1.1	APx: 0.4 AP2: 0.2 AP1: 3.7 AP: 0.5 DPx: 2.6 DP3: 1.5

Períodos de almacenamiento	Inicio	2 meses	4 meses	10 meses	16.5 meses	24 meses
Impurezas mediante SDS-PAGE [%]	0.8	1.5	1.7	3.6	4.2	6.7
Impurezas mediante el Bioanalizador [%]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	H1: 1.7 H2: 0.0 H3: 0.0 M1: 4.1 M2: 1.0 M3: 0.7 M4: 0.3 L1: 0.4 L2: 0.8 suma: 8.9	H1: 2.1 H2: 0.4 H3: 0.3 M1: 3.7 M2: 1.1 M3: 0.7 M4: 0.0 L1: 0.6 L2: 0.7 suma: 9.7
CEX [%]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	OK: 36.2 1K: 16.6 2K: 11.0 Suma Otra: 36.2	OK: 12.6 1K: 6.7 2K: 3.3 Suma Otra: 77.4

APx a DP3: Peso molecular desde el más alto hasta el más bajo; AP1: Dímero, DPx: P100, DP3: P50.

Tabla 6

Datos analíticos del rastreo, 40°C

Períodos de almacenamiento	Inicio	2 meses	4 meses	10 meses	16.5 meses
Ensayo mediante SEC [mg/mL]	152.2	142.9	128.1	114.1	94.5
Ensayo de gen reportero [%]	121	78	53	n.d.	n.d.
Apariencia de la solución: color	Incolora	Ligera-mente castaña (B7)	Ligera-mente castaña (B6-B7)	Amarilla (G4-G5)	Castaña (B4)
Turbiedad	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	fuera del

ES 2 579 835 T3

Períodos de almacenamiento	Inicio	2 meses	4 meses	10 meses	16.5 meses
					rango (58 NTU)
LLS [Da]	155'750	162'950	192'500	259'650	403'350
Valor de pH	6.7	6.6	6.6	6.6	6.6
Subproductos y productos de degradación mediante SEC [%]	- - AP1: 0.3 - - -	APx: 0.4 AP2: 0.1 AP1: 2.8 AP: 0.2 - DP3: 0.9	APx: 1.9 AP2: 0.3 AP1: 5.0 AP: 0.8 DPx: 5.5 DP3: 1.9	APx: 4.4 AP2: 1.4 AP1: 10.2 AP: 2.2 DPx: 11.7 DP3: 4.4	APx: 6.1 AP2: 2.1 AP1: 15.0 AP: 3.3 DPx: 12.2 DP3: 8.6
Impurezas mediante SDS-PAGE [%]	0.8	5.8	6.7	12.5	13.3
CEX [%]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	véase cromatograma

APx a DP3: Peso molecular desde el más alto hasta el más bajo; AP1: Dímero, DPx: P100, DP3: P50.

Reconstitución de la formulación liofilizada

- 5 Las formulaciones líquidas para ACZ885 de acuerdo con la invención son adecuadas para liofilización. La liofilización se puede hacer bajo condiciones normales bien conocidas en la materia de la farmacia. Se puede incluir un agente de volumen para agregar peso y visibilidad al liofilizado, tal como glicina. Después del anticuerpo, se mezclan entre sí el agente regulador (en una cantidad de 10 a 40 mM), el estabilizante, y el tensoactivo, y se liofiliza la formulación.

Tabla 7

Formulaciones para la estabilidad técnica (antes de la liofilización)

Código	Sacarosa [mM]	Histidina pH 6.0 – 6.2 [mM]	Tween 80 [%]
F1	60	10	0.02
F3	90	10	0.02

5 La reconstitución en términos generales tiene lugar a una temperatura de 15°C a 25°C para asegurar una hidratación completa. El liofilizado se reconstituye con agua estéril.

La concentración objetivo después de la reconstitución es de 150 miligramos/mililitro, siendo cada formulación liofilizada y reconstituida con agua.

Estabilidad

Se almacenan diferentes formulaciones durante tres meses a 2°C – 8°C, 25°C y 40°C.

10 Se utiliza la aglomeración enseguida de la liofilización y el almacenamiento, como un indicador de la estabilidad de la proteína.

Ensayo de Gen Reportero

15 Se midió la actividad biológica del ACZ885 en un ensayo de gen reportero, utilizando la línea celular genéticamente modificada. Esta línea celular se derivó a partir de las células renales embrionarias humanas, y se transfectó establemente con una construcción de reportero en donde se fusionó el promotor NF-kappa b (un promotor que responde a la IL-1 β) corriente arriba del gen de luciferasa. La transfección se hizo mediante la co-introducción de un gen de resistencia a la neomicina. En esta línea celular, la exposición a la IL-1 β estimuló la expresión de luciferasa de una manera dependiente de la dosis. La adición de cantidades graduadas de ACZ885 a una dosis sub-máxima fija de IL-1 β provocó una disminución en la expresión de luciferasa durante un período de incubación de hasta 18 horas. Al final del período de incubación, la cantidad de luciferasa se cuantificó basándose en su actividad enzimática en el lisado celular. La luciferasa catalizó la conversión del sustrato de luciferina hasta oxiluciferina, un producto quimiluminiscente. Entonces se determinó la quimiluminiscencia del brillo resultante con un luminómetro apropiado.

25 La potencia biológica de una muestra de prueba de ACZ885 se determinó mediante una comparación de su capacidad para inhibir la inducción de la actividad de luciferasa dependiente de la IL-1 β con aquélla de un estándar de referencia de ACZ885. Las muestras y el estándar se normalizaron con base en el contenido de proteína. Entonces se calculó la potencia relativa utilizando un ensayo de líneas paralelas de acuerdo con la Farmacopea Europea. El resultado final se expresó como la potencia relativa (en porcentaje) de una muestra comparándose con el estándar de referencia.

Reactivos y reguladores:

- Medio básico para cultivo celular MEM + Earle + L-Glutamina;
- 30 - Suero fetal de becerro (FCS) inactivado por calor, rastreo de micoplasma;

- Geneticina;
 - Regulador de disociación celular sin enzimas, basado en suero regulado con fosfato (PBS);
 - Medio básico para el ensayo OptiMEM-I + GlutaMAX-I;
 - Sustrato de luciferasa para quimiluminiscencia de tipo de brillo;
- 5 - Interleucina -1 beta (IL-1 β) recombinante.

Pasos del procedimiento de ensayo:

- (1) Se prepararon diferentes concentraciones del estándar de referencia y de las muestras de prueba, llevando a cabo varias diluciones a 1:2 a partir de una solución inicial de 400 nanogramos/ mililitro de ACZ885;
- 10 (2) Se agregaron 2 x 10⁴ células resuspendidas en el medio de ensayo a cada pozo de una placa de microtitulación de 96 pozos;
- (3) El ensayo se inició mediante la adición de una solución de IL-1beta. La incubación en una incubadora humidificada con CO₂ fue durante hasta 18 horas;
- (4) Después de la incubación, se agregó la solución de sustrato de luciferasa a todos los pozos. La placa se incubó adicionalmente en la oscuridad durante 10 minutos, y se determinó la luminiscencia de cada pozo mediante un lector de luminiscencia de placas de microtitulación apropiado;
- 15 (6) La potencia relativa promedio no ponderada de una muestra se calculó utilizando la evaluación de líneas paralelas de acuerdo con la Farmacopea Europea (EP) a partir de cuando menos dos experimentos independientes.

Tabla 8

Resultados analíticos para la estabilidad técnica:

Código	Tiempo de reconstitución	Opalescencia	pH	Ensayo mediante UV [mg/ml]	Iso-cuant iso-asp/proteína [%]	Peso molecular mediante LLS [kDa]	Suma de Aglomerados mediante SEC [%]	Ensayo mediante SEC [mg/ml]	Bio-ensayo [%]	
F1	5°C (I)	4min 45seg	ninguna	6.2	171.8	3.8	149.2	1.0	164.8	103
	5°C (II)	4min 30seg	ninguna	6.2	172.5	3.9	149.4	1.0	167.7	
	25°C (I)	4min 45seg	ninguna	6.2	171.9	5.6	152.7	2.7	163.6	99
	25°C (II)	4min 45sec	ninguna	6.2	168.4	6.3	153.3	2.7	160.0	
	40°C (I)	4min 30seg	ninguna	6.2	172.5	9.5	161.6	7.6	152.7	93

Código	Tiempo de reconstitución	Opalescencia	pH	Ensayo mediante UV [mg/ml]	Iso-cuant iso-asp/proteína [%]	Peso molecular mediante LLS [kDa]	Suma de Aglomerados mediante SEC [%]	Ensayo mediante SEC [mg/ml]	Bio-ensayo [%]	
	40°C (II) *	>12min	ninguna	6.2	166.2	10.3	162.9	7.9	153.0	
F3	5°C (I)	4min 00seg	ninguna	6.2	167.4	3.4	149.6	0.8	163.1	101
	5°C (II)	4min 00seg	ninguna	6.2	162.8	3.1	149.1	0.8	163.0	
	25°C (I)	4min 30seg	ninguna	6.2	159.4	4.9	151.4	1.7	158.2	91
	25°C (II)	4min 30seg	ninguna	6.2	155.1	4.7	152.3	1.6	161.7	
	40°C (I) *	4min 45seg	ninguna	6.2	164.4	6.6	156.6	4.5	154.9	95
	40°C (II) *	5min 45seg	ninguna	6.2	166.01	6.1	155.7	4.5	156.8	

* Se adhieren pedazos de la torta en el fondo.

La formulación 3 mostró la cantidad más baja de aglomeración. Las formulaciones 1 y 3 mostraron una actividad biológica, después de su almacenamiento, de aproximadamente el 90 al 105 por ciento de la actividad original.

Administración de la formulación

- 5 La dosificación apropiada (es decir, la cantidad terapéuticamente efectiva) de ACZ885 depende, por ejemplo, de la condición que se vaya a tratar, de la gravedad y del curso de la condición, si se administra ACZ885 para propósitos preventivos o terapéuticos, de la terapia anterior, de la historia clínica del paciente, y de la respuesta al ACZ885, y de la discreción del médico que atiende.

ACZ885 Región variable de cadena pesada SEQ ID NO: 1

```

-19 M E F G L S W V F L V A L L R G V Q C Q 1
    V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L S 21
    C A A S G F T F S V Y G M N W V R Q A P 41
    G K G L E W V A I I W Y D G D N Q Y Y A 61
    D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y L 81
    Q M N G L R A E D T A V Y Y C A R D L R 101
    T G P F D Y W G Q G T L V T V S S 118
  
```

ACZ885 Región variable de cadena ligera SEQ ID NO: 2

```

-19 M L P S Q L I G F L L L W V P A S R G E 1
    I V L T Q S P D F Q S V T P K E K V T I 21
    T C R A S Q S I G S S L H W Y Q Q K P D 41
    Q S P K L L I K Y A S Q S F S G V P S R 61
    F S G S G S G T D F T L T I N S L E A E 81
    D A A A Y Y C H Q S S S L P F T F G P G 101
    T K V D I K 107
  
```

LISTADO DE SECUENCIAS

- 5 <110> Novartis AG
- <120> Formulación de anticuerpos de IL-1b
- <130> 53159
- <160> 4
- <170> PatentIn versión 3.3
- 10 <210> 1
- <211> 117
- <212> PRT
- <213> Humano
- <400> 1

ES 2 579 835 T3

Met Glu Phe Gly Leu Ser Trp Val Phe Leu Val Ala Leu Leu Arg Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Val Tyr Gly Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Ile Ile Trp Tyr Asp Gly Asp Asn Gln Tyr Tyr Ala
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Thr Gly Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

5 <213> Humano

<400> 2

Met Leu Pro Ser Gln Leu Ile Gly Phe Leu Leu Leu Trp Val Pro Ala
1 5 10 15

Ser Arg Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Asp Phe Gln Ser Val

ES 2 579 835 T3

			20					25					30			
Thr	Pro	Lys	Glu	Lys	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	
		35					40					45				
Gly	Ser	Ser	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Asp	Gln	Ser	Pro	Lys	
	50					55					60					
Leu	Leu	Ile	Lys	Tyr	Ala	Ser	Gln	Ser	Phe	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	
65					70					75					80	
Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Asn	Ser	
				85					90					95		
Leu	Glu	Ala	Glu	Asp	Ala	Ala	Ala	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Ser	Ser	Ser	
			100					105					110			
Leu	Pro	Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys			
		115					120					125				

<210> 3

<211> 410

<212> ADN

5 <213> humano

<400> 3

atggagtttg	ggctgagctg	ggttttcctc	gttgctcttt	taagaggtgt	ccagtgtcag	60
gtgcagctgg	tggagtctgg	gggaggcgtg	gtccagcctg	ggaggtcctt	gagactctcc	120
tgtgcagcgt	ctggattcac	cttcagtgtt	tatggcatga	actgggtccg	ccaggctcca	180
ggcaaggggc	tggagtgggt	ggcaattatt	tggtatgatg	gagataatca	atactatgca	240
gactccgtga	agggccgatt	caccatctcc	agagacaatt	ccaagaacac	gctgtatctg	300
caaatgaacg	gcctgagagc	cgaggacacg	gctgtgtatt	attgtgagag	agatcttagg	360
actgggcctt	ttgactactg	gggccagggg	accctgggtca	ccgtctcctc		410

ES 2 579 835 T3

<210> 4

<211> 378

<212> ADN

<213> humano

5 <400> 4

```
atggtgcat cacaactcat tgggtttctg ctgctctggg ttccagcctc caggggtgaa      60
attgtgctga ctcagtctcc agactttcag tctgtgactc caaaggagaa agtcaccatc      120
acctgcccgg ccagtcagag cattggtagt agcttacact ggtaccagca gaaaccagat      180
cagtctccaa agctcctcat caagtatgct tcccagtcct tctcaggggt cccctcgagg      240
ttcagtggca gtggatctgg gacagatttc accctacca tcaatagcct ggaagctgaa      300
gatgctgcag cgtattactg tcatcagagt agtagtttac cattcacttt cggccctggg      360
accaaagtgg atatcaaa                                     378
```

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica líquida estable que comprende de 10 a 150 miligramos/mililitro de un anticuerpo para IL-1 β , el cuales ACZ885, en donde el sistema regulador es histidina a una concentración de 10 a 50 mM, el estabilizador es manitol en una cantidad de 50 a 300mM y la formulación tiene un pH de 5.5 a 7.5.
- 5 2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la formulación tiene un pH de 6.2 a 6.8.
3. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación mantiene entre 80% y 125% de la actividad original durante 24 meses a 2-8°C según se determina mediante un ensayo de gen reportero.
- 10 4. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se usa histidina a una concentración de 15 a 40 mM.
5. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde se usa histidina a una concentración de 20 a 30 mM.
6. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el manitol está presente en una cantidad de 180 a 300 mM.
- 15 7. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde el manitol está presente en una cantidad de 270 mM.
8. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, la cual comprende además uno o más excipientes seleccionados a partir del grupo que comprende agente de volumen, sal, tensoactivo, y conservador.
- 20 9. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación es para administración subcutánea.
10. Una formulación que comprende de 10 a 150 miligramos/ mililitro de ACZ885, manitol 270 mM, histidina 20 mM, y polisorbato 80 al 0.04 por ciento, en donde el pH de la formulación es 6.5.
11. Una forma de dosificación que comprende la formulación líquida de cualquiera de las reivindicaciones precedentes.
12. Una jeringa que comprende la formulación líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10.
- 25 13. Un autoinyector que comprende la jeringa de la reivindicación 12.
14. Un autoinyector que comprende la formulación líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10.

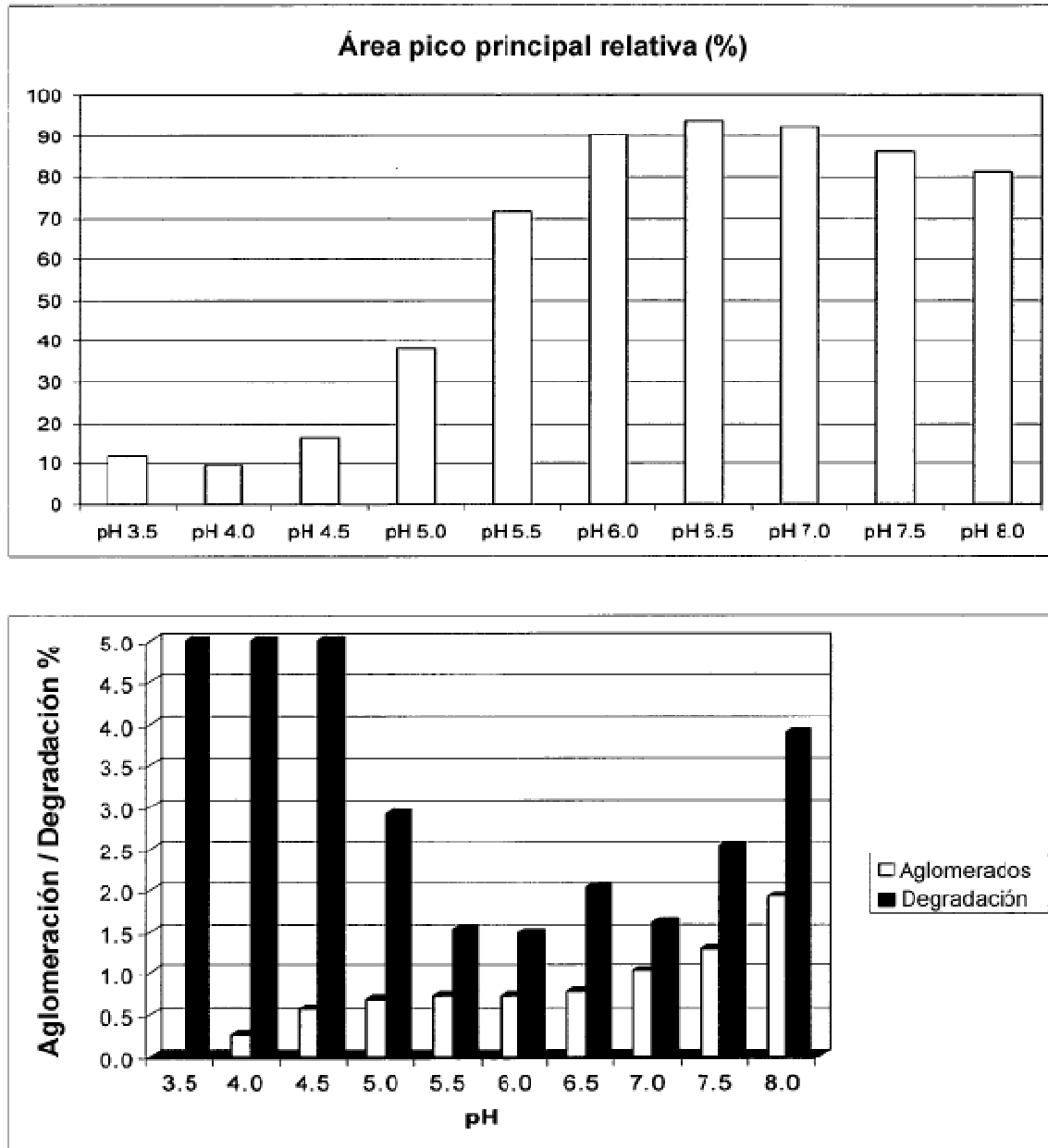


FIG. 1

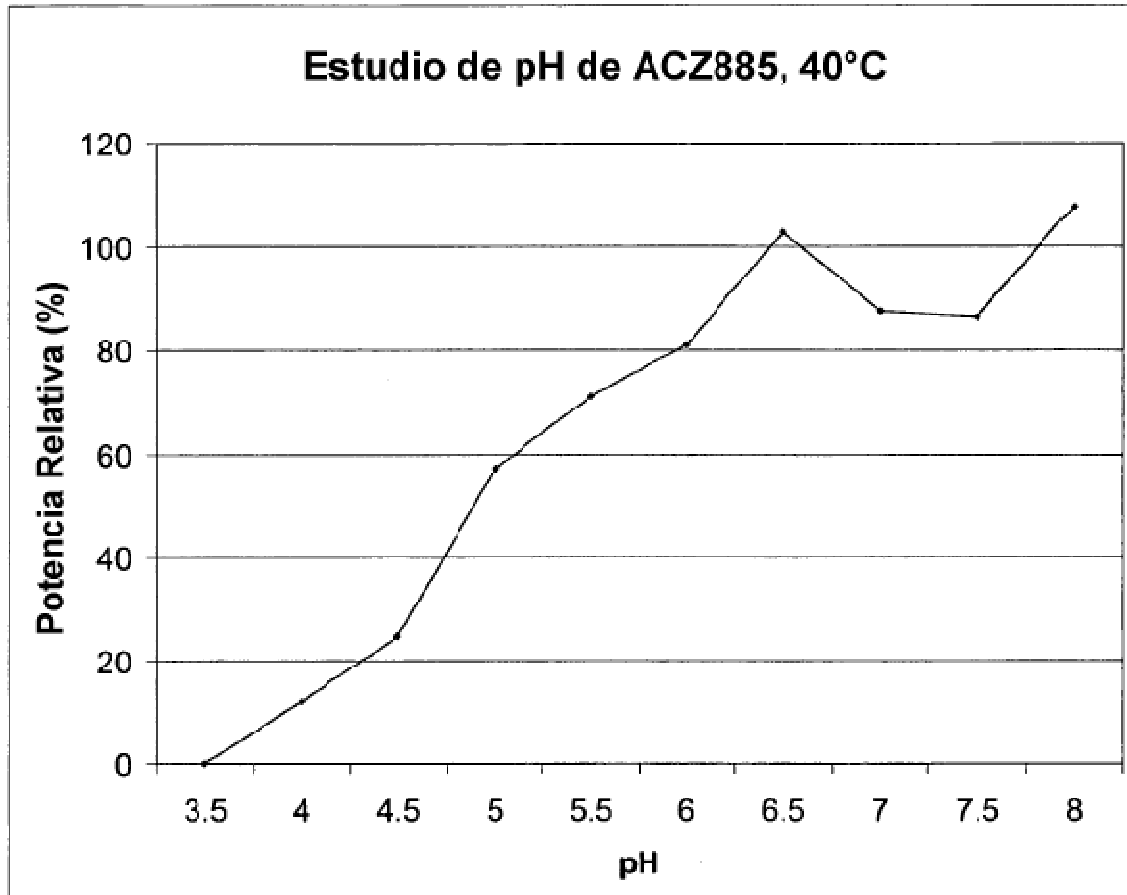


FIG. 2