

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 601 202**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.11.2011 PCT/US2011/060388**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2012 WO12065072**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.11.2011 E 11839071 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.09.2016 EP 2637690**

54 Título: **Formulaciones líquidas de anticuerpos anti-TNT-alfa de alta concentración**

30 Prioridad:

**15.11.2010 US 413960 P**  
**11.11.2010 US 412728 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**14.02.2017**

73 Titular/es:

**ABBVIE BIOTECHNOLOGY LTD (100.0%)**  
**Clarendon House 2, Church Street**  
**HM 11 Hamilton, BM**

72 Inventor/es:

**NEU, MICHAEL;**  
**TSCHOEPE, MARKUS;**  
**WEBER, CARSTEN;**  
**REDDEN, LAURA;**  
**FRAUNHOFER, WOLFGANG;**  
**GASTENS, MARTIN;**  
**FEICK, ALEXANDER;**  
**PAULSON, SUSAN K. y**  
**ZHU, TONG**

74 Agente/Representante:

**PONTI SALES, Adelaida**

**ES 2 601 202 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

Formulaciones líquidas de anticuerpos anti-TNT-alfa de alta concentración

### 5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 [0001] La formulación de proteínas terapéuticas, tales como anticuerpos, a menudo es un desafío dadas las numerosas propiedades deseables que la formulación debe tener para ser económica y terapéuticamente satisfactoria, por ejemplo, estabilidad, idoneidad para la administración, concentración. Durante la fabricación, almacenamiento y distribución, se sabe que las proteínas terapéuticas sufren degradaciones físicas y químicas. Estas inestabilidades pueden reducir la potencia de la proteína y aumentar el riesgo de eventos adversos en los pacientes y, por lo tanto, tienen un impacto significativo sobre la autorización reguladora (véase, por ejemplo, Wang et al. J. Pharm. Sci. 96:1, 2007). Como tal, una formulación de proteína estable es esencial para el éxito de una proteína terapéutica.

15 [0002] Para ser efectivas, muchas proteínas terapéuticas requieren la administración de altas dosis, que, idealmente, se formulan en formulaciones de alta concentración. Las formulaciones de alta concentración de proteínas son deseables, ya que pueden tener un impacto sobre el modo (por ejemplo, intravenoso frente a subcutáneo) y la frecuencia de administración del fármaco a un sujeto.

20 [0003] A pesar de los beneficios de las formulaciones de alta concentración de proteínas, formular proteínas terapéuticas en altas concentraciones presenta numerosos desafíos. Por ejemplo, aumentar la concentración de proteínas a menudo tiene un impacto negativo sobre la agregación de proteínas, solubilidad, estabilidad y viscosidad (véase por ejemplo, Shire et al. J. Pharm. Sci. 93:1390, 2004). Aumentar la viscosidad, que es un desafío muy común para disoluciones de alta concentración de proteínas, puede tener ramificaciones negativas sobre la administración de la formulación, por ejemplo, sentir dolor y el síndrome de ardor y limitaciones en la fabricación, procesamiento, llenado final y opciones de dispositivos de administración del fármaco (véase, por ejemplo, Shire et al. J. Pharm. Sci. 93:1390, 2004). Incluso para proteínas terapéuticas que tienen características estructurales comunes, por ejemplo los anticuerpos, las formulaciones autorizadas hasta la fecha han tenido componentes e intervalos variables de concentración. Por ejemplo, el anticuerpo anti-CD20 Rituxan se formula para administración intravenosa a una concentración de 10 mg/ml, mientras que el anticuerpo anti-RSV Synagis se formula para administración intramuscular a una concentración de 100 mg/ml. Así pues, las formulaciones de alta concentración de proteínas, especialmente formulaciones de anticuerpos, que pueden usarse para fines terapéuticos todavía representan un desafío.

35 [0004] Otro desafío asociado a las proteínas terapéuticas, tales como los anticuerpos, es la administración de fármacos. Mientras que los dispositivos de autoadministración permiten a los pacientes evitar visitas innecesarias a las instalaciones médicas para recibir tratamientos, la conciencia del paciente y su temor del dolor asociado a la autoadministración, a menudo pueden tener impacto sobre la administración de fármacos autoadministrados. 40 Además, las formulaciones que tienen altas concentraciones de proteínas pueden tener una alta viscosidad, produciendo un mayor dolor tras la administración, particularmente para administración subcutánea. Así pues, existe especialmente una necesidad de formulaciones de alta concentración que reduzcan el dolor asociado a la administración del fármaco (por ejemplo, autoinyección).

45 [0005] Por consiguiente, existe la necesidad de formulaciones de proteínas estables de alta concentración que proporcionen ventajas de dosificación y administración, particularmente con respecto a una disminución del dolor para el paciente y/o biodisponibilidad mejorada.

### RESUMEN DE LA INVENCION

50 [0006] La presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de nuevas formulaciones de alta concentración para anticuerpos terapéuticos (incluyendo anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  humanos, o fragmentos de unión al antígeno de los mismos, por ejemplo, adalimumab). Las formulaciones de la presente invención proporcionan varias características sorprendentes, dada la alta concentración del anticuerpo terapéutico. 55 Específicamente, la presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  humanos que tienen sorprendentemente una biodisponibilidad mejorada o menos dolor tras la administración subcutánea.

[0007] En particular, la presente invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento inesperado y

sorprendente de que una formulación que tiene una alta concentración de anticuerpos, un tensioactivo y un poliol, proporciona una reducción drástica del dolor al paciente durante la administración del fármaco, particularmente la administración subcutánea del anticuerpo mediante, por ejemplo, autoinyección. Las formulaciones de la invención se establecen, al menos en parte, en el hallazgo sorprendente de que una proteína terapéutica (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ , o una porción de unión al antígeno del mismo), puede permanecer soluble a una alta concentración de proteínas (por ejemplo, al menos aproximadamente 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 96, 100, 105, 110 mg/ml, o más) y mantener una viscosidad adecuada para inyección (por ejemplo, administración subcutánea). La formulación de la presente invención es además sorprendente porque la formulación no contiene un tampón o una sal, sino que tiene una alta concentración del anticuerpo. Notablemente, la formulación de la invención reduce el dolor asociado a la inyección en un paciente al menos aproximadamente el 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más) cuando se compara con inyectar una formulación por lo demás idéntica que comprende al menos una sal y/o al menos un tampón.

**[0008]** Así pues, en un caso, la divulgación proporciona una formulación acuosa líquida que comprende un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  o una porción de unión al antígeno del mismo; un tensioactivo; y un poliol; en la que la formulación no contiene un tampón o una sal, y reduce el dolor asociado a la inyección en un paciente al menos aproximadamente el 50 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 % o más) cuando se compara con inyectar una formulación por lo demás idéntica que comprenda al menos una sal y/o al menos un tampón.

**[0009]** En otro caso, la divulgación proporciona una formulación acuosa líquida que comprende un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano aislado o una porción de unión al antígeno del mismo, un tensioactivo y menos de 50 mg/ml de un poliol, en la que la inyección de la formulación a un sujeto humano produce una puntuación en la Escala visual analógica (VAS) del dolor menor de 1,0. En un caso, la divulgación proporciona una formulación acuosa líquida que consiste esencialmente en un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, un tensioactivo y menos de 50 mg/ml de un poliol, en la que la inyección de la formulación en un sujeto humano produce una puntuación en la Escala visual analógica (VAS) del dolor menor de 1,0. En un caso, la escala de VAS es de 0 (sin dolor) a 10 (dolor insoportable).

**[0010]** En un caso adicional, la divulgación proporciona una formulación acuosa líquida que comprende un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, un tensioactivo y menos de 50 mg/ml de un poliol, en la que la formulación no contiene un tampón y una sal, y en la que la inyección de la formulación reduce el dolor asociado a la inyección en un sujeto humano al menos aproximadamente el 50 % cuando se compara con la inyección de una formulación por lo demás idéntica que comprenda una sal y/o un tampón. En un caso, la formulación por lo demás idéntica comprende un tampón citrato y fosfato y cloruro sódico.

**[0011]** La divulgación proporciona además una formulación acuosa líquida que comprende un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ , o una porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración de al menos aproximadamente 50 mg/ml; un tensioactivo; y un poliol, en la que la formulación tiene una conductividad menor de aproximadamente 2 mS/cm. En un caso, la formulación tiene una conductividad menor que 1 mS/cm. En otro caso, la formulación tiene una conductividad menor que 0,9 mS/cm.

**[0012]** La divulgación también proporciona, en otro caso, una formulación acuosa líquida que comprende un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ , o una porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración de al menos aproximadamente 50 mg/ml; un tensioactivo; y un poliol, en la que el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, tiene un diámetro hidrodinámico menor de 4 nm en la formulación. En un caso, el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, tiene un diámetro hidrodinámico menor de 3 nm en la formulación.

**[0013]** La presente divulgación también proporciona una formulación acuosa líquida que comprende un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo; un tensioactivo; y menos de 50 mg/ml de un poliol; en la que la formulación tiene una característica seleccionada del grupo que consiste de una conductividad menor de aproximadamente 2 mS/cm; un diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) que es al menos aproximadamente el 50 % menor del  $D_h$  de la proteína en una solución tamponada a una concentración dada; y un diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) menor de aproximadamente 4 nm. En un caso, la formulación tiene una conductividad menor de aproximadamente 1 mS/cm. En otro caso, la formulación tiene una conductividad menor de aproximadamente 0,9 mS/cm. En un caso, el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno del mismo, tiene un diámetro hidrodinámico menor de aproximadamente 3 nm en la formulación. En otro caso, el anticuerpo, o la porción de unión al antígeno del mismo, tiene un diámetro hidrodinámico menor de aproximadamente 2 nm en la formulación.

**[0014]** La divulgación también proporciona una formulación acuosa líquida que consiste esencialmente en un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ , o una porción de unión al antígeno del mismo; un tensioactivo; y un poliol; en la que la concentración del anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ , o una porción de unión al antígeno del mismo, es al menos aproximadamente 50 mg/ml, 75 mg/ml, 100 mg/ml, o mayor de 100 mg/ml.

5

**[0015]** En un caso particular, la divulgación proporciona una formulación acuosa líquida que consiste esencialmente en una concentración de 90-110 mg/ml de un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, que tiene una región variable de la cadena ligera (LCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una modificación de SEQ ID NO: 3 mediante una sustitución de una única alanina en la posición 1, 4, 5, 7 u 8, un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y que tiene una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o una modificación de SEQ ID NO: 4 mediante una sustitución de una única alanina en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 u 11, un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8; un polisorbato, por ejemplo, polisorbato 80; y aproximadamente 38-46 mg/ml de un poliol, por ejemplo, manitol.

**[0016]** En otro caso, la presente divulgación proporciona una formulación acuosa líquida que comprende un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo; un tensioactivo y menos de 50 mg/ml de un poliol; en la que la formulación es estable hasta aproximadamente 30 °C durante al menos aproximadamente 6 días, aproximadamente 10, o aproximadamente 14 días, o es estable a aproximadamente 28 °C durante hasta aproximadamente 24 meses.

**[0017]** En otro caso, la divulgación proporciona un método de administración de un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, a un sujeto, tal que el dolor de la inyección se reduzca tras la administración, comprendiendo dicho método administrar por vía subcutánea al sujeto una formulación que comprende el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, tal que el dolor de la inyección se reduzca tras la administración, en la que la formulación comprende más de 50 mg/ml del anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo; un tensioactivo; y menos de 50 mg/ml de un poliol. En un caso, se determina que el dolor de la inyección es menos de 1,0 según una Escala visual analógica (VAS) del dolor.

**[0018]** En ciertos casos, el dolor asociado a la inyección se evalúa utilizando una Escala visual analógica (VAS) del dolor. En un caso, la escala VAS es de 0 (sin dolor) a 10 (dolor insoportable).

35

**[0019]** En ciertos casos, el dolor asociado a la inyección se evalúa después de la inyección (por ejemplo, inmediatamente, no más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 minutos, o no más de 15 minutos después de la inyección).

**[0020]** En ciertos casos, la formulación reduce el dolor asociado a la inyección en el paciente al menos aproximadamente el 60 %, 70 %, 80 % o más cuando se compara con una inyección de una formulación por lo demás idéntica que comprende al menos una sal y/o al menos un tampón.

**[0021]** La divulgación proporciona además una formulación acuosa líquida que comprende un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ , o una porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración de al menos aproximadamente 50, 75, 100 mg/ml o mayor de 100 mg/ml; un tensioactivo; y un poliol; en la que la formulación no contiene un tampón y una sal.

**[0022]** En otro caso, la divulgación proporciona una formulación acuosa líquida que comprende un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo; un tensioactivo; y menos de 50 mg/ml de un poliol; en la que la formulación es estable hasta aproximadamente 30 °C durante al menos aproximadamente 6 días. En un caso, la formulación es estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 7 días. En un caso, la formulación es estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 8 días. En un caso, la formulación es estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 9 días. En un caso, la formulación es estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 10 días. En un caso, la formulación es estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 11 días. En un caso, la formulación es estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 12 días. En un caso, la formulación es estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 13 días. En un caso, la formulación es estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 14 días. En un caso, la formulación es estable a temperatura ambiente durante al menos aproximadamente 15 días.

55

**[0023]** En un caso, el poliol usado en la formulación de la divulgación es manitol o sorbitol.

**[0024]** En un caso, la formulación de la divulgación contiene aproximadamente 20-60 mg/ml de manitol, o alternativamente, aproximadamente 30-50 mg/ml. En un caso, la formulación contiene aproximadamente 38-46 mg/ml de manitol.

**[0025]** La presente invención también se basa, al menos en parte, en el descubrimiento inesperado y sorprendente de que una formulación que tiene una alta concentración de anticuerpos y un tensioactivo proporciona una biodisponibilidad notablemente mayor de formulaciones similares que contienen excipientes adicionales, tales como un tampón, un poliol y/o una sal.

**[0026]** Así pues, en un caso, la divulgación proporciona una formulación acuosa líquida que comprende un tensioactivo y 30-90 mg de un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, en la que la formulación tiene una concentración de anticuerpos de 90-110 mg/ml, y en la que la formulación proporciona una biodisponibilidad elevada del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, a un sujeto humano tras la inyección subcutánea de la formulación con respecto a una formulación que comprende un tampón citrato-fosfato, cloruro sódico y manitol.

**[0027]** En un caso, la divulgación proporciona una formulación acuosa líquida que consiste esencialmente en un tensioactivo y 30-90 mg de un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, en la que la concentración del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, es 90-110 mg/ml.

**[0028]** En otro caso, la divulgación proporciona una formulación acuosa líquida que comprende un tensioactivo y 30-90 mg de un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, en la que la formulación tiene una concentración de anticuerpos de 90-110 mg/ml, y en la que la formulación proporciona una biodisponibilidad elevada del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, en un sujeto humano tras la inyección subcutánea de la formulación, tal que el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo tenga ABC<sub>0-360</sub> mayor de aproximadamente 1300  $\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{ml}$ .

**[0029]** En otro caso, la divulgación proporciona un método para mejorar la biodisponibilidad de un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, en un sujeto humano, comprendiendo dicho método administrar una formulación que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, y un tensioactivo al sujeto, tal que la biodisponibilidad del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, mejore, en la que la formulación no contiene un tampón, un poliol, o una sal.

**[0030]** En un caso adicional, la divulgación proporciona un método para mejorar la biodisponibilidad de un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, en un sujeto, comprendiendo dicho método la administración de una formulación que comprende una cantidad eficaz del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, y un tensioactivo, al sujeto, tal que la biodisponibilidad del anticuerpo, o la porción de unión al antígeno del mismo, en el sujeto mejore al menos aproximadamente el 15 % con respecto a una segunda formulación, en la que la formulación no contiene un tampón, un poliol o una sal, y en la que la segunda composición comprende un tampón, un poliol y una sal. En un caso, la biodisponibilidad del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, mejora al menos aproximadamente el 30 % con respecto a la segunda formulación. En un caso, la biodisponibilidad del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, mejora al menos aproximadamente el 40 % con respecto a la segunda formulación.

**[0031]** La divulgación proporciona además un método de mejora de la biodisponibilidad de un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, en un sujeto humano, comprendiendo dicho método la administración de una formulación que comprende un tensioactivo y una cantidad eficaz del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, al sujeto, tal que la biodisponibilidad del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, mejore, en la que la formulación tiene una característica seleccionada del grupo que consiste en una conductividad menor de aproximadamente 2 mS/cm; el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, tiene un diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) que es al menos aproximadamente el 50 % menor que el  $D_h$  del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, en una disolución tamponada a la concentración dada; y el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, tiene un diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) menor de aproximadamente 4 nm. En un caso, la formulación tiene una conductividad menor de aproximadamente 1 mS/cm. En otro caso, la formulación tiene una conductividad menor de aproximadamente 0,9 mS/cm. En un caso, el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, tiene un diámetro hidrodinámico menor de aproximadamente 3 nm en la formulación.

- 5 **[0032]** En un caso, la biodisponibilidad se determina según cualquiera de un nivel de ABC o una  $C_{m\acute{a}x}$ . En un caso, la biodisponibilidad se determina según cualquiera de un  $ABC_{0-360}$  o un  $ABC_{0-1344}$ . En un caso, la biodisponibilidad del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, es un  $ABC_{0-360}$  mayor de aproximadamente  $1300 \mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{ml}$  cuando se inyecta por vía subcutánea en el sujeto humano.
- 10 **[0033]** En ciertos casos, el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  es un anticuerpo humano aislado (por ejemplo, un anticuerpo IgG1 kappa humano), un anticuerpo humanizado, un anticuerpo quimérico, o un anticuerpo murino. Por ejemplo, el anticuerpo quimérico puede ser infliximab o un biosimilar del mismo, y el anticuerpo humano puede ser golimumab o adalimumab, o un biosimilar de los mismos.
- 15 **[0034]** En un caso, el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, es una IgG1 o una IgG4.
- 20 **[0035]** En un caso, el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, se disocia de TNF- $\alpha$  con una  $K_d$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menor y tiene una constante  $k_{dis}$  de  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  o menor, ambas determinadas por resonancia de plasmones superficiales. En ciertos casos, el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, se disocia de TNF- $\alpha$  humano con una  $K_d$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menor y una constante  $k_{dis}$  de  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  o menor, ambas determinadas por resonancia de plasmones superficiales, y neutraliza la citotoxicidad de TNF- $\alpha$  humano en un ensayo estándar de L929 *in vitro* con una  $CI_{50}$  de  $1 \times 10^{-7}$  M, o menor.
- 25 **[0036]** En ciertos casos, el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, tiene las siguientes características: se disocia de TNF- $\alpha$  humano con constante  $k_{dis}$  de  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  o menor, como se determina por resonancia de plasmones superficiales; tiene un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una modificación de SEQ ID NO: 3 mediante una sustitución de una única alanina en la posición 1, 4, 5, 7 u 8, o mediante una a cinco sustituciones conservativas de aminoácidos en las posiciones 1, 3, 4, 6, 7, 8 y/o 9; y (c) tiene un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una modificación de SEQ ID NO: 4 mediante una sustitución de una única alanina en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 u 11, o mediante una a cinco sustituciones conservativas de aminoácidos en las posiciones 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 y/o 12.
- 30 **[0037]** En ciertos casos, el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, tiene una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una modificación de SEQ ID NO: 3 mediante una sustitución de una única alanina en la posición 1, 4, 5, 7 u 8, y con una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o una modificación de SEQ ID NO: 4 mediante una sustitución de una única alanina en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 u 11.
- 35 **[0038]** En ciertos casos, el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, tiene una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una modificación de SEQ ID NO: 3 mediante una sustitución de una única alanina en la posición 1, 4, 5, 7 u 8, un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, y un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7, y tiene una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una modificación de SEQ ID NO: 4 mediante una sustitución de una única alanina en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 u 11, un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 y un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
- 40 **[0039]** En ciertos casos, el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, tiene una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 y una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 45 **[0040]** En un caso, el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, comprende las CDRs correspondientes a adalimumab.
- 50 **[0041]** En un caso, el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, es adalimumab o golimumab, o un biosimilar de los mismos.
- 55 **[0042]** En ciertos casos, la concentración del anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al

- antígeno del mismo, en la formulación es al menos aproximadamente 50 mg/ml, aproximadamente 75 mg/ml, aproximadamente 100 mg/ml, o mayor de 100 mg/ml. En un caso, la concentración del anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, en la formulación de la divulgación es 90-110 mg/ml. En un caso, la concentración del anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, en la formulación de la divulgación es 95-105 mg/ml. En un caso, la formulación comprende más de 75 mg/ml del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo. En un caso, la divulgación proporciona una formulación acuosa líquida estable que comprende una alta concentración, por ejemplo 75-125 mg/ml, de un anticuerpo anti-hTNF- $\alpha$ .
- 10 **[0043]** En ciertos casos, el tensioactivo utilizado en la formulación de la divulgación es un polisorbato. En un caso, la concentración del polisorbato es aproximadamente 0,1-1,5 mg/ml, de aproximadamente 0,2-1,4 mg/ml, aproximadamente 0,3-1,3 mg/ml, aproximadamente 0,4-1,2 mg/ml, aproximadamente 0,5-1,1 mg/ml, aproximadamente 0,6-1,0 mg/ml, aproximadamente 0,6-1,1 mg/ml, aproximadamente 0,7-1,1 mg/ml, aproximadamente 0,8-1,1 mg/ml, o aproximadamente 0,9-1,1 mg/ml. En ciertos casos, el polisorbato está a una concentración de aproximadamente 0,1-10 mg/ml, aproximadamente 0,5-5 mg/ml, aproximadamente 0,1-2 mg/ml, o aproximadamente 1 mg/ml. En un caso, el tensioactivo es polisorbato 80.
- 15 **[0044]** En ciertos casos, el paciente es un ser humano o un mamífero no humano.
- 20 **[0045]** En ciertos casos, la formulación es la Formulación 3 o la Formulación 4 descritas en los Ejemplos.
- [0046]** En ciertos casos, la formulación por lo demás idéntica es la formulación de adalimumab disponible en el comercio, que contiene adalimumab, cloruro sódico, fosfato sódico monobásico dihidratado, fosfato sódico dibásico dihidratado, citrato de sodio, ácido cítrico monohidratado, manitol, polisorbato 80 y agua para inyección.
- 25 **[0047]** En un caso, la formulación por lo demás idéntica contiene un tampón y una sal. En ciertos casos, la sal es una sal neutra o una sal de una base (por ejemplo, NaOH) usada para ajustar el pH. En ciertos casos, el tampón comprende un tampón fosfato y/o un tampón citrato. Por ejemplo, el tampón fosfato puede contener aproximadamente 1,35-1,75 mg/ml o aproximadamente 1,50-1,56 mg/ml de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, y aproximadamente 0,75-0,95 mg/ml o aproximadamente 0,83-0,89 mg/ml de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O. El tampón citrato puede contener aproximadamente 1,15-1,45 mg/ml o aproximadamente 1,30-1,31 mg/ml de ácido cítrico·H<sub>2</sub>O y aproximadamente 0,2-0,4 mg/ml, o aproximadamente 0,30-0,31 mg/ml, de citrato de sodio deshidratado. La al menos una sal puede ser una sal neutra, tal como una sal sódica neutra (por ejemplo, NaCl).
- 30 **[0048]** En una realización, la formulación de la invención es una formulación farmacéutica.
- [0049]** En ciertas realizaciones, la formulación de la invención es adecuada para inyección subcutánea. En una realización, la formulación de la invención es adecuada para la autoadministración subcutánea por un sujeto.
- 40 **[0050]** En ciertas realizaciones, el volumen de la formulación acuosa es no superior a 1,5 ml, 1,0 ml, 0,8 ml, 0,5 ml, o 0,4 ml.
- [0051]** En ciertos casos, la formulación comprende una dosis de aproximadamente 30-90 mg del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo. En un caso, la formulación comprende aproximadamente 40 mg de del anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , o porción de unión al antígeno del mismo. En un caso, la formulación comprende aproximadamente 50 mg de del anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , o porción de unión al antígeno del mismo. En un caso, la formulación comprende aproximadamente 60 mg de del anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , o porción de unión al antígeno del mismo. En un caso, la formulación comprende aproximadamente 70 mg de del anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , o porción de unión al antígeno del mismo. En un caso, la formulación comprende aproximadamente 80 mg de del anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , o porción de unión al antígeno del mismo. En un caso, la formulación comprende aproximadamente 90 mg de del anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , o porción de unión al antígeno del mismo. En un caso, la formulación comprende 60-85 mg. En otro caso, la formulación comprende 70-90 mg. En todavía otro caso, la formulación contiene 30-110 mg. En un caso, la formulación contiene 70-110 mg.
- 55 **[0052]** Otro caso de la divulgación proporciona una jeringa precargada o un dispositivo autoinyector, que comprende cualquiera de las formulaciones objeto descritas en el presente documento. En ciertos casos, la formulación acuosa almacenada en la jeringa precargada o dispositivo autoinyector contiene aproximadamente 40 mg de adalimumab o un biosimilar del mismo. En ciertos casos, la formulación acuosa almacenada en la jeringa

precargada o dispositivo autoinyector contiene aproximadamente 80 mg de adalimumab o un biosimilar del mismo.

**[0053]** Otro caso de la divulgación proporciona un método de tratamiento de un trastorno asociado a la actividad perjudicial de TNF- $\alpha$  en un paciente, que comprende administrar al paciente una cualquiera de las 5 formulaciones descritas en el presente documento.

**[0054]** En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un sujeto que tiene artritis reumatoide. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un sujeto que tiene enfermedad de Crohn. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un sujeto que tiene artritis psoriásica. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un sujeto que tiene psoriasis. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un sujeto que tiene artritis idiopática juvenil (JIA). En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un sujeto que tiene espondilitis anquilosante. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un sujeto que tiene colitis ulcerosa. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un sujeto que tiene hidradenitis supurativa. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un sujeto que tiene retinopatía diabética. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un sujeto que tiene arteritis de células gigantes. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un sujeto que tiene enfermedad de Behcet. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un sujeto que tiene sarcoidosis, por ejemplo, sarcoidosis cutánea. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un sujeto que tiene espondiloartropatía axial. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar un sujeto que tiene uveítis.

**[0055]** En una realización, la formulación se administra al sujeto según una periodicidad seleccionada del grupo que consiste en semanal, cada dos semanas, cada tres semanas y mensual. En un caso, la formulación de la divulgación contiene 30-90 mg de un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, y se administra en un régimen de dosificación cada dos semanas. En otro caso, la formulación de la divulgación contiene 30-90 mg de un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, y se administra según un régimen de dosificación mensual. En un caso, la formulación de la divulgación contiene 60-85 mg de un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, y se administra en un régimen de dosificación cada dos semanas. En otro caso, la formulación de la divulgación contiene 60-85 mg de un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, y se administra según un régimen de dosificación mensual.

**[0056]** En ciertas realizaciones, la administración de la formulación de la invención a un sujeto es por autoadministración.

**[0057]** Basándose en la divulgación que está contenida en el presente documento, la presente invención proporciona una formulación acuosa líquida que consiste esencialmente en 100 mg/ml de adalimumab, 1 mg/ml de polisorbato-80, 42 mg/ml de manitol, y agua, en la que la formulación no contiene un tampón.

**[0058]** En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona una jeringa precargada o dispositivo autoinyector que comprende la formulación de la presente invención.

**[0059]** En un aspecto relacionado, la presente invención proporciona una formulación para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica, psoriasis, artritis idiopática juvenil, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa o hidradenitis supurativa.

**[0060]** La presente invención y realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

**[0061]** Se contempla que cualquier realización descrita en la presente puede combinarse con una o más de otras realizaciones de la invención, incluyendo realizaciones descritas solo bajo un aspecto de la invención.

## BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

**[0062]**

La Figura 1 es un panel de gráficas que muestran la administración de formulaciones de alta concentración 1 (F1) y 2 (F2) que produjeron una disminución significativa en la evaluación del dolor en todos los momentos de tiempo después de la inyección (inmediatamente después, 15 minutos y 30 minutos), en comparación con los otros grupos de tratamientos (F4 y la formulación comercial actual).

La Figura 2 muestra, en una escala lineal, las medias y las desviaciones estándar de las concentraciones en suero de adalimumab durante un periodo de tiempo de 56 días, después de una única dosis SC de 40 mg de adalimumab.

- 5 Las Figuras 3A y 3B son gráficas que muestran la estabilidad de las diversas formulaciones de adalimumab evaluadas por el número de suma de agregados en las formulaciones (3A) o la suma de agregados (3B) durante un intervalo de polisorbato o un intervalo de poliol.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

10

### *I. Definiciones*

15 **[0063]** Con el fin de que la presente invención pueda ser entendida con más facilidad, primero se definen ciertos términos. Además, debe tener en cuenta que siempre que se mencione un valor o un intervalo de valores de un parámetro, se pretende que los valores y los intervalos intermedios a los valores mencionados también sean parte de la presente invención.

20 **[0064]** El término “dolor asociado a la inyección (en un paciente)”, como se usa en el presente documento, se refiere al dolor asociado a la inyección del fármaco en el tejido del paciente o sujeto. En una realización, el dolor está separado del dolor causado por el dispositivo de inyección (si es que lo causa), tal como el pinchazo de la aguja para la inyección. En una realización, el dolor asociado a la inyección puede originarse de la formulación del fármaco que está siendo inyectado en el tejido de un paciente.

25 **[0065]** El dolor asociado a la inyección puede evaluarse usando varios medios reconocidos en la técnica, tales como la Escala visual analógica (VAS) del dolor. La medición del dolor, en una realización, es cuantificable, tal que una reducción/aumento de la escala de porcentaje del dolor pueda compararse directamente usando métodos estadísticos. Por ejemplo, cuando se emplea la Escala visual analógica del dolor, un valor numérico de dolor (por ejemplo, promedio  $\pm$  DE) puede asignarse a cada grupo de tratamiento, tal que se pueda calcularse un porcentaje de aumento o reducción.

30

**[0066]** En general, una Escala visual analógica (VAS) es un instrumento de medición que mide una característica o atributo que se piensa que varía dentro de un intervalo de valores continuos (véase por ejemplo, Singer y Thods (1998) *Academic Emergency Medicine* 5:1007). Por ejemplo, la cantidad de dolor que siente un paciente varía a lo largo de una escala continua de ninguno (una puntuación de, por ejemplo, 0) a una cantidad extrema de dolor (una puntuación de, por ejemplo, 10). Desde la perspectiva del paciente, este espectro parece continuo - su dolor no da saltos discretos, como lo sugeriría una clasificación de ninguno, leve, moderado e intenso. Operacionalmente, una VAS es normalmente una línea horizontal, de 100 mm de longitud, anclada por palabras descriptivas en cada extremo, tales como “sin dolor” en un extremo y “dolor extremo” (o alguna variación de esto) en el otro extremo. El paciente marca en la línea en un punto (por ejemplo, una puntuación de 0-10) lo que él siente que representa su percepción de su estado actual. La escala VAS puede determinarse midiendo en milímetros, desde el extremo izquierdo de la línea hasta el punto en que el paciente marca.

35 **[0067]** Existen varias maneras en las cuales se ha presentado la VAS, incluyendo líneas verticales y líneas con descriptores adicionales. Véase Wewers & Lowe (“A critical review of visual analogue scales in the measurement of clinical phenomena”. *Research in Nursing and Health* 13:227-236, 1990), que proporcionan una discusión informativa de los beneficios e inconvenientes de los diferentes estilos de VAS.

40 **[0068]** El término “formulación líquida” se refiere a una formulación en estado líquido y no pretende referirse a formulaciones liofilizadas resuspendidas. Una formulación líquida de la invención es estable al almacenamiento y no depende de la liofilización (ni de otros métodos de cambio de estado, por ejemplo, secado por pulverización) para la estabilidad.

45 **[0069]** El término “formulación acuosa líquida” se refiere a una formulación líquida que usa agua como disolvente. En una realización, una formulación acuosa líquida es una formulación que mantiene la estabilidad (por ejemplo, estabilidad química y/o física y/o actividad biológica) sin la necesidad de liofilización, secado por pulverización y/o congelación.

50 **[0070]** El término “farmacéutico”, como se usa en el presente documento, se refiere a una composición, por ejemplo una formulación acuosa, que es útil para el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

**[0071]** El término “sujeto” o “paciente” pretende incluir organismos mamíferos. Ejemplos de sujetos/pacientes incluyen seres humanos y mamíferos no humanos, por ejemplo, primates no humanos, perros, vacas, caballos, cerdos, ovejas, cabras, gatos, ratones, conejos, ratas y animales no humanos transgénicos. En realizaciones específicas de la invención, el sujeto es un ser humano.

5

**[0072]** El término “excipiente” se refiere a un agente que puede añadirse a una formulación para proporcionar una característica deseada, por ejemplo, consistencia, mejorar la estabilidad y/o para ajustar la osmolalidad. Ejemplos de excipientes comúnmente usados incluyen, pero no se limitan a, azúcares, polioles, aminoácidos, tensioactivos y polímeros.

10

**[0073]** Un excipiente comúnmente usado es un poliol. Como se usa en el presente documento, un “poliol” es una sustancia con múltiples grupos hidroxilo, e incluye azúcares (azúcares reductores y no reductores), alcoholes de azúcar y ácidos de azúcar. Ejemplos no limitantes de polioles son fructosa, manosa, maltosa, lactosa, arabinosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa, glucosa, sacarosa, trehalosa, sorbosa, melecitosa, rafinosa, manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol, glicerol, L-gluconato y sales metálicas de los mismos. En un caso, el poliol usado en la formulación o los métodos de la divulgación es manitol. En un caso, el poliol usado en la formulación o los métodos de la divulgación es sorbitol.

15

**[0074]** Un “anticuerpo terapéuticamente activo” o “anticuerpo terapéutico” se refiere a un anticuerpo que puede usarse para fines terapéuticos, es decir, para el tratamiento de un trastorno en un sujeto. Debe tenerse en cuenta que, mientras que pueden usarse proteínas terapéuticas para fines de tratamiento, la invención no está limitada a tal uso, ya que dichas proteínas también pueden usarse para estudios *in vitro*.

20

**[0075]** Como se usa en el presente documento, “tampón” es un agente(s) en una disolución, que permite que la disolución resista cambios en el pH por la acción de sus componentes conjugados ácido-base. Ejemplos de tampones incluyen acetato (por ejemplo, acetato de sodio), succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, histidina, metionina, citrato, fosfato, citrato/fosfato, imidazol, combinaciones de los mismos, y otros tampones de ácidos orgánicos. En una realización, un tampón no es una proteína. Un tampón puede proporcionar una disolución con un pH en el intervalo de aproximadamente 4 a aproximadamente 8; de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7; o de aproximadamente 5 a aproximadamente 6,5.

30

**[0076]** Aunque las formulaciones de la invención no contienen un tampón (tampones), pueden usarse formulaciones por lo demás idénticas que contienen uno o más tampones para fines de comparación del dolor o la biodisponibilidad. Ejemplos de tales tampones incluyen tampones fosfato, acetato (por ejemplo, acetato de sodio), succinato (tal como succinato de sodio), gluconato, glutamato, histidina, citrato y otros tampones de ácidos orgánicos. En una realización, un tampón representativo en la formulación por lo demás idéntica comprende un tampón citrato y/o un tampón fosfato.

35

**[0077]** Como se usa en el presente documento, el término “tensioactivo” generalmente incluye un agente que protege a la proteína, por ejemplo el anticuerpo, del estrés inducido por la interfase aire/disolución, estrés inducido por la disolución/superficie, para reducir la agregación del anticuerpo, o para minimizar la formación de partículas en la formulación. Tensioactivos a modo de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, tensioactivos no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20 y 80) o poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188). El término “tensioactivo” o “detergente” incluye tensioactivos no iónicos, tales como, pero no se limita a, polisorbatos. En una realización, un tensioactivo incluye poloxámeros, por ejemplo, poloxámero 188, poloxámero 407; polioxi-etilenaquiléteres, por ejemplo, Brij35®, Cremophor A25, Sympatens ALM/230; y polisorbatos/Tweens, por ejemplo, polisorbato 20 (Tween 20), polisorbato 80 (Tween 80), Mirj, y poloxámeros, por ejemplo, poloxámero 188.

45

**[0078]** Una formulación “estable” es aquella en la que el anticuerpo en ella conserva esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica durante el proceso de fabricación y/o con el almacenamiento. Están disponibles en la técnica varias técnicas analíticas para medir la estabilidad de las proteínas, y éstas son revisadas en Peptide and Protein Drug Delivery 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y., Pubs. (1991); y Jones, A. (1993) Adv. Drug Delivery Rev. 10:29-90. Por ejemplo, en una realización, la estabilidad de una proteína se determina según el porcentaje de proteína monomérica en disolución, con un bajo porcentaje de proteína degradada (por ejemplo, fragmentada) y/o agregada. En una realización, la formulación puede ser estable a temperatura ambiente, a aproximadamente 25-30 °C, o a 40 °C durante al menos 1 mes y/o estable a aproximadamente 2-8 °C durante al menos 1 mes, 1 año, o alternativamente, durante al menos 2 años. En otra realización, la formulación puede ser estable hasta aproximadamente 30 °C durante al menos aproximadamente 6 días, aproximadamente 10 días, o aproximadamente 14 días, o es estable a aproximadamente 28 °C durante

55

hasta aproximadamente 24 meses. En una realización, la formulación puede ser estable tras la congelación (por ejemplo, a -70 °C) y el descongelación de la formulación, denominado en lo sucesivo “ciclo de congelación/descongelación”.

5 **[0079]** Un anticuerpo “retiene su estabilidad física” en una formulación farmacéutica si sustancialmente no muestra signos de, por ejemplo, agregación, precipitación y/o desnaturalización después de un examen visual de color y/o transparencia, o como se mide por dispersión de luz UV o por cromatografía de exclusión de tamaño. La agregación es un proceso por el cual moléculas individuales o complejos se asocian de manera covalente o no covalente para formar agregados. La agregación puede proceder hasta un grado en que se forme un precipitado  
10 visible.

**[0080]** La estabilidad, tal como la estabilidad física de una formulación, puede evaluarse por métodos bien conocidos en la técnica, incluyendo la medición de la atenuación aparente de una muestra de la luz (absorbancia o densidad óptica). Tal medición de la atenuación de la luz se refiere a la turbidez de una formulación. La turbidez de  
15 una formulación es particularmente una propiedad intrínseca de la proteína disuelta en la disolución y comúnmente se determina por nefelometría, y se mide en unidades nefelométricas de turbidez (UTN).

**[0081]** El grado de turbidez, por ejemplo como función de la concentración de uno o más de los componentes en la disolución, por ejemplo la concentración de proteínas y/o de sal, también denominada en lo sucesivo la  
20 “opalescencia” o “apariencia opalescente” de una formulación. El grado de turbidez puede calcularse por referencia a una curva patrón generada usando suspensiones de turbidez conocida. Los patrones de referencia para determinar el grado de turbidez para composiciones farmacéuticas pueden basarse en los criterios de la Farmacopea Europea (European Pharmacopoeia, Fourth Ed., Directorate for the Quality of Medicine of the Council of Europe (EDQM), Estrasburgo, Francia). Según los criterios de la Farmacopea Europea, una disolución transparente  
25 se define como aquella con una turbidez menor o igual que una suspensión de referencia que tiene una turbidez de aproximadamente 3 según los patrones de la Farmacopea Europea. Las mediciones de la turbidez nefelométrica pueden detectar la dispersión de Rayleigh, que normalmente cambia linealmente con la concentración, en ausencia de efectos de asociación o de no idealidad. Otros métodos para evaluar la estabilidad física son bien conocidos en la técnica.

30 **[0082]** Un anticuerpo “retiene su estabilidad química” en una formulación farmacéutica si la estabilidad química en un momento dado es tal que se considera que el anticuerpo todavía conserva su actividad biológica, como se define a continuación. La estabilidad química puede evaluarse, por ejemplo, detectando y cuantificando las formas químicamente alteradas del anticuerpo. La alteración química puede involucrar la modificación del tamaño  
35 (por ejemplo, formación de agregados), que puede evaluarse por cromatografía de exclusión de tamaño, SDS-PAGE y/o ionización/desorción láser asistida por matriz/espectrometría de masas por tiempo de vuelo (MALDI/TOF EM), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen alteración de la carga (por ejemplo, que se produce como resultado de una desamidación u oxidación), que puede evaluarse por cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo.

40 **[0083]** Un anticuerpo “retiene su actividad biológica” en una formulación farmacéutica si el anticuerpo en una formulación farmacéutica es biológicamente activo para su fin previsto. Por ejemplo, la actividad biológica se conserva si la actividad biológica del anticuerpo en la formulación farmacéutica está dentro de aproximadamente el 30 %, aproximadamente el 20 %, o aproximadamente el 10 % (dentro de los errores del ensayo) de la actividad  
45 biológica presentada en el momento en que fue preparada la formulación farmacéutica (por ejemplo, como se determina en un ensayo de unión al antígeno).

**[0084]** En un sentido farmacológico, en el contexto de la presente invención, una “cantidad terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” de un anticuerpo se refiere a una cantidad eficaz en la prevención o tratamiento o alivio de  
50 un síntoma de un trastorno para el tratamiento del cual el anticuerpo es eficaz.

**[0085]** El término “TNF-alfa humano” (abreviado en el presente documento como hTNF-alfa, TNF- $\alpha$  o simplemente hTNF), como se usa en el presente documento, pretende referirse a una citosina humana que existe como una forma secretada de 17 kDa y una forma asociada a la membrana de 26 kDa, cuya forma biológicamente  
55 activa está compuesta por un trímero de moléculas de 17 kDa unidas de manera no covalente. La estructura de hTNF-alfa se describe adicionalmente, por ejemplo, en Pennica, D., et al. (1984) Nature 312:724-729; Davis, J.M., et al. (1987) Biochem 26:1322-1326; y Jones, E.Y., et al. (1989) Nature 338:225-228. El término TNF-alfa humano pretende incluir TNF-alfa humano recombinante (rhTNF-alfa), que puede prepararse por métodos de expresión recombinante estándar, o comprarse en el comercio (R&D Systems, Catálogo No. 210-TA, Mineápolis, Minn.).

**[0086]** El término "anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Otros anticuerpos que existen de forma natural de estructura alterada tales como, por ejemplo, anticuerpos de camélido, también están incluidos en esta definición. Cada cadena pesada  
 5 comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en el presente documento como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios: CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en el presente documento como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad,  
 10 denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones estructurales (FR). Cada VH y VL está compuesta de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino hacia el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. En un caso de la divulgación, la formulación contiene un anticuerpo con secuencias CDR1, CDR2 y CDR3 como aquellas descritas en las patentes de EE.UU. N.º 6.090.382 y 6.258.562. En ciertos casos, la  
 15 formulación contiene un anticuerpo como se reivindica en las patentes de EE.UU. N.º 6.090.382 y 6.258.562.

**[0087]** Como se usa en el presente documento, el término "CDR" se refiere a la región determinante de la complementariedad dentro de la secuencia variable del anticuerpo. Existen tres CDRs en cada una de las regiones variables de la cadena pesada y la cadena ligera, que se designan CDR1, CDR2 y CDR3, para cada una de las  
 20 regiones variables de cadena pesada y ligera. Los límites exactos de estas CDRs han sido definidos de diversas maneras según diferentes sistemas. El sistema descrito por Kabat (Id.) no solo proporciona un sistema de numeración de restos que no es ambiguo, aplicable a cualquier región variable de un anticuerpo, sino que también proporciona límites de restos precisos que definen las tres CDRs. Éstas pueden denominarse en lo sucesivo las CDRs de Kabat. Chothia et al. encontraron que ciertas sub-  
 25 porciones dentro de las CDRs de Kabat adoptan conformaciones de estructura peptídica casi idénticas, a pesar de tener una gran diversidad al nivel de la secuencia de aminoácidos (Chothia et al. (1987) Mol. Biol. 196:901-917; Chothia et al. (1989) Nature 342:877-883). Estas sub-  
 30 porciones se designaron L1, L2 y L3; o H1, H2 y H3, donde "L" y "H" designan las regiones de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente. Estas regiones pueden denominarse en lo sucesivo CDRs de Chothia, que tienen límites que se solapan con las CDRs de Kabat. Otros límites que definen CDRs que se solapan con las CDRs de Kabat se han descrito por Padlan (1995) FASEB J. 9:133-139 y MacCallum (1996) J. Mol. Biol. 262(5):732-45. Todavía otras definiciones de límites de CDRs pueden no seguir estrictamente a uno de los sistemas aquí descritos, pero no obstante se solaparán con las CDRs de Kabat, aunque pueden estar acortadas o extendidas, a la luz de la predicción o de resultados experimentales de que restos particulares o grupos de restos, o incluso CDRs enteras, no tienen un impacto significativo sobre la unión al antígeno. Los métodos usados en el presente documento pueden  
 35 utilizar las CDRs definidas según cualquiera de estos sistemas, aunque ciertas realizaciones usan las CDRs definidas por Kabat o por Chothia. En un caso, el anticuerpo usado en los métodos y composiciones de la divulgación incluye las seis CDRs del anticuerpo adalimumab.

**[0088]** El término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo"),  
 40 como se usa en el presente documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (por ejemplo, hTNF-alfa). Se ha mostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión englobados dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un  
 45 fragmento F(ab')<sub>2</sub>, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab enlazados por un puente de disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd, que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv, que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo; (v) un fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), que consiste de un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes por separado, pueden juntarse usando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que haga posible que formen una sola cadena proteica en la que las regiones VL y VH se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de una sola cadena (scFv); véase por ejemplo Bird et al. (1988) Science 242:423-426; y Houston et al., (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). También se pretende que tales anticuerpos de una sola cadena estén englobados dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. También están  
 50 englobadas otras formas de anticuerpos de una sola cadena, tales como los diacuerpos. Los diacuerpos son anticuerpos bivalentes y biespecíficos en los que los dominios VH y VL se expresan en una sola cadena polipeptídica, pero usando un conector que es demasiado corto como para permitir el apareamiento entre los dos dominios en la misma cadena, forzando de esta manera a los dominios a aparearse con dominios complementarios de otra cadena, y a crear dos sitios de unión al antígeno (véase por ejemplo, Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl.  
 55

Acad. Sci. USA 90:6444-6448; Poljak, R.J., et al. (1994) Structure 2:1121-1123). En un caso de la divulgación, la formulación contiene una de las porciones de unión al antígeno descritas en las patentes de EE.UU. N.º 6.090.382 y 6.258.562.

5 **[0089]** La expresión “anticuerpo recombinante” se refiere a anticuerpos que son preparados, expresados, creados o aislados por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados usando un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca recombinante de anticuerpos combinatorios, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para genes de inmunoglobulina humana (véase por ejemplo, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos  
10 preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el corte y empalme de secuencias de genes de inmunoglobulina particulares (tales como las secuencias de genes de inmunoglobulina humana) con otras secuencias de ADN. Ejemplos de anticuerpos recombinantes incluyen anticuerpos recombinantes humanos, quiméricos, con injertos de CDR y humanizados.

15 **[0090]** El término “anticuerpo humano”, como se usa en el presente documento, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina de línea germinal humana. Los anticuerpos humanos usados en la invención pueden incluir restos de aminoácidos no codificados por las secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro*, o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo, en las CDRs y en particular  
20 CDR3. Sin embargo, el término “anticuerpo humano”, como se usa en el presente documento, no pretende incluir anticuerpos en los que las secuencias CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, han sido injertadas en secuencias estructurales humanas.

**[0091]** El término “anticuerpo quimérico” se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de región variable de cadena pesada y ligera de una especie, y secuencias de regiones constantes de otra especie, tal como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas enlazadas a regiones constantes humanas.

**[0092]** El término “anticuerpo con injertos CDR” se refiere a anticuerpos que comprenden secuencias de regiones variables de cadena pesada y ligera de una especie, pero en las que las secuencias de una o más regiones CDR de VH y/o VL son sustituidas con secuencias de CDR de otra especie, tales como anticuerpos que tienen regiones variables de cadena pesada y ligera murinas en las que una o más de las CDRs murinas (por ejemplo, la CDR3) ha sido sustituida con secuencias de CDR humanas.

35 **[0093]** Un “anticuerpo aislado”, como se usa en el presente documento, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a hTNF-alfa está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de hTNF-alfa). Un anticuerpo aislado que se une específicamente a hTNF-alfa, sin embargo, puede tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de TNF-alfa de  
40 otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular y/o sustancias químicas.

**[0094]** Un “anticuerpo neutralizante”, como se usa en el presente documento (o un “anticuerpo que neutraliza la actividad de hTNF-alfa”), pretende referirse a un anticuerpo cuya unión a hTNF-alfa produce la inhibición de la actividad biológica de hTNF-alfa. Esta inhibición de la actividad biológica de hTNF-alfa puede evaluarse midiendo uno o más indicadores de la actividad biológica de hTNF-alfa, tal como la citotoxicidad inducida por hTNF-alfa (tanto *in vitro* como *in vivo*), la activación celular inducida por hTNF-alfa y la unión de hTNF-alfa a receptores de hTNF-alfa. Estos indicadores de la actividad biológica de hTNF-alfa pueden evaluarse mediante uno o más de los diversos ensayos estándar *in vitro* o *in vivo* conocidos en la técnica, y descritos en las patentes de EE.UU. N.º 6.090.382 y  
50 6.258.562.

**[0095]** En una realización, la capacidad de un anticuerpo para neutralizar la actividad del hTNF-alfa se evalúa mediante la inhibición de la citotoxicidad inducida por hTNF-alfa de células L929. Como parámetro adicional o alternativo de la actividad de hTNF-alfa, puede evaluarse la capacidad de un anticuerpo para inhibir la expresión  
55 inducida por hTNF-alfa de ELAM-1 en HUVEC, como una medición de la activación celular inducida por hTNF-alfa.

**[0096]** El término “resonancia de plasmones superficiales”, como se usa en el presente documento, se refiere a un fenómeno óptico que permite el análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real mediante la detección de alteraciones en las concentraciones de proteínas dentro de una matriz biosensora, por ejemplo, usando el

sistema BIAcore (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Suecia y Piscataway, N.J.). Para descripciones adicionales, véase Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; y Johnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277.

5 **[0097]** El término " $k_{as}$ ", como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de asociación de una proteína de unión (por ejemplo un anticuerpo) al antígeno para formar, por ejemplo, el complejo anticuerpo/antígeno como es conocido en la técnica.

10 **[0098]** El término " $k_{dis}$ ", como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación de un anticuerpo del complejo anticuerpo/antígeno.

15 **[0099]** El término " $k_d$ ", como se usa en el presente documento, se refiere a la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno particular y se refiere al valor obtenido en una medición de titulación en equilibrio, o dividiendo la constante de disociación ( $k_{dis}$ ) entre la constante de asociación ( $k_{as}$ ).

20 **[0100]** Como se usa en el presente documento, "biosimilar" (de un producto de referencia autorizado/fármaco biológico, tal como una proteína terapéutica, anticuerpo, etc.), se refiere a un producto biológico que es similar al producto de referencia basándose en datos derivados de: (a) estudios analíticos que demuestran que el producto biológico es altamente similar al producto de referencia, independientemente de diferencias menores en los componentes clínicamente inactivos; (b) estudios en animales (incluyendo la evaluación de la toxicidad); y/o (c) un estudio o estudios clínicos (incluyendo la evaluación de la inmunogenicidad y la farmacocinética o farmacodinámica) que son suficientes para demostrar la seguridad, pureza y potencia en una o más condiciones de uso apropiadas para las que el producto de referencia está autorizado y previsto para ser usado y para las que se busca licencia para el producto biológico. En una realización, el producto biológico biosimilar y el producto de referencia utilizan el mismo mecanismo o mecanismos de acción para la condición o condiciones de uso prescritas, recomendadas o sugeridas en el etiquetado propuesto, pero solo hasta el grado en el que el mecanismo o mecanismos de acción sean conocidos por el producto de referencia. En una realización, la condición o condiciones de uso prescritas, recomendadas o sugeridas en el etiquetado propuesto para el producto biológico fueron previamente autorizadas para el producto de referencia. En una realización, la vía de administración, la forma de dosificación y/o la concentración del producto biológico son iguales que aquellas del producto de referencia. En una realización, la instalación en la que el producto biológico se fabrica, procesa, acondiciona o almacena cumple normas diseñadas para asegurar que el producto biológico continúe siendo seguro, puro y potente. El producto de referencia puede ser autorizado en al menos uno de los EE.UU., Europa o Japón.

35 **[0101]** El término "dosificación", como se usa en el presente documento, se refiere a la administración de una sustancia (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNF $\alpha$ ), para lograr un objetivo terapéutico (por ejemplo, el tratamiento de un trastorno asociado a TNF $\alpha$ ).

40 **[0102]** Los términos "régimen de dosificación semanal", "dosificación semanal" y "administración semanal", como se usan en el presente documento, se refieren a cierto periodo de tiempo (o periodicidad) de la administración de una sustancia (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ ) a un sujeto para lograr un objetivo terapéutico (por ejemplo, el tratamiento de un trastorno asociado a TNF- $\alpha$ ). En un caso, el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, se administra cada 6-8 días, o alternativamente cada 7 días.

45 **[0103]** Los términos "régimen de dosificación cada dos semanas", "dosificación cada dos semanas" y "administración cada dos semanas", como se usan en el presente documento, se refieren a cierto periodo de tiempo (o periodicidad) de la administración de una sustancia (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ ) a un sujeto para lograr un objetivo terapéutico (por ejemplo, el tratamiento de un trastorno asociado a TNF- $\alpha$ ). El régimen de dosificación cada dos semanas no pretende incluir un régimen de dosificación semanal. En un caso, el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, se administra cada 9-19 días, más preferentemente cada 11-17 días, incluso más preferentemente cada 13-15 días y lo más preferible cada 14 días.

55 **[0104]** Los términos "régimen de dosificación mensual", "dosificación mensual" y "administración mensual", como se usan en el presente documento, se refieren a cierto periodo de tiempo (o periodicidad) de la administración de una sustancia (por ejemplo, un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ ) a un sujeto para lograr un objetivo terapéutico (por ejemplo, el tratamiento de un trastorno asociado a TNF- $\alpha$ ). En un caso, un régimen de dosificación mensual significa que el anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, se administra cada 28-31 días. En otro caso, un régimen de dosificación mensual significa que el anticuerpo, o unión al antígeno porción del mismo, se administra una vez al mes, por ejemplo en el mismo día cada mes, tal como, por ejemplo, el primer día de cada mes.

**[0105]** La ABC,  $C_{m\acute{a}x}$  y  $T_{m\acute{a}x}$  son parámetros farmacocinéticos que pueden usarse para caracterizar las respuestas farmacocinéticas de un producto farmacéutico particular en un animal o sujeto humano. El término "ABC" se refiere al "área bajo la curva" que representa cambios en las concentraciones en sangre, suero o plasma de una sustancia, por ejemplo, un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, con el tiempo. Como se usa en el presente documento, el término " $C_{m\acute{a}x}$ " se refiere a la concentración máxima o pico en sangre, suero o plasma de una sustancia observada en un sujeto después de su administración. El término " $T_{m\acute{a}x}$ " se refiere al momento en el que se produjo  $C_{m\acute{a}x}$ , como se mide desde el punto de tiempo de la administración.

**[0106]** El término "diámetro hidrodinámico" o " $D_h$ " de una partícula se refiere al diámetro de una esfera que tiene la densidad del agua y la misma velocidad que la partícula. Así pues, el término "diámetro hidrodinámico de un anticuerpo", como se usa en el presente documento, se refiere a una determinación de tamaño para un anticuerpo, o una porción de unión al antígeno del mismo, por ejemplo, un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano, o fragmento de unión al antígeno del mismo, en disolución usando dispersión dinámica de luz (DDL). Un instrumento de medición de DDL mide la fluctuación dependiente del tiempo en la intensidad de luz dispersada del anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, en disolución a un ángulo de dispersión fijo. El  $D_h$  se determina a partir de la función de autocorrelación de intensidad de la fluctuación dependiente del tiempo en la intensidad. Los datos de intensidad de dispersión se procesan usando el software del instrumento de DDL para determinar el valor para el diámetro hidrodinámico y la distribución de tamaño de las moléculas de dispersión, por ejemplo, el anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, o fragmento de unión al antígeno del mismo, del espécimen.

**[0107]** El término "conductividad", como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de una disolución acuosa para conducir una corriente eléctrica entre dos electrodos. Generalmente, la conductividad eléctrica o la conductividad específica es una medición de la capacidad de un material para conducir una corriente eléctrica. En disolución, la corriente fluye por transporte iónico. Por lo tanto, con una cantidad creciente de iones presentes en la disolución acuosa, la disolución tendrá una mayor conductividad. La unidad de medición de la conductividad es mmhos (mS/cm) y puede medirse usando un conductímetro vendido por, por ejemplo, Orion Research, Inc. (Beverly, MA). La conductividad de una disolución puede alterarse cambiando la concentración de iones en ella. Por ejemplo, puede alterarse la concentración de tampón y/o sal en la disolución con el fin de lograr la conductividad deseada.

**[0108]** La conductividad de una disolución se mide según métodos conocidos en la técnica. Pueden usarse conductímetros y celdas para determinar la conductividad de la formulación acuosa, y deben calibrarse con una disolución patrón antes de su uso. Ejemplos de conductímetros disponibles en la técnica incluyen MYRON L Digital (Cole Parmer®), Conductometer (Metrohm AG) y los analizadores de conductividad integrados de serie 3105/3115 (Kemotron).

**[0109]** Las mediciones de la conductividad pueden realizarse con cualquier conductímetro disponible en el comercio adecuado para el análisis de la conductividad en disoluciones de proteína, por ejemplo, el conductímetro Modelo SevenMulti, con capacidad de expansión para un intervalo de pH amplio (Mettler Toledo, Schwerzenbach, Suiza). El instrumento es operado según las instrucciones del fabricante (por ejemplo, si el sensor de conductividad se cambia en el instrumento de Mettler Toledo debe realizarse una calibración otra vez, ya que cada sensor tiene una constante de celda diferente; refiérase a las Instrucciones de operación del conductímetro Modelo SevenMulti). Si se siguen las instrucciones, pueden realizarse mediciones de conductividad sumergiendo directamente la sonda de medición en la disolución de muestra.

**[0110]** Varios aspectos de la invención se describen en más detalle en las siguientes subsecciones.

## **II. Formulaciones y métodos de la divulgación**

**[0111]** La presente invención presenta formulaciones farmacéuticas acuosas líquidas estables que comprenden un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$ , o una porción de unión al antígeno del mismo, que tienen propiedades en mejorada comparación con formulaciones reconocidas en la técnica. Aunque se conocen formulaciones de alta concentración que contienen anticuerpos anti-TNF- $\alpha$  humanos en la técnica (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. US20060153846 y US20100278822), la presente divulgación proporciona formulaciones de alta concentración que tienen características inesperadas, es decir, significativamente menos dolor o biodisponibilidad elevada. Las formulaciones de la divulgación se basan, al menos en parte, en la combinación de solo uno o dos excipientes, es decir, un tensioactivo y un poliol, o alternativamente, un tensioactivo solo. A pesar de tener pocos excipientes, las formulaciones de la divulgación contienen una alta concentración de un anticuerpo, por ejemplo, 90-110 mg/ml, y son estables.

**[0112]** Como se describe en los ejemplos de trabajo más adelante, se demostró que una formulación que contiene una concentración de anticuerpo de más de 50 mg/ml de un anticuerpo anti-TNF- $\alpha$  humano, menos de 50 mg/ml de un poliol (tal como manitol) y un tensioactivo (tal como polisorbato) tenía una drástica reducción del dolor tras la inyección con respecto a otras formulaciones de alta concentración, incluyendo la formulación comercial de adalimumab descrita en el documento US20060153846, y la formulación descrita en el documento US20100278822. Así pues, en una realización, las formulaciones de la invención están asociadas a una reducción del dolor, a pesar de tener una alta concentración de anticuerpos (por ejemplo, 100 mg/ml) y de no tener tampón o sal. Las formulaciones que causan poco dolor descritas en el presente documento se basan, al menos en parte, en el sorprendente hallazgo de que quitando o excluyendo la sal (por ejemplo, NaCl) y/o un tampón (por ejemplo, un tampón fosfato/citrato), la concentración de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano en una formulación puede aumentarse, por ejemplo, a aproximadamente 100 mg/ml, mientras que se disminuye el dolor tras la administración a un paciente.

**[0113]** En una realización, la formulación de la invención es sorprendente porque la formulación no contiene un tampón o una sal, y reduce el dolor asociado a la inyección en un paciente al menos aproximadamente el 50 % cuando se compara con inyectar una formulación por lo demás idéntica que comprende al menos una sal y/o al menos un tampón. En una realización, la formulación reduce el dolor asociado a la inyección en un sujeto humano al menos aproximadamente el 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, o 80 % (por ejemplo, aproximadamente el 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 50, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79 o el 80 %) cuando se compara con la inyección de una formulación por lo demás idéntica que además comprende una sal y/o un tampón.

**[0114]** En una realización, la formulación por lo demás idéntica usada para el ensayo de comparación del dolor comprende al menos un tampón, tal como un tampón citrato y un tampón fosfato, y/o una sal, por ejemplo, NaCl. Por ejemplo, el tampón (excluido de la formulación de la invención y presente en la formulación de referencia para comparaciones del dolor) puede incluir ácido cítrico monohidratado, citrato de sodio, fosfato disódico dihidratado y/o dihidrogenofosfato de sodio dihidratado. El tampón puede incluir aproximadamente 1,15-1,45 mg/ml de ácido cítrico (por ejemplo, aproximadamente 1,15, 1,20, 1,25, 1,30, 1,35, 1,40 o 1,45), aproximadamente 0,2-0,4 mg/ml de citrato de sodio deshidratado (por ejemplo, aproximadamente 0,2, 0,25, 0,3, 0,35 o 0,4), aproximadamente 1,35-1,75 mg/ml de fosfato disódico deshidratado (por ejemplo, aproximadamente 1,35, 1,40, 1,45, 1,50, 1,55, 1,60, 1,65, 1,70 o 1,75), aproximadamente 0,75-0,95 mg/ml de dihidrogenofosfato de sodio deshidratado (por ejemplo, aproximadamente 0,75, 0,80, 0,85, 0,9 o 0,95). También está previsto que los valores e intervalos intermedios a las concentraciones anteriormente mencionadas sean parte de la presente invención. Además, está previsto que los intervalos de valores usando una combinación de cualquiera de los valores anteriormente citados como límites superiores y/o inferiores estén incluidos, por ejemplo, 0,1 a 0,5 mg/ml o 1,20-1,40 mg/ml. En una realización, el pH de la formulación se ajusta con hidróxido sódico.

**[0115]** En un caso, la formulación de la divulgación incluye altas concentraciones de anticuerpos anti-TNF $\alpha$  humanos, o porción de unión al antígeno de los mismos, por ejemplo, 90-110 mg/ml, un poliol a una concentración menor de 50 mg/ml y un tensioactivo, tal que la formulación sea adecuada para administración sin dolor significativo como se determina mediante una puntuación en una Escala visual analógica (VAS). En un caso, la formulación y los métodos de la divulgación incluyen altas concentraciones de anticuerpos anti-TNF $\alpha$ , o porciones de unión al antígeno de los mismos, y ningún tampón o sal, tal que sean adecuadas para administración, por ejemplo, administración subcutánea, sin causar dolor significativo como se determina mediante una puntuación en una Escala visual analógica (VAS). Por ejemplo, la formulación de la divulgación puede producir una puntuación VAS menor de 1 en una escala de 0 (sin dolor) a 10 (peor dolor imaginable) tras inyección subcutánea. Como se describe en el Ejemplo 1, una formulación que tiene 100 mg/ml de adalimumab, polisorbato 80 y manitol (menos de 50 mg/ml) produjo una puntuación VAS menor de 1, por ejemplo 0,56, mientras que otras formulaciones con alta concentración de anticuerpos produjeron puntuaciones VAS que oscilaron de 1,79 a 4,12.

**[0116]** En un caso, la divulgación proporciona una formulación acuosa líquida que comprende un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, un tensioactivo y menos de 50 mg/ml de un poliol, en la que la inyección subcutánea de la formulación produce una puntuación en una Escala visual analógica del dolor menor de 1,0 tras la inyección. En un caso, la formulación no contiene un tampón y una sal, y produce una reducción del dolor de al menos aproximadamente el 50 % tras la inyección subcutánea cuando se compara con una inyección de una formulación por lo demás idéntica que además comprende una sal y/o un tampón (tampones).

**[0117]** Así pues, en una realización de la invención, las formulaciones líquidas de la invención tienen propiedades de tolerabilidad ventajosas porque las formulaciones producen menos dolor con respecto a formulaciones que contienen un tampón y una sal. En ciertas realizaciones, la formulación reduce el dolor asociado a la inyección (o cualquier otra forma de administración) en un sujeto. En algunas realizaciones, el dolor asociado a la inyección se reduce al menos aproximadamente el 10 %, al menos aproximadamente el 15 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 25 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 35 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 45 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 55 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 65 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, o al menos aproximadamente el 95 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94 o el 95 %). En una realización, el dolor se reduce al menos aproximadamente el 50 %.

**[0118]** El dolor puede evaluarse usando cualquier tipo de evaluación del dolor conocida en la técnica, incluyendo, por ejemplo, escalas visuales analógicas, evaluaciones cualitativas del dolor, o evaluaciones del dolor con aguja. Por ejemplo, el dolor en el sitio de inyección percibido por el sujeto puede evaluarse usando la Escala visual analógica (VAS) del dolor. Una VAS es un instrumento de medición que mide el dolor a medida que oscila a lo largo de un intervalo continuo de valores, por ejemplo, de ninguno a una cantidad extrema de dolor. Operacionalmente, una VAS es una línea horizontal, aproximadamente 100 mm de longitud, anclada por descriptores numéricos y/o de palabras, por ejemplo, 0 o 10, o “ningún dolor” o “dolor insoportable”, opcionalmente con descriptores de palabras o numéricos adicionales entre los extremos, por ejemplo, leve, moderado e intenso; o 1 a 9 (véanse, por ejemplo, Lee JS, et al. (2000) Acad Emerg Med 7:550, o Singer and Thods (1998) Academic Emergency Medicine 5:1007). El dolor puede evaluarse en un solo momento o en varios momentos tras la administración de una formulación de la invención tal como, por ejemplo, inmediatamente después de la inyección, a aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 o 45 minutos después de la inyección.

**[0119]** En una cierta realización de la invención, la inyección de la formulación en un sujeto produce una puntuación en la Escala visual analógica del dolor menor de 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 o 5,0, en una escala de 0 (sin dolor) a 10 (dolor insoportable).

**[0120]** Otras herramientas para la evaluación del dolor son conocidas en la técnica, incluyendo, por ejemplo, la Escala de valoración numérica, la Escala de clasificación verbal y el Breve inventario del dolor. Tales herramientas también podrían usarse para evaluar el dolor según la invención.

**[0121]** Pueden usarse índices adicionales para irritación cutánea, incluyendo, por ejemplo, la escala de Draize (hemorragia, petequias, eritema, edema, prurito).

**[0122]** Las formulaciones de la divulgación que contienen un poliol contienen preferentemente menos de aproximadamente 50 mg del poliol. En un caso, las formulaciones contienen menos de aproximadamente 45 mg/ml del poliol. En otro caso, la formulación de la divulgación contiene aproximadamente 38-46 mg/ml de poliol (por ejemplo, manitol), por ejemplo, aproximadamente 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54 o 55 mg/ml del poliol. Además, se pretende que los intervalos de valores que usan una combinación de cualquiera de los valores anteriormente mencionados como límites superiores y/o inferiores estén incluidos, por ejemplo, 39-45 mg/ml, 40-44 mg/ml o 37-47 mg/ml. En un caso, las formulaciones de la divulgación contienen aproximadamente 12-72 mg/ml de poliol, por ejemplo, manitol. En un caso, polioles adecuados para uso en las formulaciones y métodos de la divulgación son manitol o sorbitol.

**[0123]** En un caso, la formulación de la divulgación contiene adalimumab (o un biosimilar del mismo), polisorbato 80, manitol y agua para inyección. En una realización, la formulación contiene 80 mg de adalimumab, agua para inyección, 42 mg/ml de manitol y 1 mg/ml de polisorbato 80. En una realización, la formulación puede contener 20-110 mg, alternativamente 20-90 mg de adalimumab o, alternativamente, 30-80 mg del anticuerpo. En una realización, la formulación contiene 30 mg, 31 mg, 32 mg, 33 mg, 34 mg, 35 mg, 36 mg, 37 mg, 38 mg, 39 mg, 40 mg, 41 mg, 42 mg, 43 mg, 44 mg, 45 mg, 46 mg, 47 mg, 48 mg, 49 mg, 50 mg, 51 mg, 52 mg, 53 mg, 54 mg, 55 mg, 56 mg, 57 mg, 58 mg, 59 mg, 60 mg, 61 mg, 62 mg, 63 mg, 64 mg, 65 mg, 66 mg, 67 mg, 68 mg, 69 mg, 70 mg, 71 mg, 72 mg, 73 mg, 74 mg, 75 mg, 76 mg, 77 mg, 78 mg, 79 mg, 80 mg, 81 mg, 82 mg, 83 mg, 84 mg, 85 mg, 86 mg, 87 mg, 88 mg, 89 mg, 90 mg, 91 mg, 92 mg, 93 mg, 94 mg, 95 mg, 96 mg, 97 mg, 98 mg, 99 mg, 100 mg, 101

mg, 102 mg, 103 mg, 104 mg, 105 mg, 106 mg, 107 mg, 108 mg, 109 mg o 110 mg del anticuerpo. Los intervalos que incluyen los números anteriormente mencionados también están incluidos en la invención, por ejemplo, 70-90 mg, 65-95 o 60-85 mg.

5 **[0124]** La presente invención también se basa, al menos en parte, en el sorprendente descubrimiento de que una formulación farmacéutica acuosa líquida que tiene una alta concentración de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano, o porción de unión al antígeno del mismo, y un tensioactivo (es decir, en ausencia de excipientes adicionales), tiene mayor disponibilidad que otras formulaciones de alta concentración que tienen excipientes adicionales. Como se describe en los ejemplos de trabajo de más adelante, se mostró que una formulación que contiene más de 50 mg/ml  
10 de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano aislado y un polisorbato tenía biodisponibilidad elevada con respecto a otras formulaciones de alta concentración, incluyendo la formulación comercial de adalimumab descrita en el documento US20060153846.

**[0125]** Como se describe en el Ejemplo 2 de más adelante, la biodisponibilidad de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$   
15 puede aumentarse al combinar el anticuerpo con un tensioactivo, por ejemplo, polisorbato 80. El aumento en la biodisponibilidad se basa en la combinación del anticuerpo y el tensioactivo y la omisión o eliminación de otros excipientes, incluyendo un tampón, poliol y sal. El aumento en la biodisponibilidad produce un ABC<sub>0-360</sub> del anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , o una porción de unión al antígeno del mismo, mayor de aproximadamente 1300  $\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{ml}$ , o un ABC<sub>0-1344</sub> del anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , o una porción de unión al antígeno del mismo, mayor de aproximadamente  
20 2600  $\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{ml}$ , cuando se inyecta por vía subcutánea en un sujeto humano.

**[0126]** Por consiguiente, la presente divulgación proporciona métodos para mejorar la biodisponibilidad de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, en una formulación farmacéutica. Los métodos incluyen combinar una cantidad terapéuticamente eficaz del anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , o porción de unión al  
25 antígeno del mismo, con un tensioactivo y excluir o eliminar otros excipientes, por ejemplo, un tampón (tampones), sal y poliol, o combinaciones de los mismos, tal que la biodisponibilidad del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, mejore. En un caso, la formulación se inyecta por vía subcutánea en un sujeto humano. Los métodos pueden mejorar la biodisponibilidad proporcionando un ABC<sub>0-360</sub> del anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , o una porción de unión al antígeno del mismo, mayor de aproximadamente 1100, 1125, 1150, 1175, 1200, 1225, 1250, 1275, 1300,  
30 1325, 1350, 1375, 1400, 1425, 1450, 1475 o aproximadamente 1500  $\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{ml}$ , cuando se inyecta por vía subcutánea en un sujeto humano.

**[0127]** La divulgación proporciona además un método de mejora de la biodisponibilidad de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, en un sujeto, comprendiendo dicho método  
35 administrar una formulación que comprende un tensioactivo y una cantidad eficaz del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, al sujeto, tal que la biodisponibilidad del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, en el sujeto mejore al menos aproximadamente el 15 % con respecto a una segunda formulación. En un caso, la formulación de la divulgación no contiene un tampón, un poliol o una sal, y la segunda formulación comprende un tampón, un poliol y una sal. En un caso, la biodisponibilidad del anticuerpo, o porción de unión al  
40 antígeno del mismo, mejora al menos aproximadamente el 30 % con respecto a la segunda formulación. En un caso, la biodisponibilidad del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, mejora al menos aproximadamente el 40 % con respecto a la segunda formulación. En un caso, la biodisponibilidad puede determinarse según el nivel de ABC, por ejemplo, ABC<sub>0-360</sub> o ABC<sub>0-1344</sub>, o una C<sub>máx</sub>.

45 **[0128]** En un caso, la presente divulgación proporciona una formulación acuosa líquida que incluye un tensioactivo y aproximadamente 30-90 mg de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano aislado, o porción de unión al antígeno del mismo, en la que la formulación tiene una concentración de anticuerpo de aproximadamente 90-110 mg/ml y en la que la formulación proporciona biodisponibilidad elevada del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, a un sujeto humano tras la inyección subcutánea de la formulación con respecto a una  
50 formulación que comprende tampón citrato-fosfato, cloruro sódico y manitol.

**[0129]** En un caso, la presente divulgación proporciona formulaciones acuosas líquidas que incluyen un tensioactivo y 30-90 mg de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano aislado, o una porción de unión al antígeno del mismo, en la que la formulación tiene una concentración de anticuerpo de 90-110 mg/ml, y en la que la formulación proporciona biodisponibilidad elevada del anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, a un sujeto humano  
55 tras la inyección subcutánea de la formulación, tal que el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, tenga un ABC<sub>0-360</sub> mayor de aproximadamente 1100, 1125, 1150, 1175, 1200, 1225, 1250, 1275, 1300, 1325, 1350, 1375, 1400, 1425, 1450, 1475, o aproximadamente 1500  $\mu\text{g} \cdot \text{h} / \text{ml}$ .

**[0130]** En un caso, la formulación de la divulgación contiene adalimumab (o un biosimilar del mismo), polisorbato 80 y agua para inyección. En un caso, la formulación contiene 80 mg de adalimumab, agua para inyección y 1 mg/ml de polisorbato 80. La formulación puede contener 20-110 mg, alternativamente 20-90 mg de adalimumab, o alternativamente 30-80 mg del anticuerpo. En un caso, la formulación contiene 30 mg, 31 mg, 32 mg, 33 mg, 34 mg, 35 mg, 36 mg, 37 mg, 38 mg, 39 mg, 40 mg, 41 mg, 42 mg, 43 mg, 44 mg, 45 mg, 46 mg, 47 mg, 48 mg, 49 mg, 50 mg, 51 mg, 52 mg, 53 mg, 54 mg, 55 mg, 56 mg, 57 mg, 58 mg, 59 mg, 60 mg, 61 mg, 62 mg, 63 mg, 64 mg, 65 mg, 66 mg, 67 mg, 68 mg, 69 mg, 70 mg, 71 mg, 72 mg, 73 mg, 74 mg, 75 mg, 76 mg, 77 mg, 78 mg, 79 mg, 80 mg, 81 mg, 82 mg, 83 mg, 84 mg, 85 mg, 86 mg, 87 mg, 88 mg, 89 mg, 90 mg, 91 mg, 92 mg, 93 mg, 94 mg, 95 mg, 96 mg, 97 mg, 98 mg, 99 mg, 100 mg, 101 mg, 102 mg, 103 mg, 104 mg, 105 mg, 106 mg, 107 mg, 108 mg, 109 mg o 110 mg del anticuerpo. Los intervalos que incluyen los números anteriormente mencionados también están incluidos en la divulgación, por ejemplo, 70-90 mg, 65-95 mg o 60-85 mg.

**[0131]** Así pues, las formulaciones con alto contenido de anticuerpos y los métodos de la divulgación no solo vencen varios desafíos conocidos para las formulaciones farmacéuticas, incluyendo altas concentraciones en una formulación estable, sino que también poseen el beneficio añadido de producir biodisponibilidad elevada o proporcionar niveles significativamente bajos de dolor cuando se inyectan en los pacientes.

**[0132]** Otro obstáculo vencido por las formulaciones de la invención es la capacidad de permanecer estable a temperatura ambiente (a aproximadamente 25 °C o hasta aproximadamente 30 °C). Tal estabilidad proporciona ventajas para el usuario del anticuerpo, proporcionando opciones de almacenamiento más flexibles, ya que la necesidad constante de refrigeración no es necesaria. Tanto la formulación que disminuye el dolor como la formulación que aumenta la biodisponibilidad (ejemplificadas por las Formulaciones F3 y F4, respectivamente, en los ejemplos de más adelante), son estables durante al menos 6 días a aproximadamente 25 °C o hasta aproximadamente 30 °C. Como se describe en mayor detalle en los ejemplos, las formulaciones de la invención son estables hasta aproximadamente 30 °C durante al menos 6 días, al menos 7 días, al menos 8 días, al menos 9 días, al menos 10 días, al menos 11 días, al menos 12 días, al menos 13 días y al menos 14 días. Así pues, la invención proporciona además formulaciones que tienen una vida en anaquel extendida (es decir, al menos 6 días, 10 días o 14 días) a temperatura ambiente (o aproximadamente 25 °C, o hasta aproximadamente 30 °C). En una realización, la formulación de la invención es estable a 20 a 32 °C durante al menos 6 días. También se prevé que temperaturas intermedias a las concentraciones anteriormente mencionadas sean parte de la presente invención, es decir, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31 y 32 grados Celsius (C). Los intervalos que incluyen las temperaturas anteriormente mencionadas también están incluidos en la invención, por ejemplo, 22-26 °C, 25-30 °C, etc.

**[0133]** Las formulaciones de la divulgación contienen una alta concentración de anticuerpo, incluyendo, por ejemplo, una concentración de anticuerpo de aproximadamente 50 mg/ml, 55 mg/ml, 60 mg/ml, 65 mg/ml, 70 mg/ml, 75 mg/ml, 80 mg/ml, 85 mg/ml, 90 mg/ml, 95 mg/ml, 100 mg/ml, 105 mg/ml, 110 mg/ml, 115 mg/ml (o mayor) de un anticuerpo anti-TNF-alfa humano, o fragmento de unión al antígeno del mismo. Por consiguiente, como se describe en los ejemplos de más adelante, en un caso de la divulgación, las formulaciones farmacéuticas líquidas de la divulgación contienen una concentración de anticuerpo anti-TNF-alfa humano de 50-100 mg/ml, o mayor. En un caso, las formulaciones de la divulgación pueden comprender una concentración de anticuerpo entre aproximadamente 1 mg/ml - 50 mg/ml, o aproximadamente 40 mg/ml - 125 mg/ml. En un caso, la concentración del anticuerpo de la formulación es 50-150 mg/ml, 55-150 mg/ml, 60-150 mg/ml, 65-150 mg/ml, 70-150 mg/ml, 75-150 mg/ml, 80-150 mg/ml, 85-150 mg/ml, 90-150 mg/ml, 90-110 mg/ml, 95-105 mg/ml, 95-150 mg/ml, 100-150 mg/ml, 105-150 mg/ml, 110-150 mg/ml, 115-150 mg/ml, 120-150 mg/ml, 125-150 mg/ml, 50-130 mg/ml, 75-125 mg/ml, etc. También se pretende que concentraciones e intervalos intermedios a las concentraciones anteriormente mencionadas sean parte de la divulgación (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115, 116, 117, 118, 119, 120, 121, 122, 123, 124, 125, 126, 127, 128, 129, 130, 131, 132, 133, 134, 135, 136, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150 mg/ml).

**[0134]** Las formulaciones de la invención pueden contener una cantidad eficaz del anticuerpo. En un caso, una cantidad eficaz es aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95 o aproximadamente 100 mg del anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano, o porción de unión al antígeno del mismo. En un caso, las formulaciones y métodos de la divulgación comprenden aproximadamente 20-100, aproximadamente 20-90, aproximadamente 30-90, aproximadamente 30-100, aproximadamente 60-100, aproximadamente 60-90, aproximadamente 40-90, aproximadamente 60-85, o aproximadamente 40-100 mg de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano, o porción de unión al antígeno del mismo. En un caso, la formulación contiene 30 mg, 31 mg, 32 mg, 33 mg, 34 mg, 35 mg, 36 mg, 37 mg, 38 mg, 39 mg, 40 mg, 41 mg, 42 mg, 43 mg, 44 mg, 45 mg, 46 mg, 47 mg, 48 mg,

49 mg, 50 mg, 51 mg, 52 mg, 53 mg, 54 mg, 55 mg, 56 mg, 57 mg, 58 mg, 59 mg, 60 mg, 61 mg, 62 mg, 63 mg, 64 mg, 65 mg, 66 mg, 67 mg, 68 mg, 69 mg, 70 mg, 71 mg, 72 mg, 73 mg, 74 mg, 75 mg, 76 mg, 77 mg, 78 mg, 79 mg, 80 mg, 81 mg, 82 mg, 83 mg, 84 mg, 85 mg, 86 mg, 87 mg, 88 mg, 89 mg o 90 mg del anticuerpo. Los intervalos que incluyen los números anteriormente mencionados también están incluidos en la divulgación, por ejemplo 70-90 o 75-85 mg o 60-85 mg.

**[0135]** Un aspecto importante de las formulaciones y métodos de la divulgación es la omisión de un tampón y sal. Así pues, en un caso, las formulaciones y métodos de la divulgación no contienen ningún tampón (tampones) (por ejemplo, citrato y fosfato) y sales. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que, aunque las formulaciones preferidas de la invención no contienen tampones o sales (por ejemplo, NaCl), puede estar presente una pequeña cantidad de tampón y/o sal en las formulaciones. Así pues, en una realización, las formulaciones de la invención no contienen niveles detectables de un tampón (tampones) y/o una sal.

**[0136]** En una realización, el (los) tampón (tampones) omitidos de las formulaciones de la invención (o aquellas formulaciones para comparación que incluyen un tampón (tampones)), pueden incluir ácido cítrico (por ejemplo, aproximadamente 1,3-1,31 mg/ml o 1,305 mg/ml). En otra realización, el sistema tampón incluye citrato de sodio deshidratado (por ejemplo, aproximadamente 0,27-0,33 mg/ml, o aproximadamente 0,305 mg/ml). En una realización, el sistema tampón incluye fosfato disódico deshidratado (por ejemplo, aproximadamente 1,5-1,56 mg/ml o aproximadamente 1,53 mg/ml). En otra realización, el sistema tampón incluye dihidrogenofosfato de sodio dihidratado (por ejemplo, aproximadamente 0,83-0,89 mg/ml, o aproximadamente 0,86 mg/ml).

**[0137]** En una realización de la invención, la conductividad de la formulación puede usarse para definir si una formulación tiene un tampón y/o sal. Se ha determinado que tanto la Formulación F3 como F4 (descritas en los ejemplos de trabajo de más adelante) tienen una conductividad menor de aproximadamente 2 mS/cm, por ejemplo, aproximadamente 0,7  $\mu$ S/cm. Así pues, en una realización, las formulaciones que reducen el dolor y aumentan la biodisponibilidad de la invención tienen una conductividad menor de aproximadamente 2 mS/cm. En otra realización, las formulaciones de la invención tienen una conductividad menor de aproximadamente 1 mS/cm.

**[0138]** En un caso, la formulación de la divulgación contiene un anticuerpo anti-TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml (o 75-125 mg/ml), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 80), un poliol (por ejemplo, sorbitol o manitol) y tiene una conductividad menor de 2 mS/cm. En un caso, la formulación de la divulgación contiene un anticuerpo anti-TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml (o 75-125 mg/ml), aproximadamente 0,8-1,3 mg/ml de un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 80), menos de aproximadamente 50 mg/ml de un poliol (por ejemplo, sorbitol o manitol) y tiene una conductividad menor de 2 mS/cm.

**[0139]** En un caso, la formulación de la divulgación contiene un anticuerpo anti-TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml (o 75-125 mg/ml), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 80) y tiene una conductividad menor de 2 mS/cm. En un caso, la formulación de la divulgación contiene un anticuerpo anti-TNF-alfa, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml (o 75-125 mg/ml), aproximadamente 0,8-1,3 mg/ml de un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 80) y tiene una conductividad menor de 2 mS/cm.

**[0140]** En otro caso, la divulgación proporciona una formulación estable que tiene una alta concentración de anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, en la que el anticuerpo o antígeno tiene un diámetro hidrodinámico (promedio en z) menor de aproximadamente 4 nm, o en la que el anticuerpo o antígeno tiene un diámetro hidrodinámico (promedio en z) que es al menos aproximadamente el 50 % menor del diámetro hidrodinámico de una disolución tamponada a la misma concentración de anticuerpo. En un caso, el anticuerpo o antígeno tiene un diámetro hidrodinámico (promedio en z) menor de aproximadamente 3 nm.

**[0141]** En un caso, la formulación de la divulgación contiene un anticuerpo anti-TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml (o 75-125 mg/ml), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 80), un poliol (por ejemplo, sorbitol o manitol) y tiene un diámetro hidrodinámico menor de 4 nm. En un caso, la formulación de la divulgación contiene un anticuerpo anti-TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml (o 75-125 mg/ml), aproximadamente 0,8-1,3 mg/ml de un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 80), menos de aproximadamente 50 mg/ml de un poliol (por ejemplo, sorbitol o manitol) y tiene un diámetro hidrodinámico menor de 4 nm.

**[0142]** En un caso, la formulación de la divulgación contiene un anticuerpo anti-TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml (o 75-125 mg/ml), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 80) y tiene un diámetro hidrodinámico menor de 4 nm. En un caso, la formulación de la divulgación contiene un anticuerpo anti-TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml (o 75-125 mg/ml), aproximadamente 0,8-1,3 mg/ml de un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 80) y tiene un diámetro hidrodinámico menor de 4 nm.

**[0143]** Se incluye un detergente o tensioactivo en la formulación de anticuerpo de la divulgación. Detergentes a modo de ejemplo incluyen detergentes no iónicos tales como polisorbatos (por ejemplo, polisorbatos 20, 80, etc.) o poloxámeros (por ejemplo, poloxámero 188). La cantidad de detergente añadida es tal que reduce la agregación del anticuerpo formulado y/o minimiza la formación de partículas en la formulación y/o reduce la adsorción. En un caso preferido de la divulgación, la formulación incluye un tensioactivo que es polisorbato. En otro caso preferido de la divulgación, la formulación contiene el detergente polisorbato 80. En un caso, la formulación contiene entre aproximadamente 0,1 y aproximadamente 2,0 mg/ml de tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), por ejemplo, aproximadamente 1 mg/ml. Otros intervalos de polisorbato que puedan estar incluidos en las formulaciones de la divulgación incluyendo 0,1 a 1,5 mg/ml, alternativamente 0,2-1,4 mg/ml, 0,3-1,3 mg/ml, 0,4-1,2 mg/ml, 0,5-1,1 mg/ml, 0,6-1,0 mg/ml, 0,6-1,1 mg/ml, 0,7-1,1 mg/ml, 0,8-1,1 mg/ml o 0,9-1,1 mg/ml. También está previsto que valores e intervalos intermedios a las concentraciones anteriormente mencionadas sean parte de la presente divulgación; por ejemplo, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 1,1, 1,2, 1,3, 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9. Además, está previsto que los intervalos de los valores que usan una combinación de cualquiera de los valores anteriormente mencionados como límites superior y/o inferior estén incluidos, por ejemplo, de 0,3 a 1,1 mg/ml.

**[0144]** En un caso, la formulación de la divulgación consiste esencialmente en un anticuerpo anti-TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml (o 75-125 mg/ml), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato 80), un poliol (por ejemplo, sorbitol o manitol), no contiene un tampón (tampones) (por ejemplo, ácido cítrico monohidratado, citrato de sodio, fosfato disódico dihidratado y/o dihidrogenofosfato de sodio dihidratado) y no contiene una sal (por ejemplo, NaCl).

**[0145]** En ciertas realizaciones, la formulación por lo demás idéntica con la que se comparó la formulación de la invención para fines de dolor o biodisponibilidad es una formulación que contiene adalimumab, cloruro sódico, fosfato monobásico de sodio dihidratado, fosfato dibásico de sodio dihidratado, citrato de sodio, ácido cítrico monohidratado, manitol, polisorbato 80 y agua para inyección.

**[0146]** La formulación en el presente documento también puede combinarse con uno o más de otros agentes terapéuticos, según sea necesario para la indicación particular que se trata. En una realización, éstos son actividades complementarias que no afectan de manera adversa al anticuerpo de la formulación. Tales agentes terapéuticos están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son eficaces para el fin previsto. Agentes terapéuticos adicionales que pueden combinarse con la formulación de la invención se describen adicionalmente en las patentes de EE.UU. N.º 6.090.382 y 6.258.562.

**[0147]** Todas las formulaciones descritas en el presente documento también pueden usarse en los métodos de la divulgación.

### **III. Anticuerpos para uso en las formulaciones y métodos de la divulgación**

**[0148]** Las formulaciones y métodos de la divulgación pueden incluir un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, particularmente un anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , o porción o fragmento de unión al antígeno del mismo. Ejemplos de anticuerpos que pueden usarse en la divulgación incluyen anticuerpos quiméricos, anticuerpos no humanos, anticuerpos humanos aislados, anticuerpos humanizados y dominios de anticuerpos (dAbs). Todos los anticuerpos descritos en el presente documento también pueden usarse en los métodos de la divulgación.

**[0149]** En un caso, las formulaciones de la divulgación comprenden un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, que se une a TNF $\alpha$  humano, incluyendo, por ejemplo, adalimumab (también denominado en lo sucesivo Humira, adalimumab, o D2E7; Abbott Laboratories). En un caso adicional, la formulación comprende un anticuerpo que se une al mismo epítipo que adalimumab, tal como, pero no se limita a, un anticuerpo biosimilar a adalimumab. En un caso, el anticuerpo es un anticuerpo IgG1 humano que tiene seis CDRs que se corresponden con aquellas de la cadena ligera y pesada de adalimumab.

**[0150]** En un caso, la divulgación presenta un anticuerpo humano aislado, o porción de unión al antígeno del

mismo, que se une a TNF-alfa humano con afinidad alta y una baja constante de disociación, y también tiene una alta capacidad neutralizante. En un caso, los anticuerpos humanos usados en la divulgación son anticuerpos anti-hTNF-alfa humanos neutralizantes, recombinantes.

5 **[0151]** En un caso, la divulgación se refiere a anticuerpos adalimumab y porciones del anticuerpo, anticuerpos relacionados con adalimumab y porciones de anticuerpo, y a otros anticuerpos humanos y porciones de anticuerpo con propiedades equivalentes al adalimumab, tales como unión de alta afinidad a hTNF $\alpha$ , con baja cinética de disociación y alta capacidad neutralizante. En un caso, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, se define según las características de disociación y de unión similares a adalimumab. Por ejemplo, la  
10 formulación puede incluir un anticuerpo humano que se disocia de TNF $\alpha$  humano con una  $K_d$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menor, y una constante  $k_{dis}$  de  $1 \times 10^{-3}$  s $^{-1}$  o menor, ambas determinadas por resonancia de plasmones superficiales. En otro caso, el anticuerpo humano se disocia del TNF $\alpha$  humano con una  $K_d$  de  $1 \times 10^{-9}$  M o menor.

**[0152]** En un caso, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, es un anticuerpo humano que  
15 se disocia del TNF $\alpha$  humano con una  $K_d$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menor, y una constante  $k_{dis}$  de  $1 \times 10^{-3}$  s $^{-1}$  o menor, ambas determinadas por resonancia de plasmones superficiales, y neutraliza la citotoxicidad de TNF $\alpha$  humano en un ensayo estándar *in vitro* en L929 con una  $CI_{50}$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menor. Ejemplos y métodos de preparación de anticuerpos neutralizantes humanos que tienen una alta afinidad por TNF $\alpha$  humano, incluyendo las secuencias de los anticuerpos, se describen en la patente de EE.UU. N.º 6.090.382 (denominada en lo sucesivo D2E7).  
20

**[0153]** El anticuerpo usado en la formulación de la invención es D2E7, también denominado en lo sucesivo HUMIRA™ o adalimumab (la secuencia de aminoácidos de la región VL de D2E7 se muestra en SEQ ID NO: 1; la secuencia de aminoácidos de la región VH de D2E7 se muestra en SEQ ID NO: 2). Las propiedades de D2E7 (adalimumab / HUMIRA®) se han descrito en Salfeld et al., patentes de EE.UU. N.º 6.090.382, 6.258.562 y  
25 6.509.015.

**[0154]** En un caso, TNF-alfa humano, o una porción de unión al antígeno del mismo, se disocia de TNF-alfa humano con una  $K_d$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menor y una constante de disociación  $k_{dis}$  de  $1 \times 10^{-3}$  s $^{-1}$  o menor, ambas determinadas por resonancia de plasmones superficiales, y neutraliza la citotoxicidad de TNF-alfa humano en un  
30 ensayo estándar *in vitro* en L929 con una  $CI_{50}$  de  $1 \times 10^{-7}$  M o menor. En un caso, el anticuerpo humano aislado, o porción de unión al antígeno del mismo, se disocia de TNF-alfa humano con una  $k_{dis}$  de  $5 \times 10^{-4}$  s $^{-1}$  o menor; o, en un caso, con una  $k_{dis}$  de  $1 \times 10^{-4}$  s $^{-1}$  o menor. En un caso, el anticuerpo humano aislado, o porción de unión al antígeno del mismo, neutraliza la citotoxicidad de TNF-alfa humano en un ensayo estándar *in vitro* en L929 con una  $CI_{50}$  de  $1 \times 10^{-8}$  M o menor; o en un caso, con una  $CI_{50}$  de  $1 \times 10^{-9}$  M o menor; o en un caso, con una  $CI_{50}$  de  $1 \times 10^{-10}$  M o  
35 menor. En un caso, el anticuerpo es un anticuerpo humano aislado recombinante, o una porción de unión al antígeno del mismo.

**[0155]** Es bien sabido en la técnica que los dominios CDR3 de la cadenas pesada y ligera de un anticuerpo desempeñan una función importante en la especificidad/afinidad de unión del anticuerpo por un antígeno. Por  
40 consiguiente, en otro caso, el anticuerpo usado en la formulación de la divulgación tiene cinética de disociación lenta para la asociación con hTNF-alfa y tiene dominios CDR3 de la cadena ligera y pesada que estructuralmente son idénticos a, o están relacionados con, los de adalimumab. La posición 9 de CDR3 de VL de adalimumab puede estar ocupada por Ala o Thr, sin afectar sustancialmente  $k_{dis}$ . Por consiguiente, un motivo consensual de la CDR3 de VL de adalimumab comprende la secuencia de aminoácidos: Q-R-Y-N-R-A-P-Y-(T/A) (SEQ ID NO: 3). Adicionalmente,  
45 la posición 12 de la CDR3 de VH de adalimumab puede estar ocupada por Tyr o Asn, sin afectar sustancialmente  $k_{dis}$ . Por consiguiente, un motivo consensual para la CDR3 de VH de adalimumab comprende la secuencia de aminoácidos: V-S-Y-L-S-T-A-S-S-L-D-(Y/N) (SEQ ID NO: 4). Además, como se demostró en el Ejemplo 2 de la patente de EE.UU. N.º 6.090.382, el dominio CDR3 de las cadenas pesada y ligera de adalimumab es susceptible a sustitución con un único resto de alanina (en la posición 1, 4, 5, 7 u 8 dentro de la CDR3 de VL, o en la posición 2, 3,  
50 4, 5, 6, 8, 9, 10 u 11 dentro de la CDR3 de VH), sin afectar sustancialmente  $k_{dis}$ . Todavía adicionalmente, el experto apreciará que, dada la susceptibilidad de los dominios CDR3 de VL y VH de adalimumab a sustituciones con alanina, puede ser posible la sustitución de otros aminoácidos dentro de los dominios CDR3, siempre y cuando todavía conserven la baja constante de disociación del anticuerpo, en particular sustituciones con aminoácidos conservativos. En un caso, no se hacen más de una a cinco sustituciones conservativas de aminoácidos dentro de  
55 los dominios CDR3 de VL y/o VH de adalimumab. En un caso, no se hacen más de una a tres sustituciones conservativas de aminoácidos dentro de los dominios CDR3 de VL y/o VH de adalimumab. Adicionalmente, no deben hacerse sustituciones conservativas de aminoácidos en las posiciones de aminoácidos críticas para la unión a hTNF-alfa. Las posiciones 2 y 5 de CDR3 de VL de adalimumab y las posiciones 1 y 7 de CDR3 de VH de adalimumab parecen ser críticas para la interacción con hTNF- alfa, y por lo tanto, preferentemente no se hacen

sustituciones conservativas de aminoácidos en estas posiciones (aunque es aceptable una sustitución de alanina en la posición 5 de CDR3 de VL de adalimumab, como se describió anteriormente) (véase la patente de EE.UU. N.º 6.090.382).

5 **[0156]** Por consiguiente, en un caso, el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, usado en la formulación de la divulgación contiene las siguientes características:

a) se disocia de TNF $\alpha$  humano con una constante  $k_{dis}$  de  $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  o menor, como se determina por resonancia de plasmones superficiales;

10

b) tiene un dominio CDR3 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una modificación de SEQ ID NO: 3 mediante una sustitución de una única alanina en la posición 1, 4, 5, 7 u 8, o mediante una a cinco sustituciones conservativas de aminoácidos en las posiciones 1, 3, 4, 6, 7, 8 y/o 9;

15

c) tiene un dominio CDR3 de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una modificación de SEQ ID NO: 4 mediante una sustitución de una única alanina en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 u 11, o mediante una a cinco sustituciones conservativas de aminoácidos en las posiciones 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11 y/o 12.

20 **[0157]** En ciertos casos, el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, se disocia de TNF-alfa humano con una  $k_{dis}$  de  $5 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  o menor. En ciertos casos, el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, se disocia de TNF-alfa humano con una  $k_{dis}$  de  $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  o menor.

**[0158]** En todavía otro caso, el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, contiene una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, o una modificación de SEQ ID NO: 3 mediante una sustitución de una única alanina en la posición 1, 4, 5, 7 u 8, y con una región variable de cadena pesada (HCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, o una modificación de SEQ ID NO: 4 mediante una sustitución de una única alanina en la posición 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10 u 11. En un caso, la LCVR tiene además un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (es decir, CDR2 de VL de D2E7) y la HCVR tiene además un dominio CDR2 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6 (es decir, CDR2 de VH de D2E7). En un caso, la LCVR tiene además un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7 (es decir, CDR1 de VL de D2E7), y la HCVR tiene un dominio CDR1 que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (es decir, CDR1 de VH de D2E7). Las regiones estructurales para VL pueden ser de la familia de la línea germinal humana Vkl, o del gen Vk de la línea germinal humana A20, o de las secuencias de la región estructural de VL de adalimumab mostradas en las Figuras 1A y 1B de la patente de EE.UU. N.º 6.090.382. Las regiones estructurales para VH pueden ser de la familia de la línea germinal humana VH3, o del gen VH de la línea germinal humana DP-31, o de las secuencias de la región estructural VH de D2E7 mostradas en las Figuras 2A y 2B de la patente de EE.UU. N.º 6.090.382. Las secuencias de ácido nucleico correspondientes a las regiones variables ligeras y pesadas de adalimumab se describen en SEQ ID NOs: 36 y 37, respectivamente.

**[0159]** Por consiguiente, en otro caso, el anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, contiene una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1 (es decir, la VL de adalimumab) y una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2 (es decir, la VH de adalimumab). En ciertos casos, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada tal como una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD. En ciertos casos, la región constante de cadena pesada es una región constante de cadena pesada IgG1 o una región constante de cadena pesada IgG4. Además, el anticuerpo puede comprender una región constante de cadena ligera, ya sea una región constante de cadena ligera kappa o una región constante de cadena ligera lambda. En un caso, el anticuerpo comprende una región constante de cadena ligera kappa. Alternativamente, la porción de anticuerpo puede ser, por ejemplo, un fragmento Fab o un fragmento Fv de una sola cadena.

**[0160]** En todavía otros casos, la divulgación incluye usos de un anticuerpo humano aislado, o porción de unión al antígeno del mismo, que contiene los dominios CDR3 de VL y VH relacionados con adalimumab. Por ejemplo, los anticuerpos o porciones de unión al antígeno de los mismos pueden tener una región variable de cadena ligera (LCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25 y SEQ ID NO: 26 o con una región variable de cadena pesada

(HCVR) que tiene un dominio CDR3 que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35.

5 **[0161]** En un caso, el anticuerpo contra TNF $\alpha$  usado en la divulgación incluye el anticuerpo quimérico infliximab (Remicade®, Johnson and Johnson; descrito en la patente de EE.UU. N.º 5.656.272), el anticuerpo CDP571 (un anticuerpo IgG4 anti-TNF-alfa monoclonal humanizado), CDP 870 (un fragmento de anticuerpo anti-TNF-alfa monoclonal humanizado), un dAb anti-TNF (Peptech) o un CNTO 148 (golimumab; Medarex y Centocor, véase el documento WO 02/12502). Anticuerpos contra TNF adicionales que pueden usarse en la divulgación se describen en las patentes de EE.UU. N.º 6.593.458; 6.498.237; 6.451.983; y 6.448.380.

15 **[0162]** Puede prepararse un anticuerpo, o porción de anticuerpo, usado en los métodos y composiciones de la divulgación mediante expresión recombinante de genes de cadena ligera y pesada de inmunoglobulina, en una célula huésped. Para expresar de manera recombinante un anticuerpo, una célula huésped es transfectada con uno o más vectores de expresión recombinantes que llevan fragmentos de ADN que codifican las cadenas ligera y pesada de inmunoglobulina del anticuerpo, tal que las cadenas ligera y pesada sean expresadas en la célula huésped y, preferentemente, secretadas en el medio en el que se cultivan las células huésped, de cuyo medio pueden recuperarse los anticuerpos. Se usan metodologías de ADN recombinante estándar para obtener genes de cadena pesada y ligera de anticuerpos, incorporar estos genes en vectores de expresión recombinantes e introducir los vectores en células huésped, tales como aquellas descritas en Sambrook, Fritsch y Maniatis (eds), Molecular Cloning; A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N.Y., (1989), Ausubel, F.M. et al. (eds.) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates, (1989) y en la patente de EE.UU. N.º 4.816.397 de Boss et al.

25 **[0163]** Para expresar un anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , por ejemplo adalimumab (D2E7) o un anticuerpo relacionado con adalimumab (D2E7), primero se obtienen fragmentos de ADN que codifican las regiones variables de cadena pesada y ligera. Estos ADN pueden obtenerse por amplificación y modificación de secuencias variables de cadena ligera y pesada de la línea germinal, usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se conocen en la técnica secuencias de ADN de línea germinal para genes de región variable de cadena pesada y cadena ligera humana (véase, por ejemplo, la base de datos de secuencias de la línea germinal humana "Vbase"; véase también Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson, I.M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline VH Sequences Reveals about Fifty Groups of VH Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; y Cox, J.P.L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line V78 Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836). Por ejemplo, para obtener un fragmento de ADN que codifica la región variable de cadena pesada de D2E7, o un anticuerpo relacionado con D2E7, un miembro de la familia VH3 de los genes VH de línea germinal humana se amplifica por PCR estándar. En ciertas realizaciones, la secuencia de línea germinal VH de DP-31 se amplifica. Para obtener un fragmento de ADN que codifica para la región variable de cadena ligera de D2E7, o un anticuerpo relacionado con D2E7, un miembro de la familia Vkl de los genes VL de la línea germinal humana se amplifica por PCR estándar. En ciertas realizaciones, la secuencia de línea germinal VL del anticuerpo A20 se amplifica. Pueden diseñarse cebadores de PCR adecuados para su uso en la amplificación de las secuencias VH de línea germinal de DP-31 y VL de línea germinal de A20 basándose en las secuencias de nucleótidos desveladas en las referencias anteriormente citadas, usando métodos estándar.

45 **[0164]** Una vez se obtienen los fragmentos VH y VL de línea germinal, estas secuencias pueden ser mutadas para codificar las secuencias de aminoácidos del anticuerpo anti-TNF $\alpha$  desvelado en el presente documento. Las secuencias de aminoácidos codificadas por las secuencias de ADN de VH y VL de línea germinal se comparan primero con las secuencias de aminoácidos de VH y VL del anticuerpo anti-TNF $\alpha$  para identificar restos de aminoácidos en la secuencia del anticuerpo anti-TNF $\alpha$  que difieran de la línea germinal. Después, los nucleótidos apropiados de las secuencias de ADN de línea germinal se mutan tal que la secuencia de línea germinal mutada codifique la secuencia de aminoácidos del anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , usando el código genético para determinar qué cambios de nucleótidos deben hacerse. La mutagénesis de las secuencias de línea germinal se lleva a cabo por métodos estándar, tales como mutagénesis mediada por PCR (en la que los nucleótidos mutados son incorporados en los cebadores de PCR, tal que el producto de la PCR contenga las mutaciones), o mutagénesis dirigida al sitio.

55 **[0165]** Además, debe tenerse en cuenta que si las secuencias de "línea germinal" obtenidas por amplificación por PCR codifican diferencias de aminoácidos en las regiones estructurales de la configuración de línea germinal verdadera (es decir, diferencias en la secuencia amplificada en comparación con la secuencia de línea germinal verdadera, por ejemplo, como resultado de mutación somática), puede ser deseable cambiar estas diferencias de

aminoácidos de nuevo a las secuencias de línea germinal verdaderas (es decir, “retromutación” de los restos de la región estructural a la configuración de línea germinal).

**[0166]** Una vez que se obtienen fragmentos de ADN que codifican los segmentos VH y VL del anticuerpo anti-TNFa (por ejemplo, por amplificación y mutagénesis de genes VH y VL de línea germinal, como se describió anteriormente), estos fragmentos de ADN pueden manipularse adicionalmente por técnicas de ADN recombinante estándar, por ejemplo, para convertir los genes de región variable en genes de cadena de anticuerpo de longitud completa, a genes del fragmento Fab, o a un gen de scFv. En estas manipulaciones, un fragmento de ADN que codifica VL o VH está operativamente enlazado con otro fragmento de ADN que codifica otra proteína, tal como una región constante de anticuerpo o un conector flexible. El término “operativamente enlazado”, como se usa en este contexto, pretende significar que los dos fragmentos de ADN se unen tal que las secuencias de aminoácidos codificadas por los dos fragmentos de ADN permanecen en el marco.

**[0167]** El ADN aislado que codifica la región VH puede convertirse en un gen de cadena pesada de longitud completa enlazado operativamente el ADN que codifica VH a otra molécula de ADN que codifica regiones constantes de cadena pesada (CH1, CH2 y CH3). Las secuencias de genes de región constante de cadena pesada humana se conocen en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que engloban estas regiones mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena pesada puede ser una región constante IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM o IgD, pero más preferentemente es una región constante IgG1 o IgG4. Para un gen de cadena pesada del fragmento Fab, el ADN que codifica VH puede enlazarse operativamente a otra molécula de ADN que codifica solo la región constante CH1 de cadena pesada.

**[0168]** El ADN aislado que codifica la región VL puede convertirse en un gen de cadena ligera de longitud completa (así como un gen de cadena ligera Fab) enlazando operativamente el ADN que codifica VL a otra molécula de ADN que codifica la región constante de cadena ligera, CL. Las secuencias de genes de región constante de cadena ligera humana son conocidas en la técnica (véase por ejemplo, Kabat, E.A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242) y pueden obtenerse fragmentos de ADN que engloban estas regiones mediante amplificación por PCR estándar. La región constante de cadena ligera puede ser una región constante kappa o lambda. En un caso, la región constante de cadena ligera es una región constante kappa.

**[0169]** Para crear un gen scFv, los fragmentos de ADN que codifican VH y VL se enlazan operativamente a otro fragmento que codifica un conector flexible, por ejemplo, que codifica la secuencia de aminoácidos (Gly<sub>4</sub>-Ser)<sub>3</sub>, tal que las secuencias VH y VL puedan ser expresadas como una proteína contigua de una sola cadena, con las regiones VL y VH unidas por el conector flexible (véanse por ejemplo, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty et al., *Nature* (1990) 348:552-554).

**[0170]** Para expresar los anticuerpos, o porciones de anticuerpo usados en la divulgación, se insertan ADNs que codifican cadenas ligera y pesada parciales o de longitud completa, obtenidos como se describió anteriormente, en vectores de expresión, tal que los genes se enlacen operativamente a secuencias de control de la transcripción y traducción. En este contexto, el término “operativamente enlazado” pretende significar que un gen de anticuerpo está enlazado a un vector tal que las secuencias de control de la transcripción y traducción dentro del vector cumplan su función prevista de regular la transcripción y la traducción del gen de anticuerpo. El vector de expresión y las secuencias de control de la expresión se eligen para ser compatibles con la célula huésped de expresión usada. El gen de cadena ligera de anticuerpo y el gen de cadena pesada de anticuerpo pueden insertarse en vectores separados, o más normalmente, ambos genes se insertan en el mismo vector de expresión. Los genes de anticuerpo se insertan en el vector de expresión por métodos estándar (por ejemplo, ligamiento de sitios de restricción complementarios en el fragmento de gen de anticuerpo y vector, o ligamiento de extremos romos, si no están presentes sitios de restricción). Antes de la inserción de las secuencias de cadena ligera o pesada de anticuerpo anti-TNFa, el vector de expresión puede ya llevar secuencias de región constante de anticuerpo. Por ejemplo, un enfoque para convertir las secuencias VH y VL del anticuerpo anti-TNFa en genes de anticuerpo de longitud completa es insertarlas en vectores de expresión que ya codifican regiones constantes de cadena pesada y constantes de cadena ligera, respectivamente, tal que el segmento VH esté operativamente enlazado al (a los) segmento(s) CH dentro del vector, y el segmento VL esté operativamente enlazado al segmento CL dentro del vector. Adicional o alternativamente, el vector de expresión recombinante puede codificar un péptido de señal que facilita la secreción de la cadena de anticuerpo a partir de una célula huésped. El gen de cadena de anticuerpo puede ser clonado en el vector, tal que el péptido señal quede enlazado en marco con respecto al extremo amino del

gen de cadena de anticuerpo. El péptido señal puede ser un péptido señal de inmunoglobulina o un péptido señal heterólogo (es decir, un péptido de señal proveniente de una proteína que no es inmunoglobulina).

**[0171]** Además de los genes de cadena de anticuerpo, los vectores de expresión recombinantes de la  
 5 divulgación llevan secuencias reguladoras que controlan la expresión de los genes de cadena de anticuerpo en una  
 célula huésped. El término "secuencia reguladora" pretende incluir elementos promotores, potenciadores y otros  
 elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación) que controlan la transcripción o  
 traducción de los genes de cadena de anticuerpo. Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en  
 10 Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Será  
 apreciado por aquellos expertos en la materia que el diseño del vector de expresión, incluyendo la selección de las  
 secuencias reguladoras, puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va a  
 transformarse, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Secuencias reguladoras preferidas para la expresión  
 en células huésped de mamífero incluyen elementos virales que dirigen altos niveles de expresión de proteína en  
 15 células de mamífero, tales como promotores y/o potenciadores derivados del citomegalovirus (CMV) (tal como el  
 promotor/potenciador del CMV), virus simio 40 (SV40) (tal como el promotor/potenciador de SV40), adenovirus (por  
 ejemplo, el promotor tardío mayor del adenovirus (AdMLP)) y polioma. Para una descripción adicional de elementos  
 reguladores virales y secuencias de los mismos véanse, por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º 5.168.062 de Stinski,  
 la patente de EE.UU. N.º 4.510.245 de Bell et al. y la patente de EE.UU. N.º 4.968.615 de Schaffner et al.

**[0172]** Además de los genes de cadena de anticuerpo y secuencias reguladoras, los vectores de expresión  
 20 recombinantes usados en la divulgación pueden llevar secuencias adicionales, tales como secuencias que regulan la  
 replicación del vector en células huésped (por ejemplo, orígenes de replicación) y genes de marcadores de  
 selección. El gen de marcador de selección facilita la selección de aquellas células huésped en las que el vector se  
 ha introducido (véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N.º 4.399.216; 4.634.665 y 5.179.017, todas de Axel et  
 25 al.). Por ejemplo, normalmente el gen de marcador de selección confiere resistencia a fármacos, tales como G418,  
 higromicina o metotrexato, en una célula huésped en la que se ha introducido el vector. Los genes de marcadores  
 de selección preferidos incluyen el gen de la dihidrofolato reductasa (DHFR) (para uso en células huésped dhfr-, con  
 selección/amplificación con metotrexato) y el gen neo (para selección con G418).

**[0173]** Para la expresión de cadenas ligera y pesada, el (los) vector(es) de expresión que codifican las  
 30 cadenas pesada y ligera se transfectan en una célula huésped por técnicas estándar. Las diversas formas del  
 término "transfección" pretenden englobar una amplia variedad de técnicas comúnmente usadas para la introducción  
 de ADN exógeno en una célula huésped procariota o eucariota, por ejemplo, electroporación, precipitación con  
 fosfato de calcio, transfección con DEAE-dextrano, y similares. Aunque teóricamente es posible expresar los  
 35 anticuerpos de la invención en tanto células huésped eucariotas como procariotas, la expresión de anticuerpos es  
 preferentemente en células eucariotas. En una realización, las células huésped de mamífero son las más preferidas,  
 debido a que es más probable que tales células eucariotas, y en particular las células de mamífero, ensamblen y  
 secreten un anticuerpo apropiadamente plegado e inmunológicamente activo, que las células procariotas. Se ha  
 informado que la expresión procariota de genes de anticuerpo es ineficaz para la producción de altos rendimientos  
 40 de anticuerpos activos (Boss, M.A. y Wood, C. R. (1985) Immunology Today 6:12-13).

**[0174]** Células huésped de mamífero preferidas para expresar los anticuerpos recombinantes de la invención  
 incluyen las células de ovario de hámster chino (células CHO) (incluyendo células CHO dhfr-, descritas en Urlaub y  
 Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-4220, usadas con un marcador de selección DHFR, por ejemplo,  
 45 como se describe en R.J. Kaufman y P. A. Sharp (1982) Mol. Biol. 159:601-621), células de mieloma NS0, células  
 COS y células SP2. Cuando se introducen vectores de expresión recombinantes que codifican genes de anticuerpo  
 en células huésped de mamífero, los anticuerpos se producen cultivando las células huésped durante un periodo de  
 tiempo suficiente como para permitir la expresión del anticuerpo en las células huésped, o además en una  
 realización, la secreción del anticuerpo en el medio de cultivo en el que se hacen crecer las células huésped. Los  
 50 anticuerpos pueden recuperarse del medio de cultivo usando métodos de purificación de proteínas estándar.

**[0175]** También pueden usarse células huésped para producir porciones de anticuerpos intactos, tales como  
 fragmentos Fab o moléculas scFv. Se entiende que las variaciones del procedimiento anterior están dentro del  
 alcance de la presente divulgación. Por ejemplo, puede ser deseable transfectar una célula huésped con ADN que  
 55 codifica tanto la cadena ligera como la cadena pesada (pero no ambas) de un anticuerpo de la presente divulgación.  
 También puede usarse tecnología de ADN recombinante para eliminar algo o todo del ADN que codifica cualquiera o  
 ambas de las cadenas ligera y pesada que no son necesarias para unirse a hTNF-alfa. Las moléculas expresadas a  
 partir de tales moléculas de ADN truncadas también están englobadas por los anticuerpos de la divulgación.  
 Además, pueden producirse anticuerpos bifuncionales en los que una cadena pesada y una ligera son de un

anticuerpo de la divulgación y la otra cadena pesada y ligera son específicas para un antígeno diferente de hTNF-alfa enlazando de manera cruzada un anticuerpo de la invención con un segundo anticuerpo por métodos de reticulación química estándar.

- 5 **[0176]** En un sistema preferido para la expresión recombinante de un anticuerpo, o porción de unión al antígeno del mismo, de la divulgación, un vector de expresión recombinante que codifica tanto la cadena pesada del anticuerpo como la cadena ligera del anticuerpo se introduce en células CHO dhfr- mediante transfección mediada por fosfato de calcio. Dentro del vector de expresión recombinante, los genes de cadena pesada y ligera del anticuerpo están cada uno enlazado operativamente a elementos reguladores de potenciador del CMV/promotor de
- 10 AdMLP para dirigir altos niveles de transcripción de los genes. El vector de expresión recombinante también lleva un gen DHFR, que permite la selección de células CHO que han sido transfectadas con el vector usando selección/amplificación con metotrexato. Las células huésped transformantes seleccionadas se cultivan para permitir la expresión de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo y el anticuerpo intacto se recupera del medio de cultivo. Se usan técnicas de biología molecular estándar para preparar el vector de expresión recombinante, transfectar las
- 15 células huésped, seleccionar los transformantes, cultivar las células huésped y recuperar el anticuerpo del medio de cultivo.

- [0177]** En vista de lo anterior, las composiciones de ácido nucleico, vector y célula huésped que pueden usarse para la expresión recombinante de los anticuerpos y porciones de anticuerpo usados en la divulgación
- 20 incluyen ácidos nucleicos y vectores que comprenden dichos ácidos nucleicos, que comprenden el anticuerpo anti-TNFalfa humano adalimumab (D2E7). La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena ligera de D2E7 se muestra en SEQ ID NO: 36. El dominio CDR1 de la LCVR engloba los nucleótidos 70-102, el dominio CDR2 engloba los nucleótidos 148-168 y el dominio CDR3 engloba los nucleótidos 165-291. La secuencia de nucleótidos que codifica la región variable de cadena pesada de D2E7 se muestra en SEQ ID NO: 37. El dominio
- 25 CDR1 de la HCVR engloba los nucleótidos 91-105, el dominio CDR2 engloba los nucleótidos 148-198, y el dominio CDR3 engloba los nucleótidos 295-330. Se apreciará por el experto que las secuencias de nucleótidos que codifican anticuerpos relacionados con D2E7, o porciones de los mismos (por ejemplo, un dominio CDR, tal como un dominio CDR3), pueden derivarse de secuencias de nucleótidos que codifican LCVR y HCVR de D2E7, usando el código genético y técnicas estándar de biología molecular.
- 30

- [0178]** En un caso, la formulación farmacéutica líquida comprende un anticuerpo anti-TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, que es un bioequivalente o biosimilar al anticuerpo adalimumab. En un caso, un anticuerpo biosimilar es un anticuerpo que no muestra diferencias clínicamente significativas cuando se compara con un anticuerpo de referencia, por ejemplo, adalimumab. Un anticuerpo biosimilar tiene seguridad,
- 35 pureza y potencia equivalentes al anticuerpo de referencia, por ejemplo, adalimumab.

#### ***IV. Administración de las formulaciones de la invención para el tratamiento de trastornos relacionados con TNFa***

- 40 **[0179]** Una ventaja de las formulaciones de la invención es que pueden usarse para administrar una alta concentración de un anticuerpo anti-TNF-alfa, o porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, adalimumab), a un sujeto por vía subcutánea, tal que tanto el dolor tras la inyección disminuya como la biodisponibilidad del anticuerpo mejore. Así pues, en una realización, la formulación de la invención se administra a un sujeto por vía subcutánea. En una realización, el sujeto se administra la formulación a sí mismo (autoadministración).
- 45

- [0180]** En una realización, se administra una cantidad eficaz de la formulación. Un ejemplo de una cantidad eficaz de la formulación es una cantidad suficiente para inhibir la actividad perjudicial de TNF-alfa o tratar un trastorno en el que la actividad de TNF-alfa es perjudicial.

- 50 **[0181]** Como se usa en el presente documento, el término “un trastorno en el que la actividad de TNF-alfa es perjudicial” incluye enfermedades y otros trastornos en los que se ha mostrado que la presencia de TNF-alfa en un sujeto que sufre el trastorno es, o se sospecha que es, responsable de la fisiopatología del trastorno, o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Por consiguiente, un trastorno en el que la actividad de TNF-alfa es perjudicial es un trastorno en el que se espera que la inhibición de la actividad de TNF-alfa alivie los síntomas y/o la
- 55 progresión del trastorno. Tales trastornos pueden ser evidenciados, por ejemplo, por un aumento en la concentración de TNF-alfa en un fluido biológico de un sujeto que sufre la enfermedad (por ejemplo, un aumento en la concentración de TNF-alfa en suero, plasma, líquido sinovial, etc., del sujeto), que puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-TNF-alfa.

**[0182]** En una realización, la cantidad eficaz del anticuerpo puede determinarse según un esquema de dosificación basado estrictamente en el peso (por ejemplo, mg/kg) o puede ser una dosis corporal total (también denominada en lo sucesivo dosis fija) que es independiente del peso. En un caso, una cantidad eficaz del anticuerpo es aproximadamente 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, o aproximadamente 100 mg del anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano, o porción de unión al antígeno del mismo. En una realización, una cantidad eficaz del anticuerpo es aproximadamente 20-100, aproximadamente 20-90, aproximadamente 30-90, aproximadamente 30-100, aproximadamente 60-100, aproximadamente 70-90, aproximadamente 40-90, aproximadamente 60-85 mg, o aproximadamente 40-100 mg. En una realización, la formulación contiene una cantidad eficaz del anticuerpo, de 30 mg, 31 mg, 32 mg, 33 mg, 34 mg, 35 mg, 36 mg, 37 mg, 38 mg, 39 mg, 40 mg, 41 mg, 42 mg, 43 mg, 44 mg, 45 mg, 46 mg, 47 mg, 48 mg, 49 mg, 50 mg, 51 mg, 52 mg, 53 mg, 54 mg, 55 mg, 56 mg, 57 mg, 58 mg, 59 mg, 60 mg, 61 mg, 62 mg, 63 mg, 64 mg, 65 mg, 66 mg, 67 mg, 68 mg, 69 mg, 70 mg, 71 mg, 72 mg, 73 mg, 74 mg, 75 mg, 76 mg, 77 mg, 78 mg, 79 mg, 80 mg, 81 mg, 82 mg, 83 mg, 84 mg, 85 mg, 86 mg, 87 mg, 88 mg, 89 mg, 90 mg, 91 mg, 92 mg, 93 mg, 94 mg, 95 mg, 96 mg, 97 mg, 98 mg, 99 mg o 100 mg del anticuerpo. Los intervalos que incluyen los números anteriormente mencionados también están incluidos en la invención, por ejemplo, 70-90 o 75-85 mg, o 60-85 mg.

**[0183]** En un ejemplo, una cantidad eficaz de la formulación es 0,4 ml o 0,8 ml de la formulación que contiene una dosis corporal total de aproximadamente 80 mg de anticuerpo (es decir, 0,8 ml de una formulación de 100 mg/ml de anticuerpo de la invención). En otro ejemplo, una cantidad eficaz de la formulación es 0,4 ml de la formulación de la invención que contiene una dosis corporal total de aproximadamente 40 mg de anticuerpo (es decir, 0,4 ml de una formulación de 100 mg/ml de anticuerpo de la invención). En todavía otro ejemplo, una cantidad eficaz de la formulación es dos veces 0,8 ml de la formulación que contiene una dosis corporal total de aproximadamente 160 mg de anticuerpo (es decir, dos unidades que contienen 0,8 ml cada una de una formulación de 100 mg/ml de anticuerpo de la invención). En un ejemplo adicional, una cantidad eficaz de la formulación es 0,2 ml de la formulación de la invención que contiene una dosis corporal total de aproximadamente 20 mg de anticuerpo (es decir, 0,2 ml de una formulación de 100 mg/ml de anticuerpo de la invención). Alternativamente, una cantidad eficaz puede determinarse según un régimen de dosis fija basado en el peso (véase, por ejemplo, el documento WO 2008/154543).

**[0184]** En una realización, el TNF-alfa es TNF-alfa humano y el sujeto es un sujeto humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un mamífero que expresa un TNF-alfa con el que el anticuerpo de la invención reacciona de manera cruzada. Todavía adicionalmente, el sujeto puede ser un mamífero en el que se ha introducido hTNF-alfa (por ejemplo, mediante la administración de hTNF-alfa o mediante la expresión de un transgén de hTNF-alfa).

**[0185]** Una formulación de la invención puede administrarse a un sujeto humano para fines terapéuticos (tratado en mayor detalle más adelante). En una realización de la invención, la formulación farmacéutica líquida es fácil de administrar, que incluye, por ejemplo, una formulación que es autoadministrada por el paciente. En una realización, la formulación de la invención es administrada por inyección subcutánea, tal como inyección subcutánea de un solo uso. Además, una formulación de la invención puede administrarse a un mamífero no humano que expresa un TNF-alfa con el que el anticuerpo reacciona de manera cruzada (por ejemplo, un primate, cerdo o ratón) para fines veterinarios o como modelo animal de enfermedad humana. Con respecto a esto último, tales modelos animales pueden ser útiles para evaluar la eficacia terapéutica de los anticuerpos de la invención (por ejemplo, probar las dosis y los periodos de tiempo de administración).

**[0186]** Las formulaciones de la invención pueden administrarse según cierto esquema de dosificación. Por ejemplo, las formulaciones pueden administrarse según un régimen de dosificación semanal, cada dos semanas o mensual. Alternativamente, la formulación puede administrarse una vez cada tres semanas. En un caso, las formulaciones y métodos comprenden la administración al sujeto de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano según una periodicidad seleccionada del grupo que consiste en semanal, cada dos semanas, cada tres semanas y mensual.

**[0187]** En una realización, la formulación acuosa líquida de la invención puede administrarse a un sujeto, por ejemplo, por medio de una jeringa precargada, una pluma autoinyectora o un dispositivo de administración sin aguja. Así pues, la invención también presenta una pluma autoinyectora, una jeringa precargada, o un dispositivo de administración sin aguja, que comprende la formulación acuosa líquida de la invención. En un caso, la divulgación presenta un dispositivo de administración que comprende una dosis de la formulación que comprende 100 mg/ml de un anticuerpo dirigido contra TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, por ejemplo, una pluma autoinyectora o una jeringa precargada que comprende una dosis de aproximadamente 19 mg, 20 mg, 21 mg, 22 mg, 23 mg, 24 mg, 25 mg, 26 mg, 27 mg, 28 mg, 29 mg, 30 mg, 31 mg, 32 mg, 33 mg, 34 mg, 35 mg, 36 mg, 37 mg,

38 mg, 39 mg, 40 mg, 41 mg, 42 mg, 43 mg, 44 mg, 45 mg, 46 mg, 47 mg, 48 mg, 49 mg, 50 mg, 51 mg, 52 mg, 53 mg, 54 mg, 55 mg, 56 mg, 57 mg, 58 mg, 59 mg, 60 mg, 61 mg, 62 mg, 63 mg, 64 mg, 65 mg, 66 mg, 67 mg, 68 mg, 69 mg, 70 mg, 71 mg, 72 mg, 73 mg, 74 mg, 75 mg, 76 mg, 77 mg, 78 mg, 79 mg, 80 mg, 81 mg, 82 mg, 83 mg, 84 mg, 85 mg, 86 mg, 87 mg, 88 mg, 89 mg, 90 mg, 91 mg, 92 mg, 93 mg, 94 mg, 95 mg, 96 mg, 97 mg, 98 mg, 99 mg, 100 mg, 101 mg, 102 mg, 103 mg, 104 mg, 105 mg, etc. de la formulación. En una realización, la jeringa o dispositivo autoinyector contiene 60-100 mg, 70-90 mg, o aproximadamente 80 mg del anticuerpo.

**[0188]** En una realización, las formulaciones de la invención pueden ser autoadministradas usando, por ejemplo, una jeringa precargada o un dispositivo de inyección automático. Los dispositivos de inyección automáticos ofrecen una alternativa a las jeringas operadas manualmente para la administración de agentes terapéuticos en los cuerpos de pacientes, y permitirle a los pacientes autoadministrar las inyecciones. Los dispositivos de inyección automáticos se describen, por ejemplo, en las siguientes publicaciones: WO 2008/005315, WO 2010/127146, WO 2006/000785, WO 2011/075524, WO 2005/113039, WO 2011/075524.

**[0189]** Por consiguiente, en una realización, la presente divulgación proporciona jeringas precargadas o dispositivos autoinyectores que contienen las formulaciones de la divulgación, así como el uso de jeringas precargadas o dispositivos autoinyectores que comprenden las formulaciones descritas en el presente documento en los métodos de la divulgación.

**[0190]** En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar trastornos en los que la actividad de TNF-alfa es perjudicial. Como se usa en el presente documento, el término "un trastorno en el que la actividad de TNF-alfa es perjudicial" pretende incluir enfermedades y otros trastornos en los que se ha demostrado que la presencia de TNF-alfa en un sujeto que sufre el trastorno o enfermedad es, o se sospecha que es, responsable de la fisiopatología del trastorno, o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Por consiguiente, un trastorno en el que la actividad de TNF-alfa es perjudicial es un trastorno en el que se espera que la inhibición de la actividad de TNF-alfa alivie los síntomas y/o la progresión del trastorno. Tales trastornos pueden ser evidenciados, por ejemplo, mediante un aumento en la concentración de TNF-alfa en un fluido biológico de un sujeto que sufre el trastorno (por ejemplo, un aumento en la concentración de TNF-alfa en suero, plasma, líquido sinovial, etc., del sujeto), que puede detectarse, por ejemplo, usando un anticuerpo anti-TNF-alfa como se describió anteriormente.

**[0191]** Existen numerosos ejemplos de trastornos en los que la actividad de TNF-alfa es perjudicial. Ejemplos en los que la actividad de TNF-alfa es perjudicial también se describen en las patentes de EE.UU. N.º 6.015.557; 6.177.077; 6.379.666; 6.419.934; 6.419.944; 6.423.321; 6.428.787; y 6.537.549; y en las publicaciones PCT N.º WO 00/50079 y WO 01/49321. Las formulaciones de la invención también pueden usarse para tratar trastornos en los que la actividad de TNF-alfa es perjudicial, como se describe en las patentes de EE.UU. N.º 6.090.382, 6.258.562 y la solicitud de patente de EE.UU. N.º US20040126372.

**[0192]** El uso de las formulaciones de la invención en el tratamiento de trastornos específicos a modo de ejemplo se tratará además a continuación:

#### A. *Septicemia*

**[0193]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen septicemia. El factor de necrosis tumoral tiene una función establecida en la fisiopatología de la septicemia, con efectos biológicos que incluyen hipotensión, supresión miocárdica, síndrome de fuga vascular, necrosis de órganos, estimulación de la liberación de mediadores secundarios tóxicos y la activación de la cascada de coagulación (véanse, por ejemplo, Tracey, K. J. y Cerami, A. (1994) *Annu. Rev. Med.* 45:491-503; Russell, D and Thompson, R. C. (1993) *Curr. Opin. Biotech.* 4:714-721). Por consiguiente, la formulación de la invención puede usarse para tratar septicemia en cualquiera de sus cuadros clínicos, incluyendo choque séptico, choque endotóxico, septicemia por Gram-negativos y síndrome de choque tóxico.

**[0194]** Además, para tratar la septicemia, la formulación de la invención puede ser coadministrada con uno o más agentes terapéuticos adicionales, que pueden aliviar adicionalmente la septicemia, tales como un inhibidor de interleucina-1 (tal como aquellos descritos en las publicaciones PCT N.º WO 92/16221 y WO 92/17583), la citosina interleucina-6 (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT N.º WO 93/11793) o un antagonista del factor activador de plaquetas (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente europea EP 374 510).

**[0195]** Adicionalmente, en una realización, la formulación de la invención se administra a un sujeto humano dentro de un subgrupo de pacientes con septicemia que tiene una concentración en suero o plasma de IL-6 mayor

de 500 pg/ml; o en una realización, 1000 pg/ml, en el momento del tratamiento (véase la publicación PCT WO 95/20978).

#### B. Enfermedades autoinmunitarias

5

**[0196]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen una enfermedad autoinmunitaria. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en desempeñar una función en la fisiopatología de una variedad de enfermedades autoinmunitarias. Por ejemplo, el TNF-alfa ha sido implicado en activar la inflamación tisular y causar destrucción de articulaciones en la artritis reumatoide (véanse, por ejemplo, Tracey y Cerami, arriba; 10 Arend, W. P. y Dayer, J-M. (1995) *Arth. Rheum.* 38:151-160; Fava, R. A., et al. (1993) *Clin. Exp. Immunol.* 94:261-266). El TNF-alfa también se ha implicado en la promoción de la muerte de células de islotes y en la mediación de la resistencia a la insulina en la diabetes (véanse, por ejemplo, Tracey y Cerami, arriba; publicación PCT WO 94/08609). El TNF-alfa también ha sido implicado en mediar en la citotoxicidad a oligodendrocitos y la inducción de placas inflamatorias en la esclerosis múltiple (véase, por ejemplo, Tracey y Cerami, arriba). También están incluidas 15 en las enfermedades autoinmunitarias que pueden ser tratadas usando las formulaciones de la invención la artritis idiopática juvenil (JIA) (también denominada en lo sucesivo artritis reumatoide juvenil) (véase Grom et al. (1996) *Arthritis Rheum.* 39: 1703; Mangge et al. (1995) *Arthritis Rheum.* 8:211).

**[0197]** La formulación de la invención puede usarse para tratar enfermedades autoinmunitarias, en particular 20 aquellas asociadas a la inflamación, incluyendo artritis reumatoide, espondilitis reumatoide (también denominada en lo sucesivo espondilitis anquilosante), osteoartritis y artritis gotosa, alergia, esclerosis múltiple, diabetes autoinmunitaria, uveítis autoinmunitaria, artritis idiopática juvenil (también denominada en lo sucesivo artritis reumatoide juvenil) y síndrome nefrótico.

#### 25 C. Enfermedades Infecciosas

**[0198]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen una enfermedad infecciosa. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en mediar en los efectos biológicos observados en una 30 variedad de enfermedades infecciosas. Por ejemplo, el TNF-alfa se ha implicado en la mediar en la inflamación cerebral y trombosis capilar, e infarto en la malaria (véase, por ejemplo, Tracey y Cerami, arriba). El TNF-alfa también ha sido implicado en la mediar en la inflamación cerebral, induciendo la rotura de la barrera hematoencefálica, desencadenando el síndrome de choque tóxico y activando el infarto venoso en la meningitis (véase, por ejemplo, Tracey y Cerami, arriba). El TNF-alfa también se ha implicado en inducir caquexia, estimular la proliferación viral y mediar en lesión del sistema nervioso central en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida 35 (SIDA) (véase, por ejemplo, Tracey y Cerami, arriba). Por consiguiente, los anticuerpos y porciones de anticuerpo de la divulgación pueden usarse en el tratamiento de enfermedades infecciosas, incluyendo la meningitis bacteriana (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente europea N.º EP 585 705), malaria cerebral, SIDA y complejo relacionado con el SIDA (CRS) (véase, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente europea N.º EP 230 574), así como infección por citomegalovirus secundaria a trasplantes (véase, por ejemplo, Fietze, E., et al. 40 (1994) *Transplantation* 58:675-680). La formulación de la invención también puede usarse para aliviar los síntomas asociados a enfermedades infecciosas, incluyendo fiebre y mialgias debidas a infección (tal como gripe) y caquexia secundaria a la infección (por ejemplo, secundaria al SIDA o al CRS).

#### D. Trasplante

45

**[0199]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tuvieron un trasplante. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado como un mediador clave del rechazo de aloinjertos y la enfermedad de injerto contra huésped (EIVH) y en mediar en una reacción adversa que fue observada cuando el anticuerpo de rata 50 OKT3, dirigido contra el complejo CD3 de receptores de linfocitos T, se usó para inhibir el rechazo de trasplantes renales (véanse, por ejemplo, Tracey y Cerami, arriba; Eason, J. D., et al. (1995) *Transplantation* 59:300-305; Suthanthiran, M. y Strom, T. B. (1994) *New Engl. J. Med.* 331:365- 375). Por consiguiente, las formulaciones de la invención pueden usarse para inhibir el rechazo de trasplantes, incluyendo rechazos de aloinjertos y xenoinjertos, y para inhibir la EIVH. Aunque el anticuerpo o porción de anticuerpo puede usarse solo, puede usarse en combinación con uno o más de otros agentes que inhiban la respuesta inmunitaria contra el aloinjerto, o inhiban la EIVH. Por 55 ejemplo, en una realización, las formulaciones de la invención se usan en combinación con OKT3 para inhibir las reacciones inducidas por OKT3. En otra realización, la formulación de la invención se usa en combinación con uno o más anticuerpos dirigidos contra otras dianas implicadas en regular las respuestas inmunitarias, tales como moléculas de superficie celular CD25 (receptor-alfa de la interleucina-2, CD11a (LFA-1), CD54 (ICAM-1), CD4, CD45, CD28/CTLA4, CD80 (B7-1) y/o CD86 (B7-2). En todavía otra realización, la formulación de la invención se

usa en combinación con uno o más agentes inmunosupresores generales, tales como la ciclosporina A o FK506.

#### *E. Enfermedades malignas*

5 **[0200]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen cáncer o un tumor maligno. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en inducir caquexia, estimular el crecimiento tumoral, intensificar el potencial metastásico y mediar en la citotoxicidad en enfermedades malignas (véase, por ejemplo, Tracey y Cerami, arriba). Por consiguiente, las formulaciones de la invención pueden usarse en el tratamiento de enfermedades malignas, para inhibir el crecimiento tumoral o la metástasis y/o para aliviar la caquexia secundaria a la enfermedad maligna. La formulación de la invención puede administrarse por vía sistémica o local al sitio del tumor.

#### *F. Trastornos pulmonares*

15 **[0201]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen una enfermedad pulmonar. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología del síndrome disneico del adulto, que incluye activar leucocitos endoteliales, dirigir la citotoxicidad hacia los neumocitos e inducir el síndrome de fuga vascular (véase, por ejemplo, Tracy y Cerami, arriba). Por consiguiente, las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar varios trastornos pulmonares, incluyendo el síndrome disneico del adulto (véase, por ejemplo, la publicación PCT N.º WO 91/04054), choque pulmonar, enfermedad inflamatoria pulmonar crónica, sarcoidosis pulmonar, fibrosis y silicosis pulmonar. La formulación de la invención puede administrarse por vía sistémica o local a la superficie del pulmón, por ejemplo, como un aerosol.

#### *G. Trastornos intestinales*

25 **[0202]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen un trastorno intestinal. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de trastornos intestinales inflamatorios (véase, por ejemplo, Tracy, K. J., et al. (1986) *Science* 234:470-474; Sun, X-M., et al. (1988) *J. Clin. Invest.* 81:1328-1331; MacDonald, T. T., et al. (1990) *Clin. Exp. Immunol.* 81:301-305). Los anticuerpos murinos quiméricos anti-hTNF-alfa han sido sometidos a pruebas clínicas para el tratamiento de la enfermedad de Crohn (van Dulleman, H. M., et al. (1985) *Gastroenterology* 109:129-135). La formulación de la invención también puede emplearse para tratar trastornos intestinales, tales como la enfermedad intestinal inflamatoria idiopática, que incluye dos síndromes: el síndrome de Crohn y la colitis ulcerosa. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar enfermedad de Crohn. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar colitis ulcerosa.

#### *H. Trastornos cardíacos*

35 **[0203]** Las formulaciones de la invención también pueden usarse para tratar varios trastornos cardíacos, incluyendo isquemia del corazón (véase, por ejemplo, la solicitud de patente europea N.º EP 453 898) e insuficiencia cardíaca (debilidad del músculo cardíaco) (véase, por ejemplo, la publicación PCT WO 94/20139).

#### *I. Espondiloartropatías*

45 **[0204]** Las formulaciones de la presente también pueden usarse para tratar sujetos que tienen una espondiloartropatía, incluyendo, por ejemplo, una espondiloartropatía axial. El TNF $\alpha$  ha sido implicado en la fisiopatología de una amplia variedad de trastornos, incluyendo enfermedades inflamatorias tales como las espondiloartropatías (véase, por ejemplo, Moeller, A., et al. (1990) *Cytokine* 2:162-169; patente de EE.UU. N.º 5.231.024 de Moeller et al.; publicación de patente europea N.º 260 610 B1 de Moeller, A.). En una realización, la espondiloartropatía es una espondiloartropatía axial. Otros ejemplos de espondiloartropatías que pueden ser tratados con el anticuerpo TNF $\alpha$  de la invención se tratan a continuación:

##### 1. Artritis psoriásica

55 **[0205]** Las formulaciones de la invención también pueden usarse para tratar sujetos que tienen artritis psoriásica. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la artritis psoriásica (Parsch et al. (1998) *Ann Rheum Dis.* 57:691; Ritchlin et al. (1998) *J Rheumatol.* 25:1544). Como se refiere en el presente documento, la artritis psoriásica (APs) o la psoriasis asociada a la piel, se refiere a la artritis inflamatoria crónica que está asociada a la psoriasis. La psoriasis es una afección cutánea crónica común que causa parches rojos en el cuerpo. Aproximadamente 1 de cada 20 individuos con psoriasis desarrollará artritis junto con la afección cutánea, y

en aproximadamente el 75 % de los casos, la psoriasis precede a la artritis. La APs presenta por sí misma una variedad de formas, que varían desde la artritis leve hasta la grave, en la que la artritis normalmente afecta los dedos y la columna vertebral. Cuando la columna vertebral se ve afectada, los síntomas son similares a los de la espondilitis anquilosante, como se describió anteriormente.

5

**[0206]** La APs a veces está asociada a la artritis mutilante. La artritis mutilante se refiere a un trastorno que está caracterizado por una excesiva erosión del hueso, produciendo una gran deformidad erosiva que mutila la articulación. En una realización, las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar artritis mutilante.

## 10 2. Artritis reactiva/síndrome de Reiter

**[0207]** Las formulaciones de la invención también pueden usarse para tratar sujetos que tienen síndrome de Reiter o artritis reactiva. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la artritis reactiva, que también se denomina síndrome de Reiter (Braun *et al.* (1999) *Arthritis Rheum.* 42(10):2039). La artritis reactiva (ARe) se refiere a una artritis que complica una infección en cualquier parte en el cuerpo, a menudo después de infecciones entéricas o urogenitales. La ARe a menudo se caracteriza por ciertos síntomas clínicos, incluyendo la inflamación de las articulaciones (artritis), uretritis, conjuntivitis y lesiones de la piel y las membranas mucosas. Además, la ARe puede ocurrir tras una infección por una enfermedad de transmisión sexual o una infección disintérica, incluyendo clamidia, campilobacter, salmonela o yersinia.

20

## 3. Espondiloartropatías no diferenciadas

**[0208]** Las formulaciones de la invención también pueden usarse para tratar sujetos que tienen una espondiloartropatía no diferenciada (véase Zeidler *et al.* (1992) *Rheum Dis Clin North Am.* (18):187). Otros términos usados para describir las espondiloartropatías no diferenciadas incluyen la oligoartritis seronegativa y oligoartritis no diferenciada. Espondiloartropatías no diferenciadas, como se usa en el presente documento, se refiere a un trastorno en el que el sujeto demuestra solo algunos de los síntomas asociados a una espondiloartropatía. Esta afección normalmente se observa en adultos jóvenes que no tienen EII, psoriasis, o los síntomas clásicos de AS o síndrome de Reiter. En algunos casos, las espondiloartropatías no diferenciadas pueden ser una indicación temprana de AS.

30

### *J..Trastornos cutáneos y de las uñas*

**[0209]** En una realización, las formulaciones de la invención se usan para tratar un trastorno cutáneo y/o de las uñas. Como se usa en el presente documento, el término “trastorno cutáneo y de las uñas” en el que la actividad de TNF $\alpha$  es perjudicial” pretende incluir trastornos cutáneos y/o de las uñas y otros trastornos en los que se ha demostrado que la presencia de TNF-alfa en un sujeto que sufre el trastorno es, o se sospecha que es, responsable de la fisiopatología del trastorno o un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno, por ejemplo, psoriasis. Un ejemplo de un trastorno cutáneo que puede ser tratado usando la formulación de la invención es la psoriasis. En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar psoriasis en placas. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la psoriasis (Takematsu *et al.* (1989) *Arch Dermatol Res.*

40

281:398; Victor y Gottlieb (2002) *J Drugs Dermatol.* 1(3):264).

## 45 1. Psoriasis

**[0210]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen psoriasis, incluyendo sujetos que tienen psoriasis en placas. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la psoriasis (Takematsu *et al.* (1989) *Arch Dermatol Res.* 281:398; Victor y Gottlieb (2002) *J Drugs Dermatol.* 1(3):264). La psoriasis se describe como una inflamación cutánea (irritación y enrojecimiento) caracterizada por episodios frecuentes de enrojecimiento, prurito y engrosamiento, sequedad, escamas plateadas en la piel. En particular, se forman lesiones que implican alteraciones primarias y secundarias en la proliferación epidérmica, respuestas inflamatorias de la piel y una expresión de moléculas reguladoras tales como linfocinas y factores inflamatorios. La piel psoriásica se caracteriza morfológicamente por un aumento en la renovación de células epidérmicas, epidermis engrosada, queratinización anormal, infiltrados de células inflamatorias en la epidermis e infiltración de leucocitos polimorfonucleares y linfocitos en la capa epidérmica, produciendo un aumento en el ciclo de las células basales. La psoriasis a menudo implica a las uñas, que con frecuencia presentan formación de picaduras, separación de la uña, engrosamiento y decoloración. La psoriasis está asociada con frecuencia a otros trastornos inflamatorios, por ejemplo artritis, incluyendo la artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y enfermedad de Crohn.

50

55

**[0211]** La evidencia de la psoriasis se observa más comúnmente en el tronco, codos, rodillas, cuero cabelludo, pliegues de la piel o uñas de las manos, pero puede afectar cualquiera o todas las partes de la piel. Normalmente, necesita aproximadamente un mes para que las nuevas células de la piel se muevan desde las capas inferiores hacia la superficie. En la psoriasis, este proceso solo dura unos cuantos días, produciendo una acumulación de células cutáneas muertas y la formación de escamas gruesas. Los síntomas de la psoriasis incluyen: parches en la piel, que son secos o rojos, cubiertos con escamas plateadas, parches de elevaciones en la piel, acompañados por bordes rojos, que podrían romperse y volverse dolorosos, y que normalmente están localizados en los codos, rodillas, tronco, cuero cabelludo y manos; lesiones de la piel, incluyendo pústulas, agrietamiento de la piel y enrojecimiento de la piel; dolor de articulaciones o inflamación que puede estar asociada a artritis, por ejemplo, artritis psoriásica.

**[0212]** El tratamiento de la psoriasis incluye a menudo corticosteroides tópicos, análogos de la vitamina D y retinoides tópicos u orales, o combinaciones de los mismos. En una realización, el inhibidor de TNF-alfa de la invención se administra en combinación con, o en presencia de, uno de estos tratamientos comunes.

**[0213]** El diagnóstico de la psoriasis normalmente se basa en el aspecto de la piel. Adicionalmente, puede ser necesaria una biopsia de piel, o raspado y cultivo de parches de piel para excluir otros trastornos cutáneos. Pueden usarse rayos X para verificar la artritis psoriásica si se presenta dolor en articulaciones y es persistente.

**[0214]** En una realización de la invención, se usa un inhibidor de TNF-alfa para tratar la psoriasis, incluyendo psoriasis en placas crónica, psoriasis en gotas, psoriasis inversa, psoriasis pustular, psoriasis penfigosa, psoriasis eritrodérmica, psoriasis asociada a enfermedad inflamatoria del intestino (EII) y psoriasis asociada a artritis reumatoide (AR). Tipos específicos de la psoriasis incluidos en los métodos de tratamiento de la invención se describen en detalle a continuación:

a. Psoriasis en placas crónica

**[0215]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen psoriasis en placas crónica. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la psoriasis en placas crónica (Asadullah et al. (1999) Br J Dermatol. 141:94). La psoriasis en placas crónica (también denominada en lo sucesivo psoriasis vulgar) es la forma más común de la psoriasis. La psoriasis en placas crónica se caracteriza por parches de piel enrojecida elevados, que varían desde el tamaño de una moneda hasta mucho más grandes. En la psoriasis en placas crónica, las placas pueden ser una sola o múltiples, pueden variar en tamaño desde unos cuantos milímetros hasta varios centímetros. Las placas normalmente son de color rojo con una superficie descamada, y reflejan la luz cuando se rascan suavemente, creando un efecto "plateado". Las lesiones (que a menudo son simétricas) de la psoriasis en placas crónica ocurrirán en todo el cuerpo, pero con predilección en superficies extensoras, incluyendo las rodillas, codos, región lumbosacra, cuero cabelludo y uñas. Ocasionalmente puede presentarse psoriasis en placas crónica en el pene, vulva y zonas de flexión, pero la descamación normalmente está ausente. El diagnóstico de los pacientes con psoriasis en placas crónica normalmente se basa en las características clínicas anteriormente descritas. En particular, la distribución, el color y la típica descamación plateada de las lesiones en la psoriasis en placas crónica son características de la psoriasis en placas crónica.

b. Psoriasis en gotas

**[0216]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen psoriasis en gotas. Psoriasis en gotas se refiere a una forma de psoriasis con placas descamadas características con forma de gotas de agua. Las exacerbaciones de la psoriasis en gotas generalmente se siguen a una infección, más notablemente una infección faríngea por estreptococos. El diagnóstico de la psoriasis en gotas normalmente se basa en el aspecto de la piel, y el hecho de que a menudo hay un historial de faringitis reciente.

c. Psoriasis inversa

**[0217]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen psoriasis inversa. La psoriasis inversa es una forma de psoriasis en la que el paciente tiene áreas lisas, normalmente húmedas, de piel que están enrojecidas e inflamadas, que es diferente a la descamación asociada a la psoriasis en placas. La psoriasis inversa también se denomina en lo sucesivo psoriasis intertriginosa o psoriasis flexural. La psoriasis inversa ocurre en su mayoría en las axilas, ingle, bajo los senos y en otros pliegues de la piel alrededor de los genitales y nalgas, y como resultado de las localizaciones de la presentación, el roce y el sudor pueden irritar las

áreas afectadas.

d. Psoriasis pustular

5 **[0218]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen psoriasis pustular. La psoriasis pustular es una forma de psoriasis que causa ampollas llenas de pus que varían en tamaño y localización, pero que a menudo ocurren en las manos y pies. Las ampollas pueden estar localizadas, o dispersas sobre grandes áreas del cuerpo. La psoriasis pustular puede ser tanto sensible como dolorosa, y causar fiebre.

10 e. Otros trastornos psoriásicos

**[0219]** Otros ejemplos de trastornos psoriásicos que pueden ser tratados con las formulaciones de la invención incluyen psoriasis eritrodérmica, psoriasis vulgaris, psoriasis asociada a EII, y psoriasis asociada a artritis, incluyendo la artritis reumatoide.

15

2. Pénfigo vulgar

**[0220]** Las formulaciones de la invención pueden usarse en el tratamiento de sujetos que tienen pénfigo vulgar. El pénfigo vulgar es una enfermedad dermatológica autoinmunitaria sistémica grave que a menudo afecta la membrana mucosa oral y la piel. Se piensa que la patogénesis del pénfigo vulgar es un proceso autoinmunitario que está dirigido a los desmosomas de la piel y la membrana mucosa oral. En consecuencia, las células no se adhieren unas a otras. El trastorno se manifiesta como ampollas grandes llenas de líquido y propensas a la rotura, y tiene una apariencia histológica distintiva. Los agentes antiinflamatorios son la única terapia efectiva para esta enfermedad, que tiene un alto índice de mortalidad. Las complicaciones que surgen en los pacientes que sufren pénfigo vulgar son dolor intratable, interferencia con la nutrición y pérdida de fluido, e infecciones.

25

3. Dermatitis atópica/eccema

**[0221]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen dermatitis atópica. La dermatitis atópica (también denominada en lo sucesivo eccema) es un trastorno de la piel crónico, caracterizado por placas descamadas y que dan comezón. Las personas con eccema a menudo tienen un historial familiar de afecciones alérgicas, tales como asma, fiebre del heno o eccema. La dermatitis atópica es una reacción de hipersensibilidad (similar a una alergia) que ocurre en la piel, causando inflamación crónica. La inflamación hace que la piel presente comezón y se empiece a descamar. La irritación crónica y rascarse pueden causar que la piel se engrose y presente una textura de cuero. La exposición a irritantes ambientales puede empeorar los síntomas, al igual que la sequedad de la piel, exposición al agua, cambios de temperatura y estrés.

35

**[0222]** Los sujetos con dermatitis atópica pueden ser identificados por ciertos síntomas, que a menudo incluyen comezón intensa, ampollas con supuración y formación de costras, enrojecimiento de la piel o inflamación alrededor de las ampollas, erupciones, resequedad, áreas de piel con textura de cuero, áreas de piel desnuda por rascarse, y supuración óptica/sangrado.

40

4. Sarcoidosis

45 **[0223]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen sarcoidosis. La sarcoidosis es una enfermedad en la que ocurre una inflamación granulomatosa en los ganglios linfáticos, pulmones, hígado, ojos, piel y/u otros tejidos. La sarcoidosis incluye sarcoidosis cutánea (sarcoidosis de la piel) y sarcoidosis nodular (sarcoidosis de los ganglios linfáticos). Los pacientes con sarcoidosis pueden identificarse por los síntomas, que a menudo incluyen malestar general, ansiedad o un sentimiento de estar enfermo; fiebre; lesiones de la piel.

50

5. Eritema nodoso

**[0224]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen eritema nodoso. Eritema nodoso se refiere a un trastorno inflamatorio que está caracterizado por nódulos enrojecidos sensibles bajo la piel, normalmente en la parte anterior baja de las piernas. Las lesiones asociadas al eritema nodoso con frecuencia empiezan como bultos dolorosos aplanados pero firmes, rojos y calientes (aproximadamente una pulgada de diámetro). Después de unos cuantos días, las lesiones pueden tornar a púrpura, y después de varias semanas desvanecen a un parche plano parduzco.

55

**[0225]** En algunos casos, el eritema nodoso puede estar asociado a infecciones que incluyen estreptococos, coccidioidomicosis, tuberculosis, hepatitis B, sífilis, enfermedad de rasguño de gato, tularemia, yersinia, leptospirosis, psitacosis, histoplasmosis, mononucleosis (VEB). En otros casos, el eritema nodoso puede estar asociado a sensibilidad a ciertos medicamentos que incluyen anticonceptivos orales, penicilina, sulfonamidas, sulfonas, barbituratos, hidantoína, fenacetina, salicilatos, yoduros y progestina. El eritema nodoso a menudo está asociado a otros trastornos que incluyen leucemia, sarcoidosis, fiebre reumática y colitis ulcerosa.

**[0226]** Los síntomas del eritema nodoso normalmente se presentan en las espinillas, pero pueden ocurrir lesiones en otras áreas del cuerpo, incluyendo las nalgas, pantorrillas, tobillos, muslos y extremidades superiores. Otros síntomas en sujetos con eritema nodoso pueden incluir fiebre y malestar general.

#### 6. Hidradenitis supurativa

**[0227]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen hidradenitis supurativa. Hidradenitis supurativa se refiere a un trastorno de la piel en el que se desarrollan lesiones o bultos hinchados, inflamados, dolorosos, en la ingle y a veces bajo los brazos y bajo los senos. La hidradenitis supurativa ocurre cuando las salidas de las glándulas apocrinas son bloqueadas por la transpiración o son incapaces de drenar normalmente debido al desarrollo incompleto de las glándulas. Las secreciones atrapadas en las glándulas obligan a la transpiración y las bacterias a diseminarse al tejido circundante, causando induración subcutánea, inflamación e infección. La hidradenitis supurativa está confinada a áreas del cuerpo que contienen glándulas apocrinas. Estas áreas son las axilas, la areola de los pezones, la ingle, el perineo, la región circunanal y periumbilical.

#### 7. Liquen plano

**[0228]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen liquen plano. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología del liquen plano (Sklavounou et al. (2000) J Oral Pathol Med. 29:370). Liquen plano se refiere a un trastorno de la piel y las membranas mucosas que produce inflamación, comezón y lesiones cutáneas distintivas. El liquen plano puede asociarse a la hepatitis C o a ciertos medicamentos.

#### 8. Síndrome de Sweet

**[0229]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen síndrome de Sweet. Las citosinas inflamatorias, incluyendo el factor de necrosis tumoral, han sido implicados en la fisiopatología del síndrome de Sweet (Reuss-Borst et al. (1993) Br J Haematol. 84:356). El síndrome de Sweet, que fue descrito por R. D. Sweet en 1964, está caracterizado por la aparición repentina de fiebre, leucocitosis y erupción cutánea. La erupción consiste en pápulas y placas sensibles, eritematosas, bien demarcadas, que muestran infiltrados neutrofilicos denso microscópicamente. Las lesiones pueden aparecer en cualquier lugar, pero favorecen la porción superior del cuerpo, incluyendo el rostro. Las lesiones individuales a menudo se describen como pseudovesiculares o pseudopustulares, pero pueden ser francamente pustulares, ampollosas o ulcerativas. También se ha informado con frecuencia de la participación oral y de los ojos (conjuntivitis o epiescleritis) en pacientes con síndrome de Sweet. La leucemia también se ha asociado al síndrome de Sweet.

#### 9. Vitíligo

**[0230]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen vitíligo. Vitíligo se refiere a una afección de la piel en la que hay pérdida de pigmento de áreas de la piel, produciendo parches blancos irregulares con textura de piel normal. Las lesiones características del vitíligo aparecen como áreas planas despigmentadas. Los bordes de las lesiones están bien definidos, pero son irregulares. Las áreas frecuentemente afectadas en sujetos con vitíligo incluyen el rostro, los codos y las rodillas, manos y pies, y los genitales.

#### 10. Esclerodermia

**[0231]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen esclerodermia. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la esclerodermia (Tutuncu Z et al. (2002) Clin Exp Rheumatol. 20(6 Suppl 28):S146-51; Mackiewicz Z et al. (2003) Clin Exp Rheumatol. 21(1):41-8; Murota H et al. (2003) Arthritis Rheum. 48(4):1117-25). Esclerodermia se refiere a una enfermedad difusa de tejido conjuntivo, caracterizada por cambios en la piel, vasos sanguíneos, músculos esqueléticos y órganos internos. La esclerodermia también se refiere como síndrome de CREST o esclerosis sistémica progresiva, y normalmente afecta a personas entre las edades de 30-50. Las mujeres son afectadas más frecuentemente que los hombres.

**[0232]** La causa de la esclerodermia es desconocida. La enfermedad puede producir síntomas locales o sistémicos. El curso y la gravedad de la enfermedad varían ampliamente en los afectados. Un exceso de depósitos de colágeno en la piel y otros órganos producen los síntomas. También ocurre daño a los vasos sanguíneos pequeños en la piel y los órganos afectados. En la piel, puede ocurrir ulceración, calcificación y cambios en la pigmentación. Las características sistémicas pueden incluir fibrosis y degeneración del corazón, pulmones, riñones y tubo gastrointestinal.

**[0233]** Los pacientes que sufren esclerodermia presentan ciertas características clínicas, incluyendo palidez, coloración azulada o enrojecimiento de los dedos de las manos y los pies en respuesta al calor y al frío (fenómeno de Raynaud), dolor, rigidez e inflamación de los dedos y articulaciones, engrosamiento de la piel y manos y antebrazos brillantes, reflujo esofágico o pirosis, dificultad para tragar y falta de aliento. Otros síntomas clínicos usados para diagnosticar la esclerodermia incluyen una elevada velocidad de sedimentación de eritrocitos (VSG), un elevado factor reumatoide (FR), una prueba de anticuerpo antinucleares positiva, análisis de orina que muestra proteína y sangre microscópica, una radiografía de tórax que puede mostrar fibrosis y estudios de la función pulmonar que muestran enfermedad pulmonar restrictiva.

#### 11. Trastornos de las uñas

**[0234]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen un trastorno de las uñas. Los trastornos de las uñas incluyen cualquier anomalía de la uña. Trastornos de las uñas específicos incluyen, pero no se limitan a, formación de picaduras, coiloniquia, líneas de Beau, uñas en cuchara, onicolisis, uñas amarillas, pterigión (véase en liquen plano) y leuconiquia. La formación de picaduras se caracteriza por la presencia de pequeñas depresiones en la superficie de la uña. Pueden desarrollarse elevaciones rugosas o lineares a lo largo de la uña produciéndose en una dirección “a lo largo” o “a lo ancho”. Las líneas de Beau son depresiones lineales que ocurren “a lo ancho” (transversas) en la uña. La leuconiquia describe estrías blancas o manchas en las uñas. La coiloniquia es una forma anormal de la uña de la mano, donde la uña tiene bordes elevados y es delgada y cóncava. La coiloniquia algunas veces está asociada a la deficiencia de hierro.

**[0235]** Los trastornos de las uñas que pueden ser tratados con el anticuerpo anti-TNF-alfa de la invención también incluyen uñas psoriásicas. Las uñas psoriásicas incluyen cambios en las uñas que son atribuibles a la psoriasis. En algunos casos, la psoriasis puede ocurrir solamente en las uñas y en ningún otro lado del cuerpo. Los cambios psoriásicos en las uñas varían de leves a graves, reflejando generalmente el grado de la participación psoriásica de la placa ungueal, la matriz de la uña; es decir, tejido a partir del que la uña crece, lecho ungueal, es decir, tejido debajo la uña, y piel en la base de la uña. El daño al lecho ungueal por el tipo pustular de la psoriasis puede producir la pérdida de la uña. Los cambios en las uñas en la psoriasis se clasifican en categorías generales que pueden ocurrir por sí solos o juntos. En una categoría de uñas psoriásicas, la placa ungueal está profundamente picada, probablemente debido a defectos en el crecimiento de las uñas causados por la psoriasis. En otra categoría, la uña tiene una decoloración amarilla o amarillo-rosácea, probablemente debido a la participación psoriásica en el lecho ungueal. Un tercer subtipo de uñas psoriásicas se caracteriza por áreas blancas que aparecen bajo la placa ungueal. Las áreas blancas son en realidad burbujas de aire que marcan puntos donde la placa ungueal se está desprendiendo del lecho ungueal. También pueden ser piel enrojecida alrededor de la uña. Una cuarta categoría se evidencia por el desmoronamiento de la placa ungueal en parches amarillentos, es decir, onicodistrofia, probablemente debida a la participación psoriásica en la matriz ungueal. Una quinta categoría se caracteriza por la pérdida de la uña en su totalidad debida a la participación psoriásica de la matriz ungueal y el lecho ungueal.

**[0236]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar trastornos de las uñas a menudo asociados a liquen plano. Las uñas en sujetos con liquen plano a menudo muestran adelgazamiento y rugosidad de la superficie de la placa ungueal con bordes longitudinales o pterigión.

**[0237]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar trastornos de las uñas, tales como aquellos descritos en el presente documento. A menudo los trastornos de las uñas están asociados a trastornos de la piel. En un caso, la divulgación incluye un método de tratamiento para trastornos de las uñas con un anticuerpo contra TNF-alfa. En una realización, el trastorno de las uñas está asociado a otro trastorno, incluyendo un trastorno de la piel, tal como la psoriasis. En otra realización, el trastorno asociado a un trastorno de las uñas es la artritis, incluyendo la artritis psoriásica.

#### **[0238]** 12. Otros trastornos de la piel y las uñas

**[0239]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar otros trastornos de la piel y las uñas, tales como dermatitis actínica crónica, penfigoide ampolloso y alopecia areata. La dermatitis actínica crónica (CAD) también se refiere como dermatitis por fotosensibilidad/síndrome reticuloide actínico (PD/AR). La CAD es una afección en la que la piel se inflama, particularmente en áreas que han sido expuestas a la luz solar o luz artificial. Comúnmente, los pacientes con CAD tienen alergias a ciertas sustancias que entran en contacto con su piel, particularmente varias flores, maderas, perfumes, protectores solares y compuestos de goma. Penfigoide ampolloso se refiere a un trastorno de la piel caracterizado por la formación de ampollas grandes en el tronco y las extremidades. Alopecia areata se refiere a la pérdida de cabello caracterizada por parches redondos de calvicie completa en el cuero cabelludo o la barba.

10

#### K. Trastornos metabólicos

**[0240]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar una enfermedad metabólica. El  $TNF\alpha$  ha sido implicado en la fisiopatología de una amplia variedad de trastornos, incluyendo trastornos metabólicos, tales como la diabetes y la obesidad (Spiegelman y Hotamisligil (1993) Cell 73:625; Chu et al. (2000) Int J Obes Relat Metab Disord. 24: 1085; Ishii et al. (2000) Metabolism. 49: 1616).

**[0241]** Los trastornos metabólicos afectan cómo el cuerpo procesa las sustancias necesarias para llevar a cabo las funciones fisiológicas. Varios trastornos metabólicos comparten ciertas características, es decir, están asociados a la resistencia a la insulina, la falta de capacidad para regular el azúcar en sangre, aumento de peso y aumento en el índice de masa corporal. Ejemplos de trastornos metabólicos incluyen la diabetes y la obesidad. Ejemplos de diabetes incluyen diabetes mellitus tipo 1, diabetes mellitus tipo 2, neuropatía diabética, neuropatía periférica, retinopatía diabética, ulceraciones diabéticas, ulceraciones por retinopatía, macrovasculopatía diabética y obesidad. Ejemplos de trastornos metabólicos que pueden ser tratados con las formulaciones de la invención se describen en mayor detalle a continuación:

##### 1. Diabetes

**[0242]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar la diabetes. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la diabetes (véase, por ejemplo, Navarro J.F., Mora C, Maca, Am J Kidney Dis. 2003 Jul; 42(1):53-61; Daimon M et al., Diabetes Care. 2003 Jul; 26(7):2015- 20; Zhang M et al., J Tongji Med Univ. 1999;19(3):203-5, Barbieri M et al., Am J Hypertens. 2003 Jul; 16(7):537-43). Por ejemplo, el  $TNF\alpha$  está implicado en la fisiopatología de la resistencia a la insulina. Se ha encontrado que los niveles de TNF en suero en los pacientes con cáncer gastrointestinal se correlaciona con la resistencia a la insulina (véase, por ejemplo, McCall, J. et al. Br. J. Surg. 1992; 79: 1361-3).

**[0243]** La diabetes incluyen los dos tipos más comunes del trastorno, concretamente la diabetes tipo I y la diabetes tipo II, que son ambas el resultado de la incapacidad del cuerpo para regular la insulina. La insulina es una hormona liberada por el páncreas en respuesta a niveles elevados de azúcar en sangre (glucosa) en la sangre.

40

**[0244]** El término "diabetes tipo 1", como se usa en el presente documento, se refiere a la enfermedad crónica que ocurre cuando el páncreas produce muy poca insulina como para regular apropiadamente los niveles de azúcar en sangre. La diabetes tipo 1 también se refiere como diabetes mellitus insulino-dependiente, DMID, diabetes juvenil y diabetes tipo I. La diabetes tipo 1 representa el resultado de una destrucción autoinmunitaria progresiva de las células  $\beta$  pancreáticas, con la posterior deficiencia de insulina.

**[0245]** El término "diabetes tipo 2" se refiere a una enfermedad crónica que ocurre cuando el páncreas no produce suficiente insulina como para mantener normales los niveles de glucosa en sangre, a menudo debido a que el cuerpo no responde bien a la insulina. La diabetes tipo 2 también se refiere como diabetes mellitus no insulino-dependiente, DMNID y diabetes tipo II.

**[0246]** La diabetes puede ser diagnosticada mediante la administración de una prueba de tolerancia a la glucosa. Clínicamente, la diabetes a menudo se divide en varias categorías básicas. Los principales ejemplos de estas categorías incluyen la diabetes mellitus autoinmunitaria, diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID tipo 1), diabetes mellitus insulino-dependiente (DMID tipo 2), diabetes mellitus no autoinmunitaria, diabetes mellitus no insulino-dependiente (DMNID tipo 2) y diabetes juvenil de aparición en la madurez (MODY). Otra categoría, a menudo denominada en lo sucesivo secundaria, se refiere a la diabetes que surge por alguna afección identificable que causa o permite que se desarrolle un síndrome diabético. Ejemplos de categorías secundarias incluyen la diabetes causada por enfermedad pancreática, anomalías hormonales, diabetes inducida por fármacos o sustancias

55

químicas, diabetes causada por anomalías de los receptores de la insulina, diabetes asociada a síndromes genéticos y diabetes de otras causas (véase, por ejemplo, Harrison's (1996) 14<sup>th</sup> ed., Nueva York, McGraw-Hill).

5 **[0247]** La diabetes se manifiesta por sí misma en las categorías anteriores y puede causar varias complicaciones que se tratan en las siguientes secciones. Por consiguiente, el anticuerpo, o fragmento de unión al antígeno del mismo, de la divulgación puede usarse para tratar la diabetes. En un caso, el anticuerpo contra TNF $\alpha$ , o fragmento de unión al antígeno del mismo, de la divulgación se usa para tratar la diabetes asociada a las categorías anteriormente identificadas.

10

**[0248]** La diabetes a menudo se trata con dieta, dosis de insulina y varios medicamentos descritos en el presente documento. Por consiguiente, las formulaciones de la invención también pueden administrarse en combinación con agentes comúnmente usados para tratar trastornos metabólicos y dolor comúnmente asociado a la diabetes.

15

**[0249]** La diabetes se manifiesta por sí misma en muchas complicaciones y afecciones asociadas a la diabetes, incluyendo las siguientes categorías:

a. Neuropatía diabética y Neuropatía periférica

20

**[0250]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar neuropatía diabética o neuropatía periférica. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la neuropatía diabética y la neuropatía periférica (véase Benjafield et al. (2001) Diabetes Care. 24:753; Qiang, X. et al. (1998) Diabetologia 41:1321-6; Pfeiffer et al. (1997) Horm Metab Res. 29:111).

25

**[0251]** El término "neuropatía", también denominado en lo sucesivo daño nervioso-diabético, como se usa en el presente documento, se refiere a una complicación común de la diabetes en la que se dañan nervios como resultado de la hiperglucemia (altos niveles de azúcar en sangre). Se reconocen una variedad de neuropatías diabéticas, tales como la polineuropatía sensoriomotora distal, la neuropatía motora focal y la neuropatía autónoma.

30

**[0252]** El término "neuropatía periférica", también conocido como neuritis periférica y neuropatía diabética, como se usa en el presente documento, se refiere al fallo de los nervios en transportar información hacia y desde el cerebro y la columna vertebral. La neuropatía periférica produce síntomas tales como dolor, pérdida de sensación, y la incapacidad de controlar los músculos. En algunos casos, el fallo de los nervios en controlar vasos sanguíneos, la función intestinal y otros órganos produce tensión arterial anormal, digestión anormal y pérdida de otros procesos involuntarios básicos. La neuropatía periférica puede implicar daño a un solo nervio o a un grupo de nervios (mononeuropatía), o puede afectar múltiples nervios (polineuropatía).

35

**[0253]** Las neuropatías que afectan pequeñas fibras mielinizadas y no mielinizadas de los nervios simpáticos y parasimpáticos se conocen como "neuropatías periféricas". Además, el trastorno relacionado de la neuropatía periférica, también conocido como neuritis periférica y neuropatía diabética, se refiere al fallo de los nervios en transportar información desde y hacia el cerebro y la columna vertebral. Esto produce síntomas tales como dolor, pérdida de sensación, y la incapacidad de controlar músculos. En algunos casos, el fallo de los nervios en controlar vasos sanguíneos, la función intestinal y otros órganos produce tensión arterial anormal, digestión anormal y pérdida de otros procesos involuntarios básicos. La neuropatía periférica puede implicar daño a un solo nervio o a un grupo de nervios (mononeuropatía), o puede afectar múltiples nervios (polineuropatía).

45

**[0254]** El término "neuropatía diabética" se refiere a una complicación común de la diabetes en la que se dañan nervios como resultado de la hiperglucemia (altos niveles de azúcar en sangre). La neuropatía diabética también se denomina en lo sucesivo neuropatía y daño nervioso-diabético. Se reconocen una variedad de neuropatías diabéticas, tales como la polineuropatía sensoriomotora distal, la neuropatía motora focal y la neuropatía autónoma.

50

b. Retinopatía diabética

55

**[0255]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar la retinopatía diabética. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la retinopatía diabética (Scholz et al. (2003) Trends Microbiol. 11:171). El término "retinopatía diabética", como se usa en el presente documento, se refiere al daño progresivo de la retina del ojo causado por la diabetes a largo plazo. La retinopatía diabética induce retinopatía

proliferativa. La neuropatía proliferativa incluye, a su vez, neovascularización, hemorragia prerretiniana y desprendimiento de retina.

**[0256]** En la retinopatía avanzada, pequeños vasos sanguíneos proliferan en la superficie de la retina. Estos vasos sanguíneos son frágiles, tienden a sangrar y pueden causar hemorragias prerretinianas. La hemorragia puede oscurecer la visión, y como la hemorragia es tejido fibroso reabsorbido, forma predisposición a desprendimientos de retina y pérdida de la vista. Además, la retinopatía diabética incluye la retinopatía proliferativa, que incluye neovascularización, hemorragia prerretiniana y desprendimiento de retina. La retinopatía diabética también incluye la “retinopatía de fondo”, que implica cambios que ocurren con las capas de la retina.

10

c. Ulceraciones diabéticas y ulceraciones por retinopatía

**[0257]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar ulceraciones diabéticas o ulceraciones por retinopatía. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de las ulceraciones diabéticas (véase Lee et al. (2003) *Hum Immunol.* 64:614; Navarro et al. (2003) *Am J Kidney Dis.* 42:53; Daimon et al. (2003) *Diabetes Care.* 26:2015; Zhang et al. (1999) *J Tongji Med Univ.* 19:203; Barbieri et al. (2003) *Am J Hypertens.* 16:537; Venn et al. (1993) *Arthritis Rheum.* 36:819; Westacott et al. (1994) *J Rheumatol.* 21:1710).

15

**[0258]** El término “ulceraciones diabéticas”, como se usa en el presente documento, se refiere a una úlcera que resulta de una complicación de la diabetes. Una úlcera es una lesión similar a un cráter en la piel o membrana mucosa causada por una afección inflamatoria, infecciosa, maligna, o trastorno metabólico. Normalmente, las úlceras diabéticas pueden encontrarse en los miembros y extremidades, más normalmente los pies. Estas úlceras, causadas por afecciones diabéticas, tales como la neuropatía y una insuficiencia vascular, pueden conducir a isquemia y mala cicatrización. Las ulceraciones más extensas pueden progresar a osteomielitis. Una vez se desarrolla la osteomielitis, puede ser difícil de erradicar con antibióticos solos y puede ser necesaria la amputación.

20

25

**[0259]** El término “ulceraciones por retinopatía”, como se usa en el presente documento, se refiere a una úlcera que causa o produce daños al ojo y la retina del ojo. Las ulceraciones por retinopatía pueden incluir afecciones tales como hemorragias por retinopatía.

30

d. Macrovasculopatía diabética

**[0260]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar macrovasculopatía diabética. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la macrovasculopatía diabética (Devaraj et al. (2000) *Circulation.* 102:191; Hattori Y et al. (2000) *Cardiovasc Res.* 46:188; Clausell N et al. (1999) *Cardiovasc Pathol.* 8:145). El término “macrovasculopatía diabética”, también denominada en lo sucesivo “enfermedad macrovascular”, como se usa en el presente documento, se refiere a una enfermedad de los vasos sanguíneos que resulta de la diabetes. La complicación de la macrovasculopatía diabética ocurre cuando, por ejemplo, grasa y coágulos de sangre se acumulan en los vasos sanguíneos grandes y se adhieren a las paredes de los vasos. Las macrovasculopatías diabéticas incluyen enfermedades tales como enfermedad coronaria, enfermedad cerebrovascular y enfermedad vascular periférica, hiperglucemia y enfermedad cardiovascular, y accidentes cerebrovasculares.

35

40

2. Obesidad

45

**[0261]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar la obesidad. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la obesidad (véase, por ejemplo, Pihlajamaki J et al. (2003) *Obes Res.* 11:912; Barbieri et al. (2003) *Am J Hypertens.* 16:537; Tsuda et al. (2003) *J Nutr.* 133:2125). La obesidad aumenta el riesgo de una persona de enfermedad y muerte debidas a diabetes, accidente cerebrovascular, enfermedad de las arterias coronarias, hipertensión, colesterol alto, y trastornos renales y de la vejiga. La obesidad también puede aumentar el riesgo de algunos tipos de cáncer, y puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de osteoartritis y apnea del sueño. La obesidad puede ser tratada con el anticuerpo de la invención solo o en combinación con otros trastornos metabólicos, incluyendo la diabetes.

50

55 L. Vasculitis

**[0262]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar un sujeto que tiene una vasculitis. El TNF $\alpha$  ha sido implicado en la fisiopatología de una variedad de vasculitis (véase, por ejemplo, Deguchi et al. (1989) *Lancet.* 2:745). Como se usa en el presente documento, el término “una vasculitis en la que la actividad de TNF $\alpha$  es

perjudicial” pretende incluir vasculitis en las que se ha demostrado que la presencia de  $TNF\alpha$  en un sujeto que sufre el trastorno es, o se sospecha que es, tanto responsable de la fisiopatología de la enfermedad, como un factor que contribuye a un empeoramiento del trastorno. Tales trastornos pueden ser evidenciados, por ejemplo, por un aumento en la concentración de  $TNF\alpha$  en un fluido biológico de un sujeto que sufre el trastorno (por ejemplo, un aumento en la concentración de  $TNF\alpha$  en suero, plasma, líquido sinovial, etc., del sujeto), que puede ser detectado, por ejemplo, usando un anticuerpo anti- $TNF\alpha$  como se describió anteriormente.

**[0263]** Existen numerosos ejemplos de vasculitis en las que la actividad de  $TNF\alpha$  es perjudicial, incluyendo la enfermedad de Behcet. El uso de las formulaciones de la invención en el tratamiento de vasculitis específicas se trata adicionalmente a continuación. En ciertos casos, el anticuerpo o porción de anticuerpo se administra al sujeto en combinación con otro agente terapéutico, como se describirá más adelante.

**[0264]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar la vasculitis en la que la actividad de  $TNF\alpha$  es perjudicial, en la que la inhibición de la actividad de  $TNF\alpha$  se espera que alivie los síntomas y/o la progresión de la vasculitis, o prevenga la vasculitis. Los sujetos que sufren vasculitis o están en riesgo de desarrollar vasculitis pueden ser identificados mediante síntomas clínicos y pruebas. Por ejemplo, los sujetos con vasculitis a menudo desarrollan anticuerpos contra ciertas proteínas en el citoplasma de neutrófilos, anticuerpos citoplásmicos antineutrófilicos (ANCA). Así pues, en algunos casos, las vasculitis pueden ser evidenciadas por pruebas (por ejemplo, ELISA) que miden la presencia de ANCA.

**[0265]** La vasculitis y sus consecuencias pueden ser la única manifestación de la enfermedad o podrían ser un componente secundario de otra enfermedad primaria. La vasculitis puede estar confinada a un único órgano o podría afectar simultáneamente varios órganos y, dependiendo del síndrome, pueden afectarse arterias y venas de todos los tamaños. Las vasculitis pueden afectar cualquier órgano en el cuerpo.

**[0266]** En la vasculitis, la luz del vaso normalmente está comprometida, que está asociado a isquemia de los tejidos suministrados por el vaso implicado. La amplia variedad de trastornos que podrían resultar de este proceso es debida al hecho de que puede estar implicado cualquier tipo, tamaño y localización del vaso (por ejemplo, arteria, vena, arteriola, vénula, capilar). Las vasculitis generalmente se clasifican según el tamaño de los vasos afectados, como se describe más adelante. Debe observarse que algunas vasculitis de vasos pequeños y grandes pueden implicar a arterias de tamaño mediano; pero las vasculitis de vasos de tamaño grande y mediano no implican a vasos más pequeños que las arterias. La enfermedad de vasos grandes incluye, pero no se limita a, arteritis de células gigantes, también conocida como arteritis temporal o arteritis craneal, polimialgia reumática, y enfermedad o arteritis de Takayasu, que también se conoce como síndrome del arco aórtico, arteritis juvenil femenina y enfermedad sin pulso. La enfermedad de vasos medianos incluye, pero no se limita a, poliarteritis nodosa clásica y enfermedad de Kawasaki, también conocida como síndrome de ganglios linfáticos mucocutáneos. Ejemplos no limitantes de la enfermedad de vasos pequeños son el síndrome de Behcet, la granulomatosis de Wegener, la poliangeitis microscópica, la vasculitis por hipersensibilidad, también conocida como vasculitis cutánea, vasculitis de vasos pequeños, púrpura de Henoch-Schönlein, granulomatosis alérgica y vasculitis, también conocida como síndrome de Churg Strauss. Otras vasculitis incluyen, pero no se limitan a, vasculitis del sistema nervioso central aisladas y tromboangeítis obliterante, también conocida como enfermedad de Buerger. La poliarteritis nodosa clásica (PAN), la PAN microscópica y la granulomatosis alérgica a menudo también se agrupan juntas y se llaman las vasculitis necrosantes sistémicas. Una descripción adicional de las vasculitis se describe a continuación:

#### 45 1. Vasculitis de vasos grandes

**[0267]** En una realización, las formulaciones de la invención se usan para tratar sujetos que tienen vasculitis de vasos grandes. El término “vaso(s) grande(s)”, como se usa en el presente documento, se refiere a la aorta y las ramificaciones más grandes dirigidas hacia las principales regiones del cuerpo. Los vasos grandes incluyen, por ejemplo, la aorta y sus ramificaciones y venas correspondientes, por ejemplo la arteria subclavia, la arteria braquiocefálica; la arteria carótida común; la vena innominada; las venas yugulares interna y externa; las arterias y venas pulmonares; la vena cava; las arterias y venas renales; las arterias y venas femorales; y las arterias carótidas. A continuación se describen ejemplos de vasculitis de vasos grandes.

#### 55 a. Arteritis de células gigantes (ACG)

**[0268]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar la arteritis de células gigantes. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la arteritis de células gigantes (Sneller, M.C. (2002) Cleve. Clin. J. Med. 69:SII40-3; Schett, G., et al. (2002) Ann. Rheum. Dis. 61:463). La arteritis de células gigantes

(ACG) se refiere a una vasculitis que implica inflamación y daño a vasos sanguíneos, particularmente las arterias grandes o medianas que se ramifican desde la arteria carótida externa del cuello. La ACG también se denomina en lo sucesivo arteritis temporal o arteritis craneal, y es la vasculitis primaria más común en los ancianos. Afecta casi exclusivamente a individuos mayores de 50 años de edad, sin embargo, hay casos bien documentados de pacientes de 40 años y más jóvenes. La ACG normalmente afecta las arterias extracraneales. La ACG puede afectar las ramificaciones de las arterias carótidas, incluyendo la arteria temporal. La ACG también es una enfermedad sistémica que puede implicar a arterias en múltiples localizaciones.

**[0269]** Histopatológicamente, la ACG es una panarteritis con infiltrados de células mononucleares inflamatorias en la pared de los vasos con formación frecuente de células gigantes de tipo Langerhans. Existe proliferación de la íntima, inflamación granulomatosa y fragmentación de la lámina elástica interna. Los hallazgos patológicos en órganos son el resultado de la isquemia relacionada con los vasos implicados.

**[0270]** Los pacientes que sufren ACG presentan ciertos síntomas clínicos, incluyendo fiebre, cefalea, anemia y alta velocidad de sedimentación de eritrocitos (VSG). Otras indicaciones típicas de la ACG incluyen claudicación de la quijada o lengua, hipersensibilidad del cuero cabelludo, síndrome constitucional, edema del disco óptico pálido (particularmente edema "lechoso" del disco óptico) y alteraciones de la visión. El diagnóstico se confirma por biopsia de la arteria temporal.

#### b. Polimialgia reumática

**[0271]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar la polimialgia reumática. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la polimialgia reumática (Straub, R.H., *et al.* (2002) *Rheumatology (Oxford)* 41:423; Uddhammar, A., *et al.* (1998) *Br. J. Rheumatol.* 37:766). Polimialgia reumática se refiere a un trastorno reumático que está asociado a dolor muscular de moderado a intenso y rigidez en el cuello, hombro y cadera, más notable por la mañana. También se ha detectado expresión de IL-6 e IL-1 $\beta$  en una mayoría de los monocitos circulantes en pacientes con polimialgia reumática. La polimialgia reumática puede ocurrir de manera independiente, o puede coexistir con o preceder a la ACG, que es una inflamación de los vasos sanguíneos.

#### c. Arteritis de Takayasu

**[0272]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar la arteritis de Takayasu. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la arteritis de Takayasu (Kobayashi, Y. y Numano, F. (2002) *Intern. Med.* 41:44; Fraga, A. y Medina F. (2002) *Curr. Rheumatol. Rep.* 4:30). Arteritis de Takayasu se refiere a una vasculitis caracterizada por una inflamación de la aorta y sus principales ramificaciones. La arteritis de Takayasu (también conocida como síndrome del arco aórtico, arteritis juvenil femenina y enfermedad sin pulso) afecta la aorta torácica y abdominal y sus principales ramificaciones, o las arterias pulmonares. El engrosamiento fibrótico de la pared aórtica y sus ramificaciones (por ejemplo, las arterias carótida, innominada y subclavia) puede conducir a la reducción del tamaño de la luz de los vasos que surgen desde el arco aórtico. Esta afección también afecta normalmente las arterias renales.

**[0273]** La arteritis de Takayasu afecta principalmente a mujeres jóvenes, normalmente de 20-40 años de edad, particularmente de origen asiático, y puede manifestarse por malestar general, artralgias y la aparición gradual de claudicación de extremidades. La mayoría de las pacientes padece pulsos asimétricamente reducidos, normalmente junto con un diferencial de la tensión arterial en los brazos. Puede ocurrir estenosis de las arterias coronarias y/o renales.

**[0274]** Las características clínicas de la arteritis de Takayasu pueden dividirse en las características de la enfermedad inflamatoria temprana y las características de la enfermedad tardía. Las características clínicas de la etapa inflamatoria temprana de la enfermedad de Takayasu son: malestar general, febrícula, pérdida de peso, mialgia, artralgia y eritema multiforme. Las etapas tardías de la enfermedad de Takayasu, se caracterizan por estenosis fibrótica de arterias y trombosis. Las principales características clínicas resultantes son fenómenos isquémicos, por ejemplo, pulsos arteriales débiles y asimétricos, discrepancia de la tensión arterial entre los brazos, alteración visual, por ejemplo escotoma y hemianopsia, otras características neurológicas que incluyen vértigo y síncope, hemiparesia o accidente cerebrovascular. Las características clínicas resultan de la isquemia debida a la estenosis y trombosis arterial.

#### 2. Enfermedad de vasos medianos

**[0275]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar sujetos que tienen vasculitis de vasos

medianos. El término “vaso(s) mediano(s)” se usa para referirse a aquellos vasos sanguíneos que son las principales arterias viscerales. Ejemplos de vasos medianos incluyen las arterias y venas mesentéricas, las arterias y venas ilíacas, y las arterias y venas maxilares. A continuación se describen ejemplos de vasculitis de vasos medianos,

5 a. Poliarteritis nodosa

10 **[0276]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar la poliarteritis nodosa. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la poliarteritis nodosa (DiGirolamo, N., et al. (1997) J. Leukoc. Biol. 61:667). La poliarteritis nodosa, o periarteritis nodosa, se refiere a una vasculitis que es una enfermedad de vasos sanguíneos grave en la que arterias de tamaño pequeño y mediano se inflaman y se dañan debido a que son atacadas por células inmunes solitarias. La poliarteritis nodosa normalmente afecta a los adultos con más frecuencia que a los niños. Daña los tejidos abastecidos por las arterias afectadas debido a que no reciben oxígeno y nutrientes suficientes sin un suministro apropiado de sangre.

15 **[0277]** Los síntomas que presentan los pacientes con poliarteritis nodosa generalmente resultan de daño a los órganos afectados, a menudo la piel, el corazón, los riñones y el sistema nervioso. Los síntomas generalizados de la poliarteritis nodosa incluyen fiebre, fatiga, debilidad, pérdida de apetito y pérdida de peso. Son comunes los dolores musculares (mialgia) y los dolores de articulaciones (artralgia). La piel de los sujetos con poliarteritis nodosa también puede mostrar erupciones, inflamación, úlceras y abultamientos (lesiones nodulares).

20 **[0278]** La PAN (poliarteritis nodosa) clásica es una arteritis sistémica de arterias musculares de pequeñas a medianas, en la que es común la participación de arterias renales y viscerales. Los vasos abdominales tienen aneurismas u oclusiones en el 50 % de los pacientes con PAN. La PAN clásica no implica a las arterias pulmonares, aunque podrían estar implicados los vasos bronquiales. Los granulomas y una significativa eosinofilia y una diátesis alérgica no son parte del síndrome. Aunque podría estar implicado cualquier sistema de órganos, las manifestaciones más comunes incluyen neuropatía periférica, mononeuritis múltiple, isquemia intestinal, isquemia renal, dolor testicular y livedo reticular,

30 b. Enfermedad de Kawasaki

**[0279]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar la enfermedad de Kawasaki. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la enfermedad de Kawasaki (Sundel, R.P. (2002) Curr. Rheumatol. Rep. 4:474; Gedalia, A. (2002) Curr. Rheumatol. Rep. 4:25). Aunque la causa de la enfermedad de Kawasaki es desconocida, está asociada a una inflamación aguda de las arterias coronarias, que sugiere que el daño tisular asociado a esta enfermedad podría estar mediado por agentes proinflamatorios tales como el  $TNF\alpha$ . La enfermedad de Kawasaki se refiere a una vasculitis que afecta a las membranas mucosas, ganglios linfáticos, revestimiento de los vasos sanguíneos y al corazón. La enfermedad de Kawasaki a menudo también se denomina en lo sucesivo síndrome de ganglios linfáticos mucocutáneos, enfermedad de ganglios linfáticos mucocutáneos y poliarteritis infantil. Los sujetos afectados por la enfermedad de Kawasaki desarrollan vasculitis que a menudo implican a las arterias coronarias, que puede conducir a miocarditis y pericarditis. A menudo, a medida que disminuye la inflamación aguda, las arterias coronarias pueden desarrollar aneurismas, trombosis y conducir a infarto de miocardio.

45 **[0280]** La enfermedad de Kawasaki es una vasculitis sistémica febril asociada a edema en las palmas y las plantas de los pies, con agrandamiento de los ganglios linfáticos cervicales, labios agrietados y “lengua de fresa”. Aunque la respuesta inflamatoria se encuentra en vasos sanguíneos de todo el cuerpo, el sitio más común de daño en órganos terminales es las arterias coronarias. La enfermedad de Kawasaki afecta principalmente a niños menores de 5 años de edad. La más alta incidencia está en Japón, pero cada vez es más reconocida en Occidente, y ahora es la principal causa de enfermedad cardíaca adquirida en niños en EE.UU. La complicación más grave de la enfermedad de Kawasaki es la arteritis coronaria y la formación de aneurismas que ocurre en un tercio de los pacientes no tratados.

3. Enfermedad de vasos pequeños

55 **[0281]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar la enfermedad de vasos pequeños. En una realización, el anticuerpo contra  $TNF\alpha$  de la invención se usa para tratar sujetos que tienen vasculitis de vasos pequeños. El término “vaso(s) pequeño(s)” se usa para referirse a arteriolas, vénulas y capilares. Las arteriolas son arterias que contienen solo 1 o 2 capas de células de músculo liso y son terminales a y continuas con la red capilar. Las vénulas transportan sangre desde la red capilar hacia las venas, y los capilares conectan arteriolas y vénulas. A

continuación se describen ejemplos de vasculitis de vasos pequeños.

a. Enfermedad de Behcet

- 5 **[0282]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar la enfermedad de Behcet. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la enfermedad de Behcet (Sfikakis, P.P. (2002) Ann. Rheum. Dis. 61:ii51-3; Dogan, D. y Farah, C. (2002) Oftalmología. 52:23). La enfermedad de Behcet es un trastorno crónico que implica la inflamación de vasos sanguíneos en todo el cuerpo. La enfermedad de Behcet también puede causar varios tipos de lesiones cutáneas, artritis, inflamación intestinal y meningitis (inflamación de las membranas del cerebro y la columna vertebral). Como resultado de la enfermedad de Behcet, el sujeto con el trastorno puede presentar inflamación en tejidos y órganos de todo el cuerpo, incluyendo el tubo gastrointestinal, sistema nervioso central, sistema vascular, pulmones y riñones. La enfermedad de Behcet es tres veces más común en hombres que en mujeres, y es más común en el Este del Mediterráneo y Japón.

15 b. Granulomatosis de Wegener

- [0283]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar la granulomatosis de Wegener. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología de la granulomatosis de Wegener (Marquez, J., et al. (2003) Curr. Rheumatol. Rep. 5:128; Harman, L.E. y Margo, C.E. (1998) Surv. Ophthalmol. 42:458). Granulomatosis de Wegener se refiere a una vasculitis que causa inflamación de vasos sanguíneos en las vías respiratorias superiores (nariz, senos nasales, oídos), pulmones y riñones. La granulomatosis de Wegener también se denomina en lo sucesivo granulomatosis de línea media. La granulomatosis de Wegener incluye una inflamación granulomatosa que implica al tracto respiratorio, y vasculitis necrotizante que afecta vasos de tamaño pequeño a mediano. Los sujetos que tienen granulomatosis de Wegener también tienen a menudo artritis (inflamación de las articulaciones). La glomerulonefritis puede también presentarse en sujetos afectados, pero puede estar implicado prácticamente cualquier órgano.

c. Síndrome de Churg-Strauss

- 30 **[0284]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar el síndrome de Churg-Strauss. El factor de necrosis tumoral ha sido implicado en la fisiopatología del síndrome de Churg-Strauss (Gross, W.L. (2002) Curr. Opin. Rheumatol. 14:11; Churg, W.A. (2001) Mod. Pathol. 14:1284). Síndrome de Churg-Strauss se refiere a una vasculitis sistémica y muestra signos de manifestación temprana de asma y eosinofilia. El síndrome de Churg-Strauss también se denomina en lo sucesivo granulomatosis alérgica y angeítis, y ocurre en el cuadro clínico de la rinitis alérgica, el asma y la eosinofilia. También se presentan sinusitis e infiltrados pulmonares en el síndrome de Churg-Strauss, afectando principalmente a los pulmones y al corazón. Son comunes la neuropatía periférica, la arteritis coronaria y la participación gastrointestinal.

*M. Otras enfermedades*

- 40 **[0285]** Las formulaciones de la invención pueden usarse para tratar varios trastornos diferentes, en los que la actividad de TNF-alfa es perjudicial. Ejemplos de otras enfermedades y trastornos en los que la actividad de TNF-alfa ha sido implicada en la fisiopatología y, así pues, que pueden ser tratados usando un anticuerpo, o porción de anticuerpo, de la invención, incluyen trastornos óseos inflamatorios y enfermedad de resorción de huesos (véanse, por ejemplo, Bertolini, D. R., et al. (1986) Nature 319:516-518; Konig, A., et al. (1988) J. Bone Miner. Res. 3:621-627; Lerner, U. H. y Ohlin, A. (1993) J. Bone Miner. Res. 8:147-155; y Shanlar, G. y Stem, P. H. (1993) Bone 14:871-876), hepatitis, incluyendo hepatitis alcohólica (véanse, por ejemplo, McClain, C. J. y Cohen, D. A. (1989) Hepatology 9:349-351; Felver, M. E., et al. (1990) Alcohol. Clin. Exp. Res. 14:255-259; y Hansen, J., et al. (1994) Hepatology 20:461-474), hepatitis viral (Sheron, N., et al. (1991) J. Hepatol. 12:241-245; y Hussain, M. J., et al. (1994) J. Clin. Pathol. 47:1112-1115) y hepatitis fulminante; alteraciones de la coagulación (véanse, por ejemplo, van der Poll, T., et al. (1990) N. Engl. J. Med. 322:1622-1627; y van der Poll, T., et al. (1991) Prog. Clin. Biol. Res. 367:55-60), quemaduras (véanse, por ejemplo, Giroir, B. P., et al. (1994) Am. J. Physiol. 267:H 118-124; y Liu, X. S., et al. (1994) Burns 20:40-44), lesiones por reperfusión (véanse, por ejemplo, Scales, W. E., et al. (1994) Am. J. Physiol. 267:G1122-1127; Serrick, C., et al. (1994) Transplantation 58:1158-1162; y Yao, Y. M., et al. (1995) Resuscitation 55 29:157-168), formación queloide (véase, por ejemplo, McCauley, R. L., et al. (1992) J. Clin. Immunol. 12:300-308), formación de tejido cicatricial; pirexia; enfermedad periodontal; obesidad y toxicidad por radiación.

- [0286]** Ejemplos de otros trastornos que pueden tratarse con las formulaciones de la invención se describen en los documentos US20040126372 y US6258562.

**[0287]** En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar artritis reumatoide, artritis psoriásica o espondilitis anquilosante. La formulación de la divulgación que comprende un anticuerpo contra TNF-alfa humano aislado, o porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, adalimumab), puede ser administrada a un sujeto humano según un esquema de dosificación y cantidad de dosis eficaz para tratar la artritis reumatoide, artritis psoriásica o espondilitis anquilosante. En una realización, una dosis de aproximadamente 40 mg de un anticuerpo contra TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, adalimumab) (por ejemplo, 0,4 a 100 mg/ml de formulación de la divulgación) en la formulación de la divulgación se administra a un sujeto humano cada dos semanas para el tratamiento de la artritis reumatoide, artritis psoriásica o espondilitis anquilosante. En un caso, una dosis de aproximadamente 80 mg de anticuerpo contra TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, adalimumab) (por ejemplo 0,8 ml de una formulación de 100 mg/ml de la divulgación) en la formulación de la divulgación se administra a un sujeto humano mensualmente para el tratamiento de la artritis reumatoide, artritis psoriásica o espondilitis anquilosante. En una realización, la formulación se administra por vía subcutánea cada dos semanas (también denominado en lo sucesivo bisemanalmente, véanse los métodos de administración descritos en el documento 20030235585) para el tratamiento de la artritis reumatoide, espondilitis anquilosante o artritis psoriásica. En una realización, la formulación se administra por vía subcutánea, mensualmente para el tratamiento de la artritis reumatoide, espondilitis anquilosante o artritis psoriásica.

**[0288]** En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. La formulación de la divulgación que comprende un anticuerpo contra TNF-alfa humano aislado, o porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, adalimumab), puede ser administrada a un sujeto humano según un esquema de dosificación y una cantidad de dosis eficaz para tratar la enfermedad de Crohn. En un caso, una dosis de aproximadamente 160 mg de un anticuerpo contra TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, adalimumab) (por ejemplo, 1,6 ml de una formulación de 100 mg/ml de la divulgación) en la formulación de la divulgación se administra a un sujeto humano inicialmente a aproximadamente en el día 1, seguido por una dosis posterior de 80 mg del anticuerpo (por ejemplo, 0,8 ml de una formulación de 100 mg/ml de la divulgación) dos semanas después, seguido por la administración de aproximadamente 40 mg (por ejemplo 0,4 ml de una formulación de 100 mg/ml de la divulgación) cada dos semanas para el tratamiento de la enfermedad de Crohn. En una realización, la formulación se administra por vía subcutánea, según un régimen de dosis múltiples variables que comprende una o más dosis de inducción y una o más dosis de mantenimiento (véanse, por ejemplo, las publicaciones de patente de EE.UU. N.º 20060009385 y US20090317399) para el tratamiento de enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. En una realización, la formulación se administra por vía subcutánea, cada dos semanas o mensualmente para el tratamiento de enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa. En un caso, una dosis de aproximadamente 80 mg de un anticuerpo contra TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, adalimumab) (por ejemplo 0,8 ml de una formulación de 100 mg/ml de la divulgación) en la formulación de la divulgación se administra a un sujeto humano mensualmente, para el tratamiento de enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa.

**[0289]** En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar psoriasis. La formulación de la divulgación que comprende un anticuerpo contra TNF-alfa humano aislado, o porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, adalimumab), puede ser administrada a un sujeto humano según un esquema de dosificación y una cantidad de dosis eficaz para tratar la psoriasis. En un caso, una dosis inicial de aproximadamente 80 mg de un anticuerpo contra TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, adalimumab) (por ejemplo, 0,8 ml de una formulación de 100 mg/ml de la divulgación) en la formulación de la divulgación se administra a un sujeto humano, seguido por una dosis posterior de 40 mg del anticuerpo (por ejemplo, 0,4 ml de una formulación de 100 mg/ml de la divulgación) cada dos semanas, empezando una semana después de la dosis inicial. En una realización, la formulación se administra por vía subcutánea, según un régimen de dosis múltiples variables que comprende una o más dosis de inducción y una o más dosis de mantenimiento (véanse, por ejemplo, los documentos 20060009385 y W02007/120823) para el tratamiento de la psoriasis. En una realización, la formulación se administra por vía subcutánea, cada dos semanas o mensualmente para el tratamiento de la psoriasis. En un caso, una dosis de aproximadamente 80 mg de un anticuerpo contra TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, adalimumab) (por ejemplo 0,8 ml de una formulación de 100 mg/ml de la divulgación) en la formulación de la divulgación se administra a un sujeto humano mensualmente, para el tratamiento de la psoriasis.

**[0290]** En una realización, la formulación de la invención se usa para tratar artritis idiopática juvenil (JIA). La formulación de la divulgación que comprende un anticuerpo contra TNF-alfa humano aislado, o porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, adalimumab), puede ser administrada a un sujeto humano según un esquema de dosificación y una cantidad de dosis eficaz para el tratamiento de JIA. En un caso, 20 mg de un anticuerpo contra

TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, en la formulación (por ejemplo, 0,2 ml de una formulación de 100 mg/ml de la divulgación) se administran a un sujeto que pesa 15 kg (aproximadamente 33 libras) a menos de 30 kg (66 libras) cada dos semanas para el tratamiento de JIA. En otro caso, 40 mg de un anticuerpo contra TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, en la formulación de la divulgación (por ejemplo, 0,4 ml de una formulación de 100 mg/ml de la divulgación) se administran a un sujeto que pesa más o igual que 30 kg (66 libras) cada dos semanas, para el tratamiento de JIA. En una realización, la formulación se administra por vía subcutánea, según una dosis fija basada en el peso (véase, por ejemplo, la publicación de patente de EE.UU. N.º 20090271164) para el tratamiento de JIA. En una realización, la formulación se administra por vía subcutánea cada dos semanas o mensualmente, para el tratamiento de JIA.

10

**[0291]** En un caso, un anticuerpo contra TNF-alfa humano aislado, o porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, adalimumab), puede administrarse a un sujeto humano para el tratamiento de un trastorno asociado a la actividad de TNFa perjudicial según un programa de dosificación mensual, por el que el anticuerpo se administra una vez al mes o una vez cada cuatro semanas. Como se describió anteriormente, ejemplos de trastornos que pueden ser tratados según un programa de dosificación mensual usando las formulaciones de la invención incluyen, pero no se limitan a, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, JIA, psoriasis, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, hidradenitis supurativa, arteritis de células gigantes, enfermedad de Behcet, sarcoidosis, retinopatía diabética o artritis psoriásica. Así pues, la formulación de la divulgación que comprende un anticuerpo contra TNF-alfa humano aislado, o porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, adalimumab), puede administrarse a un sujeto humano para el tratamiento de un trastorno asociado a la actividad de TNFa perjudicial según un programa de dosificación mensual. En un caso, 80 mg de un anticuerpo contra TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, en la formulación de la divulgación (por ejemplo, 0,8 ml de una formulación de 100 mg/ml de la divulgación) se administran a un sujeto que tiene un trastorno asociado a la actividad de TNFa perjudicial. En un caso, mg de un anticuerpo contra TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, en la divulgación (por ejemplo, 0,8 ml de una formulación de 100 mg/ml de la divulgación) se administran mensualmente o cada dos semanas a un sujeto para el tratamiento de un trastorno asociado a la actividad de TNFa perjudicial.

**[0292]** Las cantidades de dosis descritas en el presente documento pueden administrarse como una dosis única (por ejemplo, una dosis única 40 mg en 0,4 ml o dosis de 80 mg en 0,8 ml), o alternativamente, pueden administrarse como múltiples dosis (por ejemplo, cuatro dosis de 40 mg o dos dosis de 80 mg para administrar una dosis de 160 mg).

**[0293]** La formulación de la divulgación que comprende un anticuerpo contra TNF-alfa humano aislado, o porción de unión al antígeno del mismo (por ejemplo, adalimumab), también puede administrarse a un sujeto en combinación con un agente terapéutico adicional. En una realización, la formulación se administra a un sujeto humano para el tratamiento de artritis reumatoide en combinación con metotrexato u otros fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME). En otra realización, la formulación se administra a un sujeto humano para el tratamiento de JIA en combinación con metotrexato u otros fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad (FARME). Se describen terapias de combinación adicionales en las patentes de EE.UU. N.º 6.258.562 y 7.541.031; y la publicación de patente de EE.UU. N.º US20040126372.

**[0294]** La formulación de la divulgación que comprende un anticuerpo contra TNF-alfa humano, o porción de unión al antígeno del mismo, también puede usarse para tratar un sujeto en el que ha fallado previamente la terapia de inhibidor de TNF, por ejemplo, un sujeto que ha perdido respuesta a, o es intolerante a, infliximab.

45

**[0295]** La invención se ilustra adicionalmente con los siguientes ejemplos, que no deben considerarse como adicionalmente limitantes.

## EJEMPLOS

50

### EJEMPLO 1: LA FORMULACIÓN DE ANTICUERPO ANTI-TNF $\alpha$ DE ALTA CONCENTRACIÓN REDUCE EL DOLOR POR INYECCIÓN

**[0296]** Ha habido informes de dolor asociado a la administración subcutánea de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano, por ejemplo el adalimumab. En estudios controlados con placebo, el 20 % de los pacientes tratados con adalimumab desarrollaron reacciones en el sitio de inyección (eritema y/o comezón, hemorragia, dolor o inflamación), en comparación con el 14 % de los pacientes que recibieron placebo. La mayoría de las reacciones en el sitio de inyección fueron leves y generalmente no necesitaron la interrupción del fármaco.

**[0297]** Existen dos componentes principales del dolor por inyección asociado a adalimumab: el dolor asociado al pinchazo de la aguja, y el dolor asociado a la inyección del fármaco en el tejido. El dolor relacionado con la inyección puede estar relacionado con la formulación del adalimumab y/o con el volumen de medicamento. El siguiente estudio examinó si varias formulaciones tienen un impacto en el dolor por inyección tras la administración subcutánea de adalimumab.

Materiales y métodos

*Diseño del estudio*

10

**[0298]** Los objetivos primarios de este estudio fueron comparar el dolor relacionado con la inyección de tres formulaciones de adalimumab de alta concentración (100 mg/ml) en la jeringa precargada PHYSIOLIS™ con la formulación comercial actual de adalimumab (50 mg/ml) en la jeringa precargada actual; y evaluar la biodisponibilidad de tres formulaciones de adalimumab de alta concentración (100 mg/ml) en comparación con la formulación comercial actual de adalimumab (50 mg/ml). El objetivo secundario de este estudio fue evaluar la seguridad y tolerabilidad de las cuatro formulaciones de adalimumab.

15

**[0299]** Fueron reclutados 200 sujetos adultos sanos masculinos y femeninos, que cumplieron los criterios de elegibilidad para el estudio, para participar en el estudio. Generalmente, el estudio fue realizado según un diseño de grupos paralelos aleatorizado. Los datos de evaluación del dolor se obtuvieron preferentemente de todos los 200 sujetos. La evaluación de la farmacocinética (PK) se hizo solo para los primeros 100 sujetos, más o menos.

20

**[0300]** Los sujetos de cada grupo de tratamiento fueron programados para recibir una inyección subcutánea de adalimumab 40 mg por medio de una jeringa precargada. Hubo cuatro grupos de tratamiento, uno para cada una de las cuatro formulaciones como se establece en la Tabla 1 a continuación. Después de cumplir los criterios de selección, los sujetos fueron asignados aleatoriamente, en números aproximadamente iguales, a uno de los cuatro grupos de tratamiento mostrados en la Tabla 1.

25

**[0301]** Las tres formulaciones de alta concentración (F1, F3 y F4) contuvo cada una 40 mg de adalimumab en 0,4 ml de disolución en la jeringa precargada PHYSIOLIS™. Se compararon F1, F3 y F4 con la formulación comercial actual de adalimumab de 40 mg de adalimumab en 0,8 ml de disolución en la jeringa precargada actual. Los ingredientes para cada una de las formulaciones se describen en la Tabla 1 a continuación. Las formulaciones descritas en la Tabla 1 también se refieren a las formulaciones descritas en los Ejemplos 2-7 más adelante.

30

Tabla 1. Grupos de tratamiento

Grupo de tratamiento	N.º de sujetos	Día 1 del estudio, inyección s.c.	Formulación
A	50	Formulación 1 (F1) de alta concentración (40 mg/0,4 ml en la jeringa precargada PHYSIOLIS™)	Adalimumab, manitol, ácido cítrico monohidratado, citrato de sodio, fosfato disódico dihidratado, polisorbato 80, agua para inyección, hidróxido sódico añadido según sea necesario para ajustar el pH.
B	50	Formulación 3 (F3) de alta concentración (40 mg/0,4 ml en la jeringa precargada PHYSIOLIS™)	Adalimumab, manitol, polisorbato 80, agua para inyección
C	50	Formulación 4 (F4) de alta concentración (40 mg/0,4 ml en la jeringa precargada PHYSIOLIS™)	Adalimumab, polisorbato 80, agua para inyección
D	50	Formulación comercial actual (40 mg/0,8 ml en la jeringa actual)	Adalimumab, manitol, ácido cítrico monohidratado, citrato de sodio, fosfato disódico dihidratado, dihidrogenofosfato de sodio dihidratado, cloruro sódico, polisorbato 80, agua para inyección, hidróxido sódico añadido según sea necesario para ajustar el pH

**[0302]** Los primeros aproximadamente 100 sujetos en cumplir todos los criterios de entrada y en ser reclutados en el estudio fueron clasificados aleatoriamente a los cuatro grupos de tratamiento, en números

aproximadamente iguales en cada grupo, y participaron ya sea en la Cohorte 1 o en la Cohorte 2. Lo segundos aproximadamente 100 sujetos en cumplir todos los criterios de entrada y en ser reclutados en el estudio fueron asignados aleatoriamente a los cuatro grupos de tratamiento, en números aproximadamente iguales en cada grupo, y participaron como las Cohortes 3-5. Es el número de Cohorte el que especifica si un sujeto tiene evaluaciones farmacocinéticas (PK) y del dolor, o solo evaluaciones del dolor, como se describe en la Tabla 2 a continuación.

Tabla 2. Asignación de los sujetos de estudio

Cohorte	Total N	Evaluaciones	N.º de sujetos			
			A	B	C	D
1	50	PK y dolor	13	12	13	12
2	44	PK y dolor	11	12	10	11
3	38	Dolor	9	9	10	10
4	39	Dolor	10	10	10	9
5	29	Dolor	7	7	7	8

**[0303]** La recogida de muestras para farmacocinética y las evaluaciones del dolor se hizo para todos los sujetos de las primeras dos cohortes de aproximadamente 100 pacientes (Cohortes 1 y 2). Los sujetos de las Cohortes 3-5 solo participaron en las evaluaciones de dolor, y no se recogieron muestras para farmacocinética para estos sujetos. La seguridad y tolerabilidad fueron evaluadas en todos los sujetos de las 5 cohortes. Cada sujeto fue asignado aleatoriamente para recibir una inyección de adalimumab en el día 1 del estudio. Cada dosis del fármaco de estudio fue administrada por vía subcutánea por un miembro apropiado del personal del sitio mediante una jeringa precargada según el método de inyección apropiado. La inyección fue administrada por vía subcutánea en el abdomen, 2 pulgadas a la derecha del ombligo. Los cuestionarios fueron aplicados por un miembro del personal del estudio diferente de aquel que administró la inyección, tan a menudo como fuera posible.

**[0304]** Los sujetos en las Cohortes 1 y 2 (evaluaciones farmacocinética y del dolor) fueron confinados al sitio de estudio y supervisados durante aproximadamente 10 días (9 noches). El confinamiento de cada sujeto empezó en el día -1 del estudio (1 día antes del día de dosificación) y terminó después de la recogida de las muestras de sangre de las 192 horas y los procedimientos del estudio programados en el día 9 del estudio. Se recogieron muestras de sangre en serie hasta el día del estudio 57 después de la dosificación, volviendo los sujetos para visitas ambulatorias. Se evaluaron la seguridad y tolerabilidad a lo largo de todo el estudio. Los sujetos en las Cohortes 3-5 (evaluación del dolor únicamente) fueron confinados al sitio de estudio y supervisados durante aproximadamente 3 días (2 noches). El confinamiento para cada sujeto empezó en el día -1 del estudio (1 día antes del día de dosificación) y terminó después de completarse los procedimientos del estudio en el día 2 del estudio. Se evaluaron la seguridad y tolerabilidad durante todo el estudio.

**[0305]** Además de los ensayos de biodisponibilidad y de AAA, la tolerabilidad se evaluó preferentemente de la siguiente manera:

- 1) Inmediatamente tras la inyección en el día 1 del estudio: El sujeto rellenó el Módulo de evaluación del dolor.
- 2) Aproximadamente 10 minutos tras la inyección en el día 1 del estudio: Se evaluó la escala de Draize (hemorragia, petequias, eritema, edema y prurito) por un miembro cualificado del personal del sitio.
- 3) Aproximadamente 15 minutos tras la inyección en el día 1 del estudio: El sujeto rellenó el Módulo de evaluación del dolor.
- 4) Aproximadamente 30 minutos tras la inyección en el día 1 del estudio: El sujeto y un miembro cualificado del personal del sitio rellenaron el Módulo de evaluación del dolor y la evaluación de la escala de Draize, respectivamente.

**[0306]** Los datos demográficos de los sujetos en los grupos de tratamiento son los siguientes, mostrados en la Tabla 3, a continuación.

Tabla 3. Datos demográficos de los pacientes

Variable	Formulación 1 de alta conc. (N=50)	Formulación 3 de alta conc. (N=50)	Formulación 4 de alta conc. (N=50)	Formulación comercial (N=50)

Edad (años)	29,6 ± 8,7	29,5 ± 9,4	30,0 ± 8,9	30,3 ± 9,7
Peso (kg)	68,3 ± 13,9	69,6 ± 9,6	67,0 ± 8,4	68,5 ± 10,0
Sexo	31 M (62 %), 19 H (38 %)	25 M (50 %), 25 H (50 %)	31 M (62 %), 19 H (38 %)	30 M (60 %), 20 H (40 %)
Raza	37 blancos (74 %), 9 negros (18 %), 4 otros (8 %)	45 blancos (90 %), 3 negros (6 %), 2 otros (4 %)	36 blancos (72 %), 10 negros (20 %), 4 otros (8 %)	40 blancos (80 %), 8 negros (16 %), 2 otros (4 %)

*Formulaciones*

**[0307]** Se estudiaron tres formulaciones nuevas de alta concentración (denominadas en lo sucesivo en el presente documento la Formulación 1, 3 o 4; o F1, F3 o F4, respectivamente) con respecto a la formulación comercial de 50 mg/ml de adalimumab. Las composiciones de cada una de estas formulaciones se enumeran a continuación en las Tablas 4 – 7.

Tabla 4. Formulación 1 (F1)

COMPOSICIÓN DE LA DISOLUCIÓN A GRANEL	
1 ml de disolución a granel contiene	
Nombre del ingrediente	Concentración [mg]
<b>Sustancia activa</b>	
Adalimumab (A-765865)*	100,00
<b>Excipientes</b>	
Manitol	42,00
Ácido cítrico monohidratado	1,31
Citrato de sodio	0,31
Fosfato disódico dihidratado	1,53
Dihidrogenofosfato de sodio dihidratado	0,86
Polisorbato 80	1,00
Hidróxido de sodio	c.s.p.
Agua para inyección	hasta 1.041,00
Nitrógeno	---
Densidad de la disolución: 1,041 g/ml	
* Usado como concentrado.	

10

Tabla 5. Formulación 3 (F3)

COMPOSICIÓN DE LA DISOLUCIÓN A GRANEL	
1 ml de disolución a granel contiene	
Nombre del ingrediente	Concentración [mg]
<b>Sustancia activa</b>	
Adalimumab (A-765865)*	100,00
<b>Excipientes</b>	
Manitol	42,00
Polisorbato 80	1,00
Agua para inyección	hasta 1.041,00
Nitrógeno	---
* Usado como concentrado.	
Densidad de la disolución: 1,040 g/ml	

Tabla 6. Formulación 4 (F4)

COMPOSICIÓN DE LA DISOLUCIÓN A GRANEL	
1 ml de disolución a granel contiene	
Nombre del ingrediente	Concentración [mg]
<b>Sustancia activa</b>	
Adalimumab (A-765865)*	100,00
<b>Excipientes</b>	
Polisorbato 80	1,00
Agua para inyección	hasta 1.026,00



inyección, en el día 1 del estudio. A continuación se muestra una evaluación cualitativa a modo de ejemplo del dolor usada en el estudio:

**[0313]** Seleccione todo lo que describa su nivel actual de dolor en el sitio de inyección:

- 5
- Dolor insoportable
  - Dolor agudo
  - Dolor punzante
  - Dolor leve
- 10
- Incómodo
  - Presión
  - Dolor
  - Irritación
  - Ardor localizado
- 15
- Otro
  - O
- Actualmente no tengo ningún malestar en mi sitio de inyección.

*Evaluación del dolor por la aguja*

20 **[0314]** Después de completar la evaluación cualitativa del dolor, inmediatamente tras la inyección se aplicó una evaluación del dolor por la aguja. A continuación se muestra una evaluación del dolor por la aguja a modo de ejemplo usada en el estudio:

25 **[0315]** ¿Fue usted capaz de notar la diferencia entre el dolor de la aguja que entró en su piel y el dolor de la disolución que le fue inyectada?

- Sí
- No

30 a. Si la respuesta fue sí, ¿la mayoría de su dolor fue causado por la aguja que entre en su piel o fue la mayoría de su dolor causado por la disolución que se le inyectó?  
 La mayoría de mi dolor fue causado por la entrada de la aguja  
 La mayoría de mi dolor fue causado por la disolución que se inyectó

35 *Escala de Draize*

**[0316]** Personal cualificado del sitio completó esta evaluación para cada sujeto aproximadamente 10 minutos y 30 minutos después de la inyección en el día 1 del estudio.

40 **[0317]** Hemorragia/petequias en el sitio de inyección:

- 0: Ninguna
  - 1: Aisladas; hasta 5 petequias
  - 2: Aisladas, pero >5 petequias
- 45
- 3: Numerosas petequias, algunas coalescentes
  - 4: Manchas de sangre en la superficie
  - 5: Hemorragia franca

**[0318]** Eritema en el sitio de inyección:

- 50
- 0: Sin eritema
  - 1: Eritema muy ligero (apenas perceptible)
  - 2: Eritema bien definido
  - 3: Eritema de moderado a intenso
  - 4: Eritema intenso (enrojecido como remolacha)

55 **[0319]** Edema en el sitio de inyección:

- 0: Sin edema
- 1: Edema muy ligero (apenas perceptible)
- 2: Edema ligero (bordes del área bien definidos por una ligera elevación)
- 3: Edema moderado (elevación ~ 1 mm)
- 5 • 4: Edema intenso (elevación > 1 mm, extendiéndose más allá del área de la inyección)

**[0320]** Prurito en el sitio de inyección:

- 0: Sin prurito
- 10 • 1: Prurito ocasional
- 2: Prurito constante

### Resultados

15 **[0321]** Para determinar si la administración de adalimumab podía ser mejorada, se desarrollaron nuevas formulaciones de alta concentración. Las Formulaciones F1, F3 y F4, como se muestra más adelante, tienen la mitad del volumen (es decir, 0,4 ml frente a 0,8 ml) y el doble de concentración de proteína (100 mg/ml frente a 50 mg/ml) en comparación con la formulación comercial actual de adalimumab, y también tienen diferentes composiciones de excipientes. Los experimentos descritos en el presente documento fueron diseñados para evaluar si cualquiera de las nuevas formulaciones era superior a la formulación comercial actual de adalimumab.

25 **[0322]** Se eligió la escala visual analógica del dolor para evaluar el dolor en el sitio de inyección, y se usó para evaluar el impacto de la composición de la formulación sobre las sensaciones de dolor. Además, se compararon la tolerabilidad de varias formulaciones nuevas de adalimumab de 100 mg/ml con la formulación comercial actual (formulación de 50 mg/ml de adalimumab). Los datos de este ejemplo apoyan el hallazgo sorprendente de que las nuevas formulaciones, especialmente la Formulación 3 (F3), disminuye significativamente el dolor con respecto a la formulación comercial actual. Sorprendentemente, F3 también disminuyó significativamente el dolor con respecto a las Formulaciones F1 y F4.

30 **[0323]** Específicamente, la Figura 1 muestra que la administración de las Formulaciones 1 y 3 de alta concentración produjeron una significativa disminución en la evaluación del dolor en todos los puntos de tiempo después de la inyección (inmediatamente después, 15 minutos y 30 minutos), en comparación con los otros grupos de tratamiento (F4 y la formulación comercial actual). La Tabla 8, mostrada más adelante, resume los datos individuales y muestra una comparación de las Formulaciones F1, F3 y F4 con la formulación comercial de 0,8 ml, 35 50 mg/ml.

**[0324]** Como se describe en la Tabla 8, inmediatamente después de la inyección, los sujetos que recibieron la formulación actual de Humira informaron una puntuación de dolor media (DE) de 3,29 (2,57) cm. Las puntuaciones de dolor medias para la Formulación 1 y la Formulación 3 fueron estadísticamente significativamente 40 más bajas que aquellas para la formulación actual de Humira ( $p < 0,001$ ). Las diferencias estimadas de la formulación actual de Humira fueron - 1,50 (IC del 95 %: -2,31 - -0,69 cm) para la Formulación F1, y -2,70 (IC del 95 %: -3,52 - -1,89 cm) para la Formulación F3. Así pues, los Tratamientos A y B (Formulaciones 1 y 3 de alta concentración) produjeron reducciones del 45,6 % y 82,7 % en el dolor en el sitio de inyección, respectivamente. No se realizaron pruebas estadísticas para las puntuaciones de dolor evaluadas a los 15 minutos y 30 minutos después 45 de la inyección debido a que la mayoría de los sujetos no informó dolor en esos puntos de tiempo. Como se describe en la Figura 1, las puntuaciones mínima/máxima de VAS inmediatamente después de la inyección fueron las siguientes: Formulación F1, 0,00-8,3; Formulación F3, 0,00-2,20; Formulación F4, 0,20-8,70; y formulación comercial actual, 0,00- 10,00.

50 **[0325]** Fue evidente que el dolor asociado a la inyección de la Formulación 3 se redujo drásticamente en comparación con el mismo para la formulación comercial actual. Específicamente, el valor de dolor medio, como se evalúa por la Escala visual analógica (VAS) del dolor inmediatamente después de la inyección, disminuyó de una media de 3,29 en la formulación comercial actual a 0,56 en la Formulación 3, una asombrosa reducción del 83 %. De hecho, la reducción del dolor asociada a la Formulación 3 fue tan significativa, que fue una reducción del 69 % 55 desde el nivel de la siguiente mejor formulación (en términos del dolor) - Formulación 1 (1,79).

**[0326]** Similarmente, la escala de dolor para la Formulación 1 se redujo a 1,79, una reducción del 45 % desde el valor de dolor de 3,29 asociado a la formulación comercial actual.

Tabla 8. Escala visual analógica (VAS) del dolor

Inmediatamente después de la inyección						
Tratamiento	N	Media (DE)	LS media &	Comparaciones con la formulación actual &		
				Estimación	Valor de P#	IC del 95 %
Formulación 1 de alta conc.	50	1,79 (2,08)	1,79	-1,50	<0,001	-2,31 - 0,69
Formulación 3 de alta conc.	50	0,56 (0,56)	0,58	-2,71	<0,001	-3,52 - 1,90
Formulación 4 de alta conc.	50	4,12 (2,50)	4,11	0,82	0,976	0,01, 1,63
Formulación actual	50	3,29 (2,57)	3,29			

# De una prueba unilateral, siendo la hipótesis nula que la media para la formulación de prueba es  $\geq$  la media para la formulación actual  
& Basado en ANOVA.

**[0327]** También se aplicó una Evaluación cualitativa del dolor a los sujetos inmediatamente después de la inyección, 15 minutos después de la inyección y 30 minutos después de la inyección para los cuatro tratamientos de adalimumab. Inmediatamente después de la inyección se informó de una evaluación de "sin malestar" con la mayor frecuencia por 31 sujetos (31/50, 62,0 %) que habían recibido la Formulación 3, seguido por 19 sujetos (19/50, 38,0 %) que habían recibido la Formulación 1, 7 sujetos (7/50, 14,0 %) que habían recibido la formulación de Humira actual, y un sujeto (1/50, 2,0 %) que había recibido la Formulación 4. De aquellos sujetos que informaron malestar inmediatamente después de la inyección, el "dolor punzante" fue la sensación informada con más frecuencia, con 30 sujetos (30/50, 60 %) para la formulación actual y la Formulación 4, 16 sujetos (16/50, 32,0 %) para la Formulación 1, y 4 sujetos (4/50, 8,0 %) para la Formulación 3. A los 15 minutos después de la inyección, una gran mayoría de los sujetos que recibieron cada tratamiento informaron "sin malestar" en el sitio de inyección.

**[0328]** El personal del sitio de estudio también utilizó la escala de Draize para evaluar la hemorragia/petequias, eritema, edema y prurito en el sitio de inyección de cada sujeto. Diez minutos después de la inyección, la mayoría de los sujetos en todos los grupos de tratamiento no presentaron hemorragias o petequias, edema o prurito en el sitio de inyección.

**[0329]** Las cuatro formulaciones fueron bien toleradas durante el estudio. Un resumen de los datos de los acontecimientos adversos (EA) preliminares se muestra a continuación en la Tabla 9.

Tabla 9. Acontecimientos adversos (EA) preliminares

	Formulación 1 de alta conc. (N = 50)	Formulación 3 de alta conc. (N=50)	Formulación 4 de alta conc. (N = 50)	Formulación comercial (N = 50)
Cualquier EA	7 (14 %)	7 (14 %)	6 (12 %)	3 (6 %)
Cualquier EA al menos posiblemente relacionado con el fármaco	3 (6 %)	3 (6 %)	2 (4 %)	1 (2 %)
Cualquier EA moderado	0	0	0	0
Cualquier EA grave	0	0	0	0
Cualquier EA que conduzca a retirada del estudio	0	0	0	0
Muertes	0	0	0	0

**[0330]** Por consiguiente, los datos demuestran que las nuevas formulaciones de 100 mg/ml, especialmente las Formulaciones 1 y 3, fueron bien toleradas, y fueron eficaces en reducir el dolor en el sitio de inyección después de la inyección subcutánea de dosis terapéuticas similares, en comparación con la formulación actualmente comercializada de adalimumab. La Formulación F3 tuvo una puntuación de VAS particularmente baja con respecto a las otras formulaciones probadas.

**[0331]** La reducción en el dolor usando la puntuación de VAS no estuvo relacionada con la diferencia en el calibre de la aguja (se usó una aguja 27G para administrar la formulación comercial actual de adalimumab y se usó una aguja 29G para administrar las Formulaciones F1, F3 y F4). En particular, el piquete de la aguja representa una respuesta al dolor inmediata, mientras que la respuesta al dolor medida por la escala VAS indicó un dolor persistente prolongado durante varios minutos, demostrando que la disolución inyectada por sí misma contribuía a la mayoría de la respuesta. Además, todas las formulaciones de prueba (F1, F3 y F4) fueron inyectadas usando el mismo calibre de aguja, y aún así, F1, F3 y F4 tuvieron puntuaciones VAS muy diferentes. Este resultado demuestra adicionalmente que fue la formulación la que contribuyó al efecto del dolor, y que éste puede ser separado del

calibre de la aguja usada para administrar las formulaciones.

## EJEMPLO 2: LAS FORMULACIONES DE ANTICUERPO ANTI-TNF $\alpha$ DE ALTA CONCENTRACIÓN AUMENTAN LA BIODISPONIBILIDAD EN SERES HUMANOS

5

**[0332]** El siguiente ejemplo describe un estudio aleatorizado, en diseño de grupos paralelos, de un solo ciego y de una sola dosis, de fase 1, en voluntarios sanos (el mismo estudio descrito anteriormente en el Ejemplo 1). Los principales objetivos de este estudio fueron comparar el dolor relacionado con la inyección de tres formulaciones de adalimumab de alta concentración (100 mg/ml) en la PFS Physiolis con la formulación actual de adalimumab (Humira) (50 mg/ml) en la PFS actual (véase el Ejemplo 1), y evaluar la biodisponibilidad de tres formulaciones de adalimumab de alta concentración (100 mg/ml) en comparación con la formulación de adalimumab (Humira) comercial actual (50 mg/ml). El objetivo secundario de este estudio fue evaluar la seguridad y tolerabilidad de las cuatro formulaciones de adalimumab.

10

### 15 *Diseño del estudio*

**[0333]** Se reclutaron doscientos voluntarios sanos en este estudio (Tabla 10). Se obtuvieron los datos de evaluación del dolor de los 200 sujetos. Se evaluó la farmacocinética del adalimumab en los primeros 100 sujetos. Una descripción de las formulaciones se proporcionó anteriormente en la Tabla 1.

20

Tabla 10. Grupos de tratamiento

Grupo de tratamiento	N.º de sujetos de estudio	N.º de sujetos para datos farmacocinéticos	Día 1 del estudio Inyección s.c.
A	50	24	Formulación N.º 1 de alta concentración de adalimumab (40 mg/0,4 ml en la PFS Physiolis)
B	50	24	Formulación N.º 3 de alta concentración de adalimumab (40 mg/0,4 ml en la PFS Physiolis)
C	50	23	Formulación N.º 4 de alta concentración de adalimumab (40 mg/0,4 ml en la PFS Physiolis)
D	50	23	Formulación de Humira comercial actual (40 mg/0,8 ml en la PFS actual)

\* Véanse las Tablas 4-7 para las composiciones de la formulación.

**[0334]** Los sujetos de cada grupo de tratamiento recibieron una inyección subcutánea de 40 mg de adalimumab mediante una PFS en el día 1 del estudio. Cada dosis del fármaco de estudio fue administrada por vía subcutánea por un miembro apropiado del personal del sitio, según el método de inyección adecuado como se describe en el protocolo. La inyección fue administrada por vía subcutánea en el abdomen, 2 pulgadas a la derecha del ombligo. Los cuestionarios fueron aplicados por un miembro del personal del estudio diferente de aquel que administró la inyección, tan a menudo como fuera posible.

25

### 30 *Resultados*

#### *Resultados de farmacocinética y conclusiones*

**[0335]** Tras una única dosis subcutánea de adalimumab, los valores centrales de los parámetros farmacocinéticos,  $T_{m\acute{a}x}$ ,  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $ABC_{0-360}$  y  $ABC_{0-1344}$ , fueron similares entre los Tratamientos A, B (formulaciones de adalimumab de alta concentración 1 y 3, respectivamente) y D (formulación comercial actual Humira). Tras la administración de una única dosis, la  $T_{m\acute{a}x}$  media fue más temprana para el tratamiento C (Formulación 4 de adalimumab de alta concentración) con respecto al tratamiento D (Figuras 2 y 3). Los valores centrales de  $C_{m\acute{a}x}$  y los valores de la  $ABC_{0-360}$  fueron mayores ( $p < 0,05$ ) para el tratamiento C frente al tratamiento D.

40

*Biodisponibilidad/Bioequivalencia para los Tratamientos A, B y C (formulaciones de adalimumab de alta concentración) con respecto al tratamiento D (formulación comercial Humira)*

**[0336]** Para el grupo de Tratamiento A frente al grupo D, las estimaciones puntuales para las relaciones de los valores centrales de  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $ABC_{0-360}$  y  $ABC_{0-1344}$  para los Tratamientos A y B estuvieron cerca de la unidad, y los intervalos de confianza del 90 % estuvieron dentro del intervalo de 0,80 a 1,25. Para el Tratamiento B frente a D, las estimaciones puntuales para las relaciones de los valores centrales de  $C_{m\acute{a}x}$  y  $ABC_{0-360}$  estuvieron cerca de la unidad y los intervalos de confianza del 90 % estuvieron dentro del intervalo de 0,80 a 1,25. Para el  $ABC_{0-1344}$ , el límite

45

superior del intervalo de confianza del 90 % para los Tratamientos B frente a D estuvo por encima de 1,25. Para el tratamiento C frente a D, las estimaciones puntuales para la relación de los valores centrales de  $C_{m\acute{a}x}$ ,  $ABC_{0-360}$  y  $ABC_{0-1344}$  fueron 1,429, 1,309 y 1,170, respectivamente, que indica que la biodisponibilidad relativa del tratamiento C (Formulación 4) fue mayor.

5

Tabla 11. Biodisponibilidad relativa e intervalos de confianza del 90 % para la evaluación de la bioequivalencia

Tratamientos <sup>£</sup> Prueba frente a referencia	Parámetro de PK	Valor central		Biodisponibilidad relativa	
		Prueba	Referencia	Estimación puntual	Intervalo de confianza del 90 %
A frente a D	$C_{m\acute{a}x}$	4,47	4,39	1,018	0,859-1,207
	$ABC_{0-360}$	1192,14	1192,23	1,000	0,860-1,163
	$ABC_{0-1344}$	2306,91	2387,28	0,966	0,814-1,147
B frente a D	$C_{m\acute{a}x}$	4,52	4,39	1,029	0,868-1,219
	$ABC_{0-360}$	1222,24	1192,23	1,025	0,882-1,192
	$ABC_{0-1344}$	2547,95	2387,28	1,067	0,899-1,266
C frente a D	$C_{m\acute{a}x}$	6,28	4,39	1,429	1,202-1,699
	$ABC_{0-360}$	1561,05	1192,23	1,309	1,123-1,527
	$ABC_{0-1344}$	2794,29	2387,28	1,170	0,983-1,394

£ Tratamientos A, B o C: una única dosis de la Formulación 1, 3 o 4 de adalimumab de alta concentración, respectivamente, administrada como una única inyección sc, usando una PFS Physiolis (40 mg/0,4 ml).

Tratamiento D: una única dosis de la formulación actual de Humira, administrada como una única inyección sc, usando la PFS de vidrio actualmente disponible (40 mg/0,8 ml). PK = Farmacocinética.

#### Conclusiones de farmacocinética

- 10 **[0337]** Basándose en los resultados de la farmacocinética, la biodisponibilidad relativa de los Tratamientos A y B fue similar a la del Tratamiento D, la formulación comercial actual Humira. La biodisponibilidad relativa del tratamiento C fue mayor cuando se comparó con el Tratamiento D. El aumento inesperado en la biodisponibilidad del tratamiento C sugiere que puede reducirse la cantidad de dosis eficaz administrada a un sujeto.

#### 15 Conclusiones de inmunogenicidad

**[0338]** Doce sujetos tuvieron muestras positivas para AAA durante cualquier momento en el estudio, con solo dos sujetos determinados como AAA positivos según la definición previamente definida. Debido al pequeño tamaño de la muestra y a números relativamente similares de muestras positivas para AAA, no pueden extraerse

- 20 conclusiones acerca de la inmunogenicidad entre los tratamientos.

#### Conclusiones de seguridad

- 25 **[0339]** Los tratamientos probados fueron en general bien tolerados por los sujetos. No se observaron mediciones de signos vitales, ECG o de laboratorio clínicamente significativas durante el transcurso del estudio. La mayoría de los acontecimientos adversos fueron evaluados por el investigador como probablemente no, o no relacionados con el fármaco en estudio, y de gravedad leve. Ningún acontecimiento adverso fue evaluado como grave.

- 30 **[0340]** No se produjeron muertes, acontecimientos adversos graves o retiradas a causa de los acontecimientos adversos durante el estudio.

- 35 **[0341]** Los resultados de otros análisis de seguridad, incluyendo cambios de sujetos individuales y valores posiblemente clínicamente significativos para las mediciones de signos vitales, ECG y de laboratorio fueron comunes para todos los grupos de tratamiento.

#### Tolerabilidad

- 40 **[0342]** Las evaluaciones de tolerabilidad que se realizaron incluyeron el completar un Módulo de evaluación del Dolor (Escala visual analógica [VAS] del dolor), Evaluación cualitativa del dolor y Evaluación del dolor por la aguja y la escala de Draize (véase el Ejemplo 1).

#### EJEMPLO 3: LA FORMULACIÓN DE ANTICUERPO ANTI-TNF $\alpha$ DE ALTA CONCENTRACIÓN AUMENTA LA

**BIODISPONIBILIDAD EN EL MODELO PRECLÍNICO**

**[0343]** El objetivo del siguiente estudio era evaluar los perfiles farmacocinéticos de la Formulación F4 de adalimumab, en comparación con la formulación comercial de adalimumab (véase la Tabla 7 anterior para una descripción de la formulación).

**[0344]** Se estudiaron los perfiles farmacocinéticos de HUMIRA (adalimumab) en perros de raza Beagle macho y hembra (2/sexo/administración subcutánea y 2 machos/administración i.v., Marshall Bio Resources USA, Inc., North Rose, NY 14516) después de una única inyección subcutánea (s.c.) de la formulación comercial HUMIRA (adalimumab) y una formulación de prueba de HUMIRA correspondiente a la Formulación F4 de los ejemplos previos (adalimumab), así como una inyección intravenosa (i.v.) de la formulación comercial HUMIRA como control. La dosis administrada fue 40 mg/perro (a 100 mg/ml para F4 y 50 mg/ml para la formulación comercial).

**[0345]** Para la determinación de los niveles de exposición en suero de adalimumab, se tomaron muestras de sangre a las 0,083, 4, 24, 48, 96, 168, 240, 312, 384, 456, 528 y 864 horas después de la administración (p.a.). Los parámetros examinados fueron los signos clínicos (dos veces a la semana) y la mortalidad.

**[0346]** Aparte de heces mucosas en un animal macho del grupo de control, no se observaron signos clínicos relevantes. La incidencia de signos clínicos se resume en las Tablas 14 y 15 de más adelante.

**[0347]** Los resultados de la farmacocinética (descritos en la Tabla 12 a continuación) de este estudio indicaron que la biodisponibilidad después de la dosis s.c., fue de aproximadamente el 80 %, y los niveles de exposición parecieron ser más altos en hembras que en machos después de la dosis s.c. Hubo una tendencia de niveles de exposición más altos tras la dosis s.c. de la formulación de prueba, en comparación con la dosis s.c. de la formulación comercial en machos.

Tabla 12. Resultados farmacocinéticos

Tratamiento	Género	Número de animal	ABC <sub>0-528h</sub> ( $\mu\text{g}\cdot\text{horas/ml}$ )	ABC/dosis ( $\mu\text{g}\cdot\text{horas/ml/ mg/kg}$ )	Vdss (ml)	T1/2 (horas)
Formulación de prueba, s.c.	macho	1001	9020	226	708	39,3
		1003	11400	286	870	187,2
		Media	10200 $\pm$ 1680	256 $\pm$ 42,4	789 $\pm$ 115	113,3 $\pm$ 104,6
	hembra	1002	15400	384	388	55,5
		1004	15800	395	469	54,5
		Media	15600 $\pm$ 283	390 $\pm$ 7,78	429 $\pm$ 57,3	55 $\pm$ 0,7
Formulación comercial, s.c.	macho	2001	8010	200	692	21,4
		2003	8230	206	695	72,7
		Media	8120 $\pm$ 156	203 $\pm$ 4,24	694 $\pm$ 2,12	47,1 $\pm$ 36,3
	hembra	2002	12700	319	385	34,0
		2004	17200	431	477	119,0
		Media	15000 $\pm$ 3180	375 $\pm$ 79,2	431 $\pm$ 65,1	76,5 $\pm$ 60,1
Formulación comercial, i.v.	Macho	3001	9360	234	548	45,5
		3003	11900	298	407	22,2
		Media	10600 $\pm$ 1800	266 $\pm$ 45,3	478 $\pm$ 99,7	33,9 $\pm$ 16,5

Tabla 13. Identificación de los Animales

Animal N.1	N.º tatuaje	Sexo
1001	1246730	Macho
1003	1230230	Macho
1002	1282302	Hembra
1004	1288689	Hembra
2001	1284879	Macho
2003	1298951	Macho
2002	1297237	Hembra
2004	1280491	Hembra
3001	1285514	Macho
3003	1290143	Macho

Tabla 14: Resumen de observaciones clínicas en machos

Grupo de dosis:	2	3	1
Animales examinados:	4	4	2
Número normal	3	3	2
Categoría, observación	a	b	a
Excreción, heces	1	4	0

Nota: a = Número de animales con observación  
b = Número de días de observación observados

Tabla 15: Resumen de observaciones clínicas en hembras

Grupo de dosis:	2	3	1
Animales examinados:	2	2	2
Número normal	2	2	2
Categoría, observación			
Nota: a = Número de animales con observación b = Número de días de observación observados			

**5 EJEMPLO 4: ESTABILIDAD DE FORMULACIONES DE ANTICUERPO ANTI-TNF $\alpha$  DE ALTA CONCENTRACIÓN CONTRA EL ESTRÉS POR CONGELACIÓN/DESCONGELACIÓN**

**[0348]** El siguiente ejemplo compara la estabilidad de las Formulaciones F1, F3 y F4 de alta concentración con la formulación de adalimumab comercial. La estabilidad se examinó usando pruebas de congelación/descongelación.

*Preparación del experimento*

**[0349]** Se prepararon formulaciones de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  humano de alta concentración como se describe en el Ejemplo 1, Tabla 1 anteriores.

**[0350]** Las disoluciones compuestas se esterilizaron por filtración y se prepararon alícuotas en 8x frascos de PETG de 30 ml, a 20 ml, respectivamente. Las disoluciones estaban prácticamente libres de partículas a la inspección visual.

**[0351]** Las muestras para T0 se colocaron directamente en un refrigerador a 2-8 °C. Los otros frascos se pusieron en un cubo a -80 °C para congelarse.

**[0352]** Al día siguiente, los frascos se descongelaron en baños de agua a una temperatura de 25 °C o 37 °C, respectivamente.

**[0353]** Los ciclos de congelación/descongelación se repitieron 5 veces. A T0 (antes de cualquier ciclo de congelación/descongelación), T1 (después de un ciclo de congelación/descongelación), T3 (después de tres ciclos de congelación/descongelación) y T5 (después de cinco ciclos de congelación/descongelación), se tomaron muestras para análisis y se almacenaron en un frigorífico a 2-8 °C.

→ n = 1 por punto de toma de 4 muestras

→ Volumen de muestra: 20 ml

→ Congelación/descongelación: -80 °C / 25 °C + 37 °C

→ Ciclos de congelación/descongelación: 5

**[0354]** Después de los ciclos, las muestras se analizaron en el laboratorio usando cada una de las siguientes mediciones: Aspecto óptico (en cada punto de tiempo); absorción a 340 nm; partículas subvisibles (a GGDDA); espectroscopia de correlación de fotones (PCS); cromatografía de exclusión de tamaño (SEC); y cromatografía de intercambio iónico (IEC).

45 *Partículas subvisibles*

**[0355]** La medición de partículas subvisibles se hizo en el dispositivo de medición de partículas de Klotz. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

5

Tabla 16. Recuentos de partículas  $\geq 1 \mu\text{m}$ ,  $\geq 10 \mu\text{m}$  y  $\geq 25 \mu\text{m}$ 

Punto de tiempo	Muestra	Temperatura	Lote	Partículas $\geq$		
				1 $\mu\text{m}$	10 $\mu\text{m}$	25 $\mu\text{m}$
T0	HC F1	(25 °C)	E161118001CL	9	1	0
T0	HC F1	(37 °C)	E161118001CL	7	2	1
T1	HC F1	25 °C	E161118001CL	3	0	0
T1	HC F1	37 °C	E161118001CL	33	1	0
T3	HC F1	25 °C	E161118001CL	3	0	0
T3	HC F1	37 °C	E161118001CL	20	1	0
T5	HC F1	25 °C	E161118001CL	4	0	0
T5	HC F1	37 °C	E161118001CL	94	0	0
T0	HC F3	(25 °C)	E161119001CL	6	3	1
T0	HC F3	(37 °C)	E161119001CL	12	2	0
T1	HC F3	25 °C	E161119001CL	4	1	0
T1	HC F3	37 °C	E161119001CL	7	2	0
T3	HC F3	37 °C	E161119001CL	3	1	0
T3	HC F3	37 °C	E161119001CL	9	2	1
T5	HC F3	25 °C	E161119001CL	7	0	0
T5	HC F3	37 °C	E161119001CL	5	0	0
T0	HC F4	(25 °C)	E161120001CL	5	1	1
T0	HC F4	(37 °C)	E161120001CL	7	1	0
T1	HC F4	25 °C	E161120001CL	6	1	0
T1	HC F4	37 °C	E161120001CL	5	1	0
T3	HC F4	25 °C	E161120001CL	12	1	1
T3	HC F4	37 °C	E161120001CL	60	0	0
T5	HC F4	25 °C	E161120001CL	13	0	0
T5	HC F4	37 °C	E161120001CL	22	1	0
T0	comercial	(25 °C)	E161121001CL	464	2	1
T0	comercial	(37 °C)	E161121001CL	198	0	0
T1	comercial	25 °C	E161121001CL	143	1	0
T1	comercial	37 °C	E161121001CL	285	0	0
T3	comercial	25 °C	E161121001CL	108	0	0
T3	comercial	37 °C	E161121001CL	224	0	0
T5	comercial	25 °C	E161121001CL	39	0	0
T5	comercial	37 °C	E161121001CL	151	0	0

**[0356]** Los datos de partículas  $\geq 1 \mu\text{m}$  mostraron una clara tendencia a una carga de partículas más alta en Humira comercial y F1 de alta concentración (HC) a T5, reflejando un comportamiento característico de las formulaciones de adalimumab que contienen sal tamponada o cloruro sódico.

10

Nombre de muestra	Suma de agregados	Monómero	Suma de fragmentos
T0, HCF1, 25 °C	0,42	99,50	0,09
T0, HCF1, 37 °C	0,43	99,46	0,11
T0, HC F3, 25 °C	0,39	99,54	0,07
T0, HCF3, 37 °C	0,41	99,50	0,09
T0, HCF4, 25 °C	0,43	99,46	0,11
T0, HCF4, 37 °C	0,42	99,48	0,11
T0, comercial, 25 °C	0,36	99,55	0,09
T0, comercial, 37 °C	0,35	99,56	0,09
T1, HC F1, 25 °C	0,43	99,47	0,10
T1, HC F1, 37 °C	0,44	99,48	0,08
T1, HC F3, 25 °C	0,38	99,53	0,09

T1, HC F3, 37 °C	0,37	99,54	0,09
T1, HC F4, 25 °C	0,44	99,47	0,09
T, HC F4, 37 °C	0,44	99,46	0,10
T1, comercial, 25 °C	0,35	99,56	0,08
T1, comercial, 37 °C	0,35	99,56	0,10
T3, HC F1, 25 °C	0,42	99,47	0,10
T3, HC F1, 37 °C	0,42	99,48	0,11
T3, HC F3, 25 °C	0,40	99,48	0,12
T3, HC F3, 37 °C	0,40	99,52	0,08
T3, HC F4, 25 °C	0,48	99,41	0,11
T3, HC F4, 37 °C	0,44	99,48	0,08
T3, comercial, 25 °C	0,36	99,54	0,10
T3, comercial, 37 °C	0,34	99,55	0,11
T5, HC F1, 25 °C	0,43	99,48	0,09
T5, HC F1, 37 °C	0,45	99,45	0,10
T5, HC F3, 25 °C	0,41	99,48	0,11
T5, HC F3, 37 °C	0,39	99,48	0,13
T5, HC F4, 25 °C	0,47	99,43	0,10
T5, HC F4, 37 °C	0,49	99,40	0,11
T5, comercial, 25 °C	0,36	99,56	0,08
T5, comercial, 37 °C	0,40	99,47	0,13

**[0357]** Los recuentos de partículas subvisibles para  $\geq 10 \mu\text{m}$  y  $\geq 25 \mu\text{m}$  fueron ambos muy bajos. El ciclo de congelación/descongelación no condujo a un elevado número de partículas subvisibles, indicando que las formulaciones probadas tenían una estabilidad favorable.

5

*Cromatografía de exclusión de tamaño (SEC)*

**[0358]** Los resultados de la SEC se muestran en la Tabla 17. La Tabla 17 indica los porcentajes de agregados, monómeros y fragmentos de SEC en cada una de las disoluciones a T0 (antes de cualquier ciclo de congelación/descongelación), T1 (después de un ciclo de congelación/descongelación), T3 (después de tres ciclos de congelación/descongelación) y T5 (después de cinco ciclos de congelación/descongelación). Estos resultados indican que cada una de las Formulaciones 1, 3 y 4 muestran estabilidades similares a la de la formulación comercial.

15 Tabla 17. Porcentaje de agregados, monómeros y fragmentos antes y después de los ciclos de congelación/descongelación por SEC

*Cromatografía de intercambio iónico (IEC)*

20 **[0359]** La cromatografía de intercambio iónico no reveló sensibilidad diferente de las disoluciones probadas. No pudo observarse degradación significativa.

**[0360]** Sin embargo, al aumentar el número de ciclos de congelación/descongelación, las muestras que se descongelaron a 25 °C mostraron una mayor cantidad en la 2ª región ácida después de 5 ciclos.

25 **[0361]** Los resultados de IEC se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Mediciones de IEC antes y después de los ciclos de congelación-descongelación

Nombre de la muestra	Suma de picos de lisina	1ª región ácida	2ª región ácida	Lisina 0	Lisina 1	Pico intermedio	Lisina 2
TO, HC F1, 25 °C	86,74	2,09	10,51	68,63	16,72	0,99	0,40
TO, HC F3, 25 °C	87,29	1,89	10,22	66,35	16,16	0,91	3,87
TO, HC F4, 25 °C	87,35	1,85	10,20	66,46	16,15	0,89	3,85
TO, comercial, 25 °C	87,18	1,93	10,22	66,25	16,12	0,94	3,88
T1, HC F1, 25 °C	87,17	1,98	10,18	66,24	16,11	0,94	3,87
T1, HC F3, 25 °C	87,30	1,81	10,24	66,39	16,13	0,90	3,88

T1, HC F4, 25 °C	87,21	1,88	10,25	66,31	16,11	0,90	3,88
T1, comercial, 25 °C	87,19	2,01	10,20	66,27	16,11	0,93	3,88
T3, HC F1, 25 °C	87,23	1,94	10,20	66,34	16,12	0,91	3,87
T3, HC F3, 25 °C	87,27	1,86	10,25	66,37	16,14	0,88	3,88
T3, HC F4, 25 °C	87,26	1,82	10,27	66,34	16,15	0,88	3,88
T3, comercial, 25 °C	87,20	1,88	10,28	66,29	16,11	0,91	3,89
T5, HC F1, 25 °C	87,39	1,74	10,21	66,43	16,18	0,89	3,88
T5, HC F3, 25 °C	87,27	1,79	10,32	66,42	16,15	0,84	3,86
T5, HC F4, 25 °C	87,33	1,69	10,32	66,49	16,14	0,85	3,85
T5, comercial, 25 °C	87,05	1,95	10,38	66,17	16,10	0,89	3,88
TO, HC F1, 37 °C	87,25	1,94	10,19	66,36	16,13	0,90	3,86
TO, HC F3, 37 °C	87,42	1,82	10,19	66,54	16,16	0,85	3,87
TO, HC F4, 37 °C	87,38	1,89	10,11	66,52	16,14	0,86	3,86
TO, comercial, 37 °C	87,25	1,86	10,24	66,34	16,12	0,91	3,88
T1, HC F1, 37 °C	87,21	1,98	10,17	66,27	16,11	0,95	3,88
T1, HC F3, 37 °C	87,32	1,91	10,12	66,40	16,13	0,90	3,88
T1, HC F4, 37 °C	87,27	1,98	10,13	66,36	16,14	0,91	3,86
T1, comercial, 37 °C	87,28	1,97	10,14	66,34	16,12	0,93	3,88
T3, HC F1, 37 °C	87,27	1,95	10,15	66,36	16,11	0,94	3,86
T3, HC F3, 37 °C	87,18	2,03	10,11	66,29	16,13	0,90	3,87
T3, HC F4, 37 °C	87,21	1,95	10,15	66,35	16,09	0,92	3,85
T3, comercial, 37 °C	87,31	1,95	10,21	66,50	16,09	0,91	3,81
T5, HC F1, 37 °C	87,29	2,01	10,06	66,40	16,11	0,93	3,85
T5, HC F3, 37 °C	87,25	2,07	10,06	66,37	16,10	0,92	3,87
T5, HC F4, 37 °C	87,28	2,04	10,02	66,42	16,11	0,93	3,83
T5, comercial, 37 °C	87,53	1,91	10,02	66,72	16,11	0,88	3,83

#### EJEMPLO 5: ESTABILIDAD DE FORMULACIONES DE ANTICUERPOS ANTI-TNF $\alpha$ DE ALTA CONCENTRACIÓN CONTRA EL ESTRÉS POR AGITACIÓN

- 5 [0362] El siguiente ejemplo describe un estudio que examinó la estabilidad de las Formulaciones F1, F3 y F4 usando la prueba de estrés por agitación. Cada formulación fue probada en un intervalo de niveles de pH.

##### Materiales

- Humira HC F1 100 mg/ml
  - pH 4,2
  - pH 4,7
  - pH 5,7
  - pH 6,2
- Humira HC F3 100 mg/ml
  - pH 4,2
  - pH 4,7
  - pH 5,7
  - pH 6,2
- Humira HC F4 100 mg/ml
  - pH 4,2
  - pH 4,7
  - pH 5,7
  - pH 6,2

#### 10 Procedimiento

[0363] Los viales, barras de agitación y tapones fueron esterilizados con vapor antes de su uso.

[0364] El experimento de agitación se realizó con el siguiente protocolo experimental:

15

- Soluciones de proteína: F1, F3, F4 de Humira HC, cada una a pH 4,2, 4,7, 5,7, 6,2, 100 mg/ml; F3 de Humira HC a pH 5,2, 100 mg/ml; Humira de Vetter 50 mg/ml,
- volumen de llenado de 5 ml por vial 6R

- n = 3 → 2x agitación (con barra magnética de 7 x 2 mm), 1 control sin agitación (sin barra magnética)
- agitador magnético de múltiples puntos HP: 550 rpm
- temperatura ambiente
- toma de muestras: T = 0, T = 1 h, t = 4 h; t = 24 h, t = 48 h

5

**[0365]** Se llenaron tres viales 6R con 5 ml para cada disolución de proteína y se cerraron con tapones. Dos de ellos se equiparon con una barra de agitación magnética.

**[0366]** Los viales se mantuvieron a 5 °C durante la noche. A la mañana siguiente, las muestras (una por disolución de proteína, debido a que principio todas eran iguales) se midieron con un medidor de turbidez. Las disoluciones medidas se cargaron de nuevo en los viales antes de iniciar el experimento. Después de 1, 4, 24 y 48 h se tomaron muestras y se determinó la turbidez.

**[0367]** Las muestras sin agitar solo fueron medidas en los puntos de tiempo 0 y 48 h.

15

**[0368]** Para F3 de Humira HC a pH 5,2, también se determinaron las partículas subvisibles para todos los puntos de tiempo.

Resultados

20

Turbidez

**[0369]** Los resultados de turbidez para las muestras sometidas a estrés por agitación para las 0, 1, 4, 24 o 48 horas, así como el control sin agitar a las 48 horas, se muestran en la Tabla 19.

25

Tabla 19. Turbidez (UTN) de las muestras sometidas a estrés por agitación

Muestra	0 h	1 h	4 h	24 h	48 h
Adalimumab comercial	20,90	23,90	31,20	98,05	176,00
F3 de Humira HC pH 5,2	6,13	6,69	8,92	18,05	29,50
F1 de Humira HC 4,2	8,62	8,89	9,40	6,48	15,05
F1 de Humira HC 4,7	14,00	15,50	20,05	10,88	81,40
F1 de Humira HC 5,7	30,70	33,25	36,40	23,40	100,40
F1 de Humira HC 6,2	38,00	40,95	52,60	32,65	168,00
F3 de Humira HC 4,2	3,20	3,35	3,72	4,88	6,69
F3 de Humira HC 4,7	4,81	5,20	6,09	9,54	18,70
F3 de Humira HC 5,7	8,75	10,03	11,30	25,90	46,10
F3 de Humira HC 6,2	9,24	-	13,05	22,60	37,30
F4 de Humira HC 4,2	3,44	3,74	3,80	6,48	9,79
F4 de Humira HC 4,7	5,13	5,67	6,60	10,88	17,00
F4 de Humira HC 5,7	9,23	10,15	12,50	23,40	32,20
F4 de Humira HC 6,2	10,30	11,65	15,55	32,65	56,75

**[0370]** Un aumento en el pH se correlacionó con un aumento en la turbidez para todas las formulaciones probadas, tanto en las muestras TO/sin agitar como en las muestras agitadas. Este efecto fue más pronunciado en la Formulación 1. Por lo tanto, la Formulación 1 mostró el mayor aumento de la turbidez después de 48 h a todos los valores de pH, excepto 4,2. Las Formulaciones 3 y 4 mostraron valores de comportamiento y de turbidez similares comparables en todos los puntos de tiempo.

**[0371]** Humira HC (100 mg/ml), F3, pH 5,2, mostró solo un ligero aumento de la turbidez con el tiempo. Por el contrario, la disolución comercial de Humira mostró tanto un valor inicial significativamente más alto como un aumento en la turbidez con el tiempo. Así pues, la Formulación 3 mostró turbidez más baja que la formulación comercial de Humira.

**[0372]** Las muestras agitadas mostraron una turbidez más alta en comparación con los controles sin agitar. La turbidez de los controles sin agitar permaneció casi constante en comparación con las muestras de 0 h, que indica que realizar el experimento a temperatura ambiente no desvió los resultados.

*Partículas subvisibles*

[0373] La Tabla 20 muestra los resultados para los números de partículas subvisibles.

Tabla 20. Recuento de partículas subvisibles antes y después del estrés por agitación

F3 de Humira HC pH 5,2	Partículas subvisibles		
	$\geq 1 \mu\text{m}$	$\geq 10 \mu\text{m}$	$\geq 25 \mu\text{m}$
0 h	103	3	1
1 h	194	4	0
4h	202	4	0
24 h	262	2	0
48 h	192	3	0
48 h sin agitar	80	1	0

5

Partículas  $\geq 1 \mu\text{m}$

[0374] La agitación indujo un ligero aumento en el recuento de partículas subvisibles  $\geq 1 \mu\text{m}$ . El control sin agitar fue comparable a la muestra de 0 h.

10

Partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$

[0375] La agitación no tuvo efecto significativo sobre los recuentos de partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$ . El control sin agitar fue comparable a la muestra de 0 h.

15

Partículas  $\geq 25 \mu\text{m}$

[0376] La agitación no tuvo efecto significativo sobre los recuentos de partículas  $\geq 25 \mu\text{m}$ . El control sin agitar fue comparable a la muestra de 0 h.

20

[0377] En general, los resultados de los experimentos presentados en el Ejemplo 5 mostraron que la Formulación 3, cuando se sometió a estrés por agitación, fue sorprendentemente estable en comparación con la disolución comercial de Humira. La Formulación 3 fue robusta al estrés por agitación según la medición de turbidez y la agitación de la Formulación 3 también tuvo poco o ningún efecto sobre la formación de partículas subvisibles.

25

**EJEMPLO 6: ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO A LARGO PLAZO DEL ANTICUERPO ANTI-TNF $\alpha$  DE ALTA CONCENTRACIÓN**

[0378] El siguiente ejemplo describe un estudio que examinó la estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo (hasta 24 meses) de las Formulaciones F1, F3 y F4.

30

[0379] Las Formulaciones F1, F3 y F4 se probaron antes del almacenamiento a largo plazo (inicial) y después de 3, 6, 9, 12, 18 y 24 meses de almacenamiento. Se usaron las siguientes condiciones de almacenamiento: (1) 5 °C, (2) 25 °C/60 % de humedad relativa (HR), y (3) 40 °C/75 % de HR. Durante el almacenamiento, las muestras se envasaron en una jeringa precargada de 1 ml (incolores, vidrio tipo I, Ph. Eur.), jeringa BD Hypak BD 260 con un tapón gris DB Hypak 4023/50 Fluorotec. Se usaron las siguientes medidas para evaluar la estabilidad durante el almacenamiento, contaminación con partículas, partículas visibles; transparencia y opalescencia, color de la disolución (visual); neutralización de TNF $\alpha$  *in vitro*; cromatografía de intercambio catiónico (CEX-HPLC), cromatografía de exclusión de tamaño (SE-HPLC); contaminación con partículas - partículas subvisibles; integridad del cierre del recipiente; pH; y calidad microbiana.

40

[0380] Todas las formulaciones probadas fueron estables bajo las condiciones de almacenamiento probadas de 2-8 °C durante hasta

45 RESULTADOS

[0381] Los resultados para la Formulación F1 se presentan en la Tabla 21.

Tabla 21. Informe resumen de la estabilidad para la Formulación F1

Artículo de prueba	Componente	Especificación	Duración de la prueba	Condiciones de almacenamiento [°C/% de HR]			
				5 °C	25 °C/60 % de HR	40 °C/75 % de HR	
Contaminación con partículas: Partículas visibles	Partículas visibles	NMT 4.5	Inicial	0,0	0,0	0,0	
			3 meses	0,0	0,0	0,0	
			6 meses	0,0	0,1	0,0	
			9 meses	0,0	-	-	
			12 meses	0,0	-	-	
			18 meses	0,0	-	-	
			24 meses	0,0	-	-	
Transparencia y opalescencia	Evaluación	No más opalescente que la suspensión de referencia IV	Inicial	<= RS III	<= RS III	<= RS III	
			3 meses	<= RS III	<= RS III	<= RS IV	
			6 meses	<= RS III	<= RS III	<= RS IV	
			9 meses	<= RS IV	-	-	
			12 meses	<= RS III	-	-	
			18 meses	RS III	-	-	
			24 meses	<= RS III	-	-	
Color de la disolución (visual)	Escala BY	Valor informado	Inicial	<= BY 7	<= BY 7	<= BY 7	
			3 meses	<= BY 7	<= BY 7	<= BY 7	
			6 meses	<= BY 7	<= BY 7	<= BY 6	
			9 meses	<= BY 7	-	-	
			12 meses	<= BY 7	-	-	
			18 meses	<= BY 7	-	-	
			24 meses	<= BY 7	-	-	
Neutralización de TNF <i>in vitro</i>	(prueba de citotoxicidad) [%]	80 % al 125 % de la capacidad de neutralización del patrón de referencia	Inicial	99	99	99	
			3 meses	97	110	97	
			6 meses	87	81	68	
			9 meses	88	-	-	
			12 meses	110	-	-	
			18 meses	97	-	-	
			24 meses	111	-	-	
	Límite de referencia de error (p = 0,95) Límite Inferior [%]	NLT 64		Inicial	96,1	96,1	96,1
				3 meses	91,1	104,7	93,2
				6 meses	84,2	76,3	64,4
				9 meses	84,3	-	-
				12 meses	105,2	-	-
				18 meses	95,3	-	-
	Límite de referencia de error (p = 0,95) Límite Superior [%]	NMT 156		Inicial	101,3	101,3	101,3
				3 meses	101,9	115,5	100,1
				6 meses	90,8	85,9	71,2
				9 meses	90,8	-	-
				12 meses	114,2	-	-
				18 meses	98,8	-	-
	Cromatografía de intercambio catiónico (CEX-HPLC)	Suma de variantes de lisina [%]	NLT 75	Inicial	86,8	86,8	86,8
				3 meses	86,2	74,7	26,0
6 meses				85,9	65,0	11,9	
9 meses				85,2	-	-	
12 meses				85,2	-	-	
18 meses				84,1	-	-	
24 meses				83,9	-	-	
Cromatografía de exclusión de tamaño	Pico principal (monómero) [%]	NLT 98	Inicial	99,6	99,6	99,6	
			3 meses	99,5	99,0	96,4	
			6 meses	99,4	98,5	92,9	

Artículo de prueba (SE-HPLC)	Componente	Especificación	Duración de la prueba	Condiciones de almacenamiento [°C/% de HR]		
				5 °C	25 °C/60 % de HR	40 °C/75 % de HR
			9 meses	99,4	-	-
			12 meses	99,4	-	-
			18 meses	99,3	-	-
			24 meses	99,3	-	-
Contaminación con partículas - Partículas subvisibles*	Partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ [/recipiente]	NMT 6000	Inicial	11	11	11
			3 meses	8	37	55
			6 meses	33	102	98
			9 meses	32	-	-
			12 meses	58	-	-
			18 meses	44	-	-
			24 meses	11	-	-
	Partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ [/recipiente]	NMT 600	Inicial	0	0	0
			3 meses	0	0	1
			6 meses	0	2	2
			9 meses	0	-	-
			12 meses	0	-	-
			18 meses	1	-	-
			24 meses	0	-	-
Integridad del cierre del recipiente	Evaluación	Hermético	Inicial	Cumple	Cumple	Cumple
			6 meses	Cumple	Cumple	Cumple
			12 meses	Cumple	-	-
			18 meses	Cumple	-	-
			24 meses	Cumple	-	-
pH	Valores individuales	4,7 a 5,7	Inicial	5,3	5,3	5,3
			3 meses	5,2	5,2	5,2
			6 meses	5,3	5,3	5,3
			9 meses	5,3	-	-
			12 meses	5,3	-	-
			18 meses	5,3	-	-
Calidad microbiana	Esterilidad del producto farmacéutico	No se encontró evidencia de crecimiento microbiano	Inicial	Cumple	Cumple	Cumple
			3 meses	Cumple	Cumple	Cumple
			6 meses	Cumple	Cumple	Cumple
			9 meses	Cumple	Cumple	Cumple
			12 meses	Cumple	Cumple	Cumple
			18 meses	Cumple	Cumple	Cumple

**[0382]** Los resultados anteriormente descritos muestran que cuando se almacena durante 24 meses a 5 °C, la Formulación F1 no mostró contaminación visible por partículas, transparencia y opalescencia  $\leq$  RS III, y un color visual  $\leq$  BY7 (amarillo pardo 7). La Formulación F1 también demostró 111 % de la capacidad de neutralización de TNF del patrón de referencia, 83,9 % de variantes de lisina, 99,3 % de monómeros, 11 partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$ , y ninguna partícula  $\geq 25 \mu\text{m}$ . Además, F1 mantuvo un pH estable de 5,3 y no mostró evidencia de crecimiento microbiano. Cuando se almacenó durante 6 meses a 25 °C/60 % de HR, la Formulación F1 mostró 0,1 partículas visibles, transparencia y opalescencia  $\leq$  RS III, color visual  $\leq$  BY7, 81 % de la capacidad de neutralización de TNF del patrón de referencia, 65 % de variantes de lisina, 98,5 % de monómeros, 102 partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$ , 2 partículas  $\geq 25 \mu\text{m}$ , un pH estable de 5,3 y ninguna evidencia de crecimiento microbiano. Cuando se almacenó durante 6 meses a 45 °C/75 % de HR, la Formulación F1 no mostró partículas visibles, transparencia y opalescencia  $\leq$  RS IV, color visual  $\leq$  BY6, 68 % de la capacidad de neutralización de TNF del patrón de referencia, 11,9 % de variantes de lisina, 92,9 % de monómeros, 98 partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$ , 2 partículas  $\geq 25 \mu\text{m}$ , y ninguna evidencia de crecimiento microbiano.

15

**[0383]** Los resultados de la Formulación F3 se presentan en la Tabla 22.

Tabla 22. Informe resumen de la estabilidad para la Formulación F3

Artículo de prueba	Componente	Especificación	Duración de la prueba	Condiciones de almacenamiento [°C/% de HR]		
				5 °C	25 °C/60 % de HR	40 °C/75 % de HR
Contaminación con partículas: Partículas visibles	Partículas visibles	NMT 4.5	Inicial	0,0	0,0	0,0
			3 meses	0,0	0,0	0,2
			6 meses	0,2	0,1	0,0
			9 meses	0,0	-	-
			12 meses	0,0	-	-
			18 meses	0,0	-	-
			24 meses	0,0	-	-
Transparencia y opalescencia	Evaluación	No más opalescente que la suspensión de referencia IV	Inicial	<= RS II	<= RS II	<= RS II
			3 meses	<= RS II	<= RS II	<= RS II
			6 meses	<= RS II	<= RS II	<= RS II
			9 meses	<= RS II	-	-
			12 meses	<= RS II	-	-
			18 meses	<= RS II	-	-
			24 meses	<= RS II	-	-
Color de la disolución (visual)	Escala BY	Valor informado	Inicial	<= BY 7	<= BY 7	<= BY 7
			3 meses	<= BY 7	<= BY 7	<= BY 7
			6 meses	<= BY 7	<= BY 7	<= BY 6
			9 meses	<= BY 7	-	-
			12 meses	<= BY 7	-	-
			18 meses	<= BY 7	-	-
			24 meses	<= BY 7	-	-
Neutralización de TNF <i>in vitro</i>	(prueba de citotoxicidad) [%]	80 % al 125 % de la capacidad de neutralización del patrón de referencia	Inicial	87	87	87
			3 meses	101	106	89
			6 meses	100	101	90
			9 meses	98	-	-
			12 meses	96	-	-
			18 meses	96	-	-
			24 meses	98	-	-
	Límite de referencia de error (p = 0,95) Límite Inferior [%]	NLT 64	Inicial	85,4	85,4	85,4
			3 meses	92,9	88,1	80,6
			6 meses	98,3	97,4	86,5
			9 meses	97,0	-	-
			12 meses	93,3	-	-
			18 meses	93,9	-	-
	Límite de referencia de error (p = 0,95) Límite Superior [%]	NMT 156	Inicial	88,5	88,5	88,5
			3 meses	110,5	122,2	97,9
			6 meses	101,7	103,8	92,6
			9 meses	99,8	-	-
			12 meses	99,2	-	-
18 meses			98,1	-	-	
Cromatografía de intercambio catiónico (CEX-HPLC)	Suma de variantes de lisina [%]	NLT 75	Inicial	86,8	86,8	86,8
			3 meses	86,6	77,8	32,8
			6 meses	86,4	70,1	16,5
			9 meses	86,0	-	-
			12 meses	86,2	-	-
			18 meses	85,2	-	-
			24 meses	85,1	-	-
Cromatografía de exclusión de tamaño	Pico principal (monómero) [%]	NLT 98	Inicial	99,7	99,7	99,7
			3 meses	99,6	99,2	96,9
			6 meses	99,5	98,8	93,8

Artículo de prueba (SE-HPLC)	Componente	Especificación	Duración de la prueba	Condiciones de almacenamiento [°C/% de HR]		
				5 °C	25 °C/60 % de HR	40 °C/75 % de HR
			9 meses		-	-
			12 meses	99,5	-	-
			18 meses	99,4	-	-
			24 meses	99,4	-	-
Contaminación con partículas - Partículas subvisibles*	Partículas $\geq 10 \mu\text{m}$ [/recipiente]	NMT 6000	Inicial	10	10	10
			3 meses	12	45	173
			6 meses	22	157	275
			9 meses	50	-	-
			12 meses	54	-	-
			18 meses	45	-	-
			24 meses	14	-	-
	Partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ [/recipiente]	NMT 600	Inicial	0	0	
			3 meses	0	0	1
			6 meses	0	2	9
			9 meses	0	-	-
			12 meses	1	-	
			18 meses	0	-	--
			24 meses	0	-	
Integridad del cierre del recipiente	Evaluación	Hermético	Inicial	Cumple	Cumple	Cumple
			6 meses	Cumple	Cumple	Cumple
			24 meses	Cumple	-	-
pH	Valores individuales	4,7 a 5,7	Inicial	5,2	5,2	5,2
			3 meses	5,3	5,3	5,3
			6 meses	5,2	5,2	5,3
			9 meses	5,3	-	-
			12 meses	5,4	-	-
			18 meses	5,2	-	-
Calidad microbiana	Esterilidad del producto farmacéutico	No se encontró evidencia de crecimiento microbiano	Inicial	Cumple	Cumple	Cumple

**[0384]** Los resultados proporcionados en la Tabla 22 indican que cuando se almacena durante 24 meses a 5 °C, la Formulación F3 no mostró ninguna contaminación visible por partículas, transparencia y opalescencia  $\leq$  RS II y color visual  $\leq$  BY7. La Formulación F3 mostró 98 % de la capacidad de neutralización de TNF del patrón de referencia, 85,1 % de variantes de lisina, 99,4 % de monómeros, 14 partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$ , y ninguna partícula  $\geq 25 \mu\text{m}$ . El pH mostró poco cambio y no hubo evidencia de crecimiento microbiano.

**[0385]** Cuando se almacenó durante 6 meses a 25 °C/60 % de HR, la Formulación F3 no mostró partículas visibles, transparencia y opalescencia  $\leq$  RS II, y color visual  $\leq$  BY7. Por lo tanto, la Formulación F3 mostró 101 % de capacidad de neutralización de TNF del patrón de referencia, 97,4 % de variantes de lisina, 70,1 % de monómeros, 157 partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$  y 2 partículas  $\geq 25 \mu\text{m}$ . El pH fue estable y no hubo evidencia de crecimiento microbiano.

**[0386]** Cuando se almacenó durante 6 meses a 45 °C/75 % de HR, la Formulación F3 no mostró partículas visibles, transparencia y opalescencia  $\leq$  RS II, y color visual  $\leq$  BY6. Por lo tanto, la Formulación F3 mostró 90 % de la capacidad de neutralización de TNF del patrón de referencia, 16,5 % de variantes de lisina, 93,8 % de monómeros, 275 partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$  y 9 partículas  $\geq 25 \mu\text{m}$ . El pH fue muy estable y no hubo evidencia de crecimiento microbiano.

**[0387]** Los resultados para la Formulación F4 se presentan en la Tabla 23.

Tabla 23. Informe resumen de la estabilidad para la Formulación F4

Artículo de prueba	Componente	Especificación	Duración de la prueba	Condiciones de almacenamiento [°C/% de HR]			
				5 °C	25 °C/60 % de HR	40 °C/75 % de HR	
Aspecto	Partículas visibles	NMT 4.5	Inicial	0,0	0,0	0,0	
			3 meses	0,0	0,0	0,0	
			6 meses	0,0	0,0	0,0	
			9 meses	0,0	-	-	
			12 meses	0,0	-	-	
			18 meses	0,0	-	-	
Transparencia	Evaluación	No más opalescente que la suspensión de referencia IV	Inicial	<= RS II	<= RS II	<= RS II	
			3 meses	<= RS II	<= RS II	<= RS II	
			6 meses	<= RS II	<= RS II	<= RS II	
			9 meses	<= RS II	-	-	
			12 meses	<= RS II	-	-	
			18 meses	<= RS II	-	-	
Color	Escala BY		Inicial	<= BY 7	<= BY 7	<= BY 7	
			3 meses	<= BY 6	<= BY 6	<= BY 6	
			6 meses	<= BY 7	<= BY 7	<= BY 6	
			9 meses	<=	BY 7		
			12 meses	<= BY 7	-	-	
			18 meses	<= BY 7	-	-	
Neutralización de TNF <i>in vitro</i> (prueba de citotoxicidad)	(prueba de citotoxicidad) [%]	80 % al 125 % de la capacidad de neutralización del patrón de referencia	Inicial	111	111	111	
			3 meses	105	101	80	
			6 meses	97	101	76	
			9 meses	112	-	-	
			12 meses	97	-	-	
			18 meses	104	-	-	
	Límite de referencia de error (p = 0,95) Límite Inferior [%]	NLT 64		Inicial	105,2	105,2	105,2
				3 meses	103,2	100,1	79,2
				6 meses	92,9	97,5	74,7
				9 meses	109,3	-	-
				12 meses	90,2	-	-
				18 meses	101,2	-	-
	Límite de referencia de error (p = 0,95) Límite Superior [%]	NMT 156		Inicial	116,3	116,3	116,3
				3 meses	106,2	102,7	80,4
				6 meses	101,1	103,5	78,1
				9 meses	113,9	-	-
				12 meses	104,9	-	-
				18 meses	107,5	-	-
Cromatografía de intercambio catiónico (CEX-HPLC)	Suma de variantes de lisina [%]	NLT 75	Inicial	85,5	85,5	85,5	
			3 meses	85,8	76,8	31,6	
			6 meses	85,4	68,7	15,7	
			9 meses	85,2	-	-	
			12 meses	84,5	-	-	
			18 meses	84,4	-	-	
Cromatografía de exclusión de tamaño (SE-HPLC)	Pico principal (monómero) [%]	NLT 98	Inicial	99,7	99,7	99,7	
			3 meses	99,6	99,1	96,5	
			6 meses	99,6		93,1	
			9 meses	99,5	-	-	
			12 meses	99,5	-	-	
			18 meses	99,4	-	-	
Contaminación con partículas - Partículas subvisibles	Partículas >= 10 µm [recipiente]	NMT 6000	Inicial	17	17	17	
			3 meses	51	174	207	
			6 meses	39	144	218	
			9 meses	82	-		

Artículo de prueba	Componente	Especificación	Duración de la prueba	Condiciones de almacenamiento [°C/% de HR]		
				5 °C	25 °C/60 % de HR	40 °C/75 % de HR
	Partículas $\geq 25 \mu\text{m}$ [/recipiente]	NMT 600	12 meses	57	-	-
			Inicial	0	0	0 5
			3 meses	0	1	
			6 meses	0	1	1
			9 meses	1	-	-
			12 meses	2	-	-
Integridad del cierre del recipiente	Evaluación	Debe cumplir (sin coloración azul)	Inicial	Cumple	1 Cumple	Cumple
			6 meses	Cumple	Cumple	Cumple
pH	Valores individuales	4,7 a 5,7	Inicial	5,1	5,1	5,1
			3 meses	5,2	5,2	5,1
			6 meses	5,2	5,1	5,2
			9 meses	5,2	-	
			12 meses	5,2	-	-
Calidad microbiana	Esterilidad del producto farmacéutico	No se encontró evidencia de crecimiento microbiano	Inicial	Cumple	Cumple	Cumple

**[0388]** Los resultados proporcionados por la Tabla 23 indican que cuando se almacenó durante 18 meses a 5 °C, la Formulación F4 no mostró contaminación visible por partículas, transparencia y opalescencia  $\leq$  RS II, y color visual  $\leq$  BY7. La Formulación F4 mostró 104 % de la capacidad de neutralización de TNF del patrón de referencia, 84,4 % de variantes de lisina y 99,4 % de monómeros. Además, el pH fue estable y no hubo evidencia de crecimiento microbiano.

**[0389]** Cuando se almacenó durante 6 meses a 25 °C/60 % de HR, la Formulación F4 no mostró partículas visibles, transparencia y opalescencia  $\leq$  RS II, y color visual  $\leq$  BY7. La Formulación F4 mostró 101 % de la capacidad de neutralización de TNF del patrón de referencia, 68,7 % de variantes de lisina, 98,8 % de monómeros, 144 partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$  y 1 partícula  $\geq 25 \mu\text{m}$ . Además, el pH fue muy estable y no hubo evidencia de crecimiento microbiano.

**[0390]** Cuando se almacenó durante 6 meses a 45 °C/75 % de HR, la Formulación F4 no mostró partículas visibles, transparencia y opalescencia  $\leq$  RS II y color visual  $\leq$  BY6. La Formulación F4 mostró 76 % de la capacidad de neutralización de TNF del patrón de referencia, 15,7 % de variantes de lisina, 93,1 % de monómeros, 218 partículas  $\geq 10 \mu\text{m}$  y 1 partícula  $\geq 25 \mu\text{m}$ . Además, el pH fue muy estable y no hubo evidencia de crecimiento microbiano.

**[0391]** En resumen, los resultados de los experimentos de estabilidad a largo plazo, como se presentan en las Tablas 21-23, muestran que las Formulaciones F1, F3 y F4 de alta concentración fueron sorprendentemente estables cuando se sometieron a almacenamiento a largo plazo. La estabilidad de estas formulaciones fue similar a la de la formulación comercial. Las Formulaciones F1 y F3 mostraron una estabilidad similar a la formulación comercial después de almacenamiento a largo plazo durante al menos 24 meses. La Formulación F4 mostró estabilidad similar a la formulación comercial después de almacenamiento a largo plazo durante al menos 18 meses.

#### **EJEMPLO 7: ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO A TEMPERATURA AMBIENTE DEL ANTICUERPO ANTI-TNF $\alpha$ DE ALTA CONCENTRACIÓN**

**[0392]** Los productos farmacéuticos líquidos que contienen anticuerpos terapéuticos a menudo requieren un almacenamiento a 2-8 °C hasta el final de su vida útil. Por lo tanto, también se requiere refrigeración por los pacientes entre el momento de la compra del medicamento hasta su uso. Dependiendo del régimen de dosificación propuesto, esto puede producir tiempos de almacenamiento bajo responsabilidad del paciente, en el caso de fármacos de autoadministración, durante hasta varias semanas.

**[0393]** Por lo tanto, los fármacos que no requieren almacenamiento en condiciones refrigeradas presentan tanto un aumento significativo en la conveniencia para el paciente para productos de salud domésticos como una reducción en las preocupaciones de calidad del fármaco, en el caso de un almacenamiento inapropiado, reduciendo de este modo las tasas de quejas y las investigaciones de fluctuación de temperatura.

**[0394]** El producto que contiene adalimumab comercializado en la actualidad (Humira) fue satisfactoriamente reformulado a una concentración de proteína más alta como la Formulación F3, como se describió anteriormente en los Ejemplos 1-6. Los siguientes datos de estabilidad para la Formulación F3 produjeron hallazgos de estabilidad mejorada contra la degradación de proteína. La cinética de degradación resultante medida a 25 °C cumplió los requisitos de almacenamiento a temperatura ambiente durante hasta 3 meses.

**[0395]** Para los datos de estabilidad a largo plazo generales relacionados con el almacenamiento a 25 °C de la Formulación F3, véase el Ejemplo 6 anterior.

**[0396]** Los siguientes datos describen las características de almacenamiento a largo plazo para la Formulación F3. Los datos muestran que incluso después de 18 meses y 24 meses de almacenamiento a largo plazo a 2-5 °C, es aceptable un almacenamiento adicional a 25 °C/30 °C.

Tabla 24: Almacenamiento de 24 m de F3 a 2-8 °C, seguido de 7 días / 14 días a condiciones aceleradas (25 °C, 30 °C)

Criterio de prueba	Especificación	Características	t0 (24 M 5°C)	+ 7 Días		+14 Días	
				25 °C	30 °C / 65 % de HR	25°C	30 °C / 65 % de HR
Aspecto	disolución de incolora a ligeramente amarilla		Cumple	Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Partículas visibles*	un solo vial $\leq 2 \Rightarrow$ prácticamente libre de material en partículas visible 1 vial $> 10 \Rightarrow$		0,0	Valor por analista: 3 x 0; un solo vial $\leq 2 \Rightarrow$ prácticamente libre de material particulado visible	Valor por analista: 3 x 0; un solo vial $\leq 2 \Rightarrow$ prácticamente libre de material particulado visible	Valor por analista: 3 x 0; un solo vial $\leq 2 \Rightarrow$ prácticamente libre de material particulado visible	Valor por analista: 3 x 0; un solo vial $\leq 2 \Rightarrow$ prácticamente libre de material particulado visible
HPLC de exclusión de tamaño	% de pureza del monómero NLT 98%	agregado	0,4	0,4	0,4	0,4	0,4
	NMT 8 %	monómero	99,4	99,3	99,3	99,3	99,2
		fragmentos	0,2	0,2	0,3	0,3	0,3
	NMT 16%	primera región ácida	2,7	2,8	3,0	2,9	3,3
segunda región ácida		10,5	10,9	11,4	11,6	12,7	
HPLC de intercambio catiónico	NMT 75 %	suma de variantes de lisina	85,1	84,2	83,4	83,0	81,2
	NMT 4 %	pico entre lisina 1 y lisina 2	1,5	1,7	1,9	1,6	1,8
		valor informado [%]	pico después de lisina 2	0,2	0,4	0,4	0,9
PCS	valor informado [%]	Promedio en z	1,390	1,365	1,395	1,397	1,420
		Pdl	0,193	0,176	0,188	0,175	0,210

Tabla 25: Almacenamiento de 18 m a 2-8 °C de F3, seguido de 7 días / 14 días a condiciones aceleradas (25 °C, 30 °C)

Criterio de prueba	Especificación	Características	t0 (18 M 5°C)	+ 7 Días		+14 Días	
				25 °C	30 °C / 65 % de HR	25 °C	30 °C / 65 % de HR
Aspecto	disolución de incolora a ligeramente amarilla			Cumple	Cumple	Cumple	Cumple
Partículas visibles*	un solo vial ≤ 2 => prácticamente libre de material en partículas visible 1 vial > 10 => informar al director del laboratorio			Valor por analista: 3 x 0; un solo vial ≤ 2 => prácticamente libre de material particulado visible	Valor por analista: 3 x 0; un solo vial ≤ 2 => prácticamente libre de material particulado visible	Valor por analista: 3 x 0; un solo vial ≤ 2 => prácticamente libre de materia particulado visible	
Contaminación por partículas, partículas subvisibles*	partículas ≤ 10 µm: ≤ 6000	≤ 1 µm / 1 ml		2250	5623	9355	10252
	partículas/recipiente	≤ 10 µm / 1 ml		6	7	39	45
	partículas ≤ 25 µm: ≤ 600	≤ 25 µm / 1 ml		0	0	0	1
PCS	partículas/recipiente valor informado [%]	Promedio en Z		2,378	2,344	2,353	2,358
		Pdl		0,102	0,077	0,077	0,077

**EJEMPLO 8: CONDUCTIVIDAD DE LAS FORMULACIÓN DE ANTICUERPO ANTI-TNF- $\alpha$  DE ALTA CONCENTRACIÓN**

**[0397]** Se determinó la conductividad de las Formulaciones F3 y F4 de anticuerpo anti-TNF $\alpha$  de alta concentración (véanse los Ejemplos 1-6, arriba), usando un dispositivo InoLab Cond Level2 WTW normalizado a 25 °C. La Tabla 26 muestra la influencia de los excipientes no iónicos sobre la conductividad de las formulaciones de adalimumab F3 y F4.

Tabla 26. Conductividad en las Formulaciones F3 y F4

Muestra	Temperatura [°C]	Conductividad [ $\mu$ S/cm]
F3 de adalimumab DP		
1	22,4	663
2	22,4	651
3	23,8	660
4	21,4	715
5	21,7	691
6	23,1	680
7	23,3	644
8	22,9	647
F4 de adalimumab DP		
1	22,0	797
2	22,9	746

10

**[0398]** Como se describió anteriormente en la Tabla 26, la conductividad promedio de tanto las Formulaciones F3 como F4 fue menor de 2 mS/cm.

**EJEMPLO 9: DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DDL) DE FORMULACIONES DE ANTICUERPOS ANTI-TNF- $\alpha$  DE ALTA CONCENTRACIÓN**

**[0399]** Se usó análisis de dispersión dinámica de luz de disoluciones diluidas para evaluar el diámetro hidrodinámico (informado como el tamaño medio o promedio en Z, calculado por análisis acumulativo de la función de autocorrelación de intensidad de DDL medida y el índice de polidispersidad, PDI, de la distribución de tamaño de las partículas). Las mediciones de DDL se usaron específicamente para detectar bajas cantidades de especies de peso molecular más alto, por ejemplo agregados, en una distribución de tamaño, ya que aquellas especies poseen una intensidad de dispersión más alta (proporcional a  $d^6$ ) y, por lo tanto, influirán significativamente en el promedio de Z y el índice de polidispersidad (PDI), como indicador de la distribución de tamaño de promedio en Z.

**[0400]** Se midió una muestra de 150  $\mu$ l de cada una de las Formulaciones F3 y F4 (véanse los Ejemplos 1-6 anteriores) para analizar el tamaño promedio de las partículas (promedio en Z) y el índice de polidispersidad (PDI), un indicador de la "amplitud" de la distribución del tamaño de partícula usando DDL. Los resultados se muestran a continuación. Los datos de DDL no mostraron ningún signo de desarrollo de agregados de peso molecular más alto, ya que el índice de polidispersidad, un indicador sensible de bajos niveles de subpoblaciones de peso molecular más alto, no aumentó significativamente.

<i>Formulación F3</i>		
Muestra N.º	Promedio en Z (nm)	PDI
1	2,4	n.a.
2	2,3	0,08
3	2,3	0,14
4	2,3	0,09
<i>Formulación F4</i>		
Muestra N.º	Promedio en Z (nm)	PDI
1	1,3	n.a.
2	2,5	n.a.

35

**[0401]** Como se describió anteriormente, la medición del promedio en Z para tanto las Formulaciones F3 como F4 fue menor de 4 nm. Este bajo diámetro hidrodinámico es representativo del hecho de que ambas

formulaciones F3 y F4 no contienen excipientes adicionales diferentes a un polisorbato y un poliol o polisorbato.

**EJEMPLO 10: FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ESTABILIDAD DE FORMULACIONES DE ANTICUERPO ANTI-TNF $\alpha$  DE ALTA CONCENTRACIÓN**

5

**[0402]** Se examinó el efecto de variar las concentraciones de manitol y polisorbato sobre la estabilidad del adalimumab en agua.

**[0403]** Se prepararon formulaciones que contenían 100 mg/ml de adalimumab en agua. Posteriormente, se añadieron varias concentraciones de o bien manitol o bien polisorbato en un intervalo de concentraciones para determinar el impacto de cada excipiente sobre la estabilidad de la formulación, como se mide por agregación y fragmentación. Las concentraciones de polisorbato y manitol variaron de 0,1 a 1,0 mg/ml y 0-72 mg/ml, respectivamente, como se muestra en las Figuras 3A y 3B. Como se muestra en la Figura 3A, el variar la concentración de manitol de aproximadamente 12 a aproximadamente 72 mg/ml tuvo un efecto mínimo sobre la estabilidad del adalimumab. Similarmente, el variar la concentración del polisorbato 80 de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 1,0 mg/ml no tuvo efecto sobre la estabilidad del adalimumab.

**[0404]** La práctica de la presente invención empleará, a menos que se indique lo contrario, técnicas convencionales de formulaciones de proteína, que son muy conocidas en la técnica.

20

**EQUIVALENTES**

**[0405]** Por lo tanto, las realizaciones anteriores deben considerarse en todos los aspectos como ilustrativas, en vez de limitantes de la invención descrita en el presente documento. El alcance de la invención está, así pues, indicado por las reivindicaciones adjuntas, en vez de por la descripción anterior.

25

LISTADO DE SECUENCIAS

**[0406]**

30

<110> Abbott Biotechnology Ltd. et al.

<120> Formulación líquida de anticuerpo antiTNF $\alpha$  de alta concentración mejorada

35

<130> 117813-01020

<140> Simultáneamente presentada con la presente

<141> 2011-11-11

40

<150> US 61/412728

<151> 11-11-2010

<150> US 61/413960

<151> 15-11-2010

45

<160> 53

<170> PatentIn Ver. 2.0

50

<210> 1

<211> 107

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

55

<220>

<223> anticuerpo humano

<400> 1

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 100 105

<210> 2  
 <211> 121  
 5 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 10 <223> anticuerpo humano  
 <400> 2

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Tyr Trp Gly  
 100 105 110  
 Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 3  
 <211> 9  
 20 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial  
 <220>  
 <223> anticuerpo humano  
 25 <220>  
 <221> VARIANTE  
 <222> (9)  
 <223> Xaa = Thr o Ala  
 30 <400> 3

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa  
 1 5

35 <210> 4

ES 2 601 202 T3

<211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

5 <220>  
 <223> anticuerpo humano

<220>  
 <221> VARIANTE  
 10 <222> (12)  
 <223> Xaa = Tyr o Asn

<400> 4

15 **Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa**  
**1 5 10**

<210> 5  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> anticuerpo humano

25 <400> 5

**Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser**  
**1 5**

<210> 6  
 30 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 35 <223> anticuerpo humano

<400> 6

**Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu**  
**1 5 10 15**  
**Gly**

40 <210> 7  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> anticuerpo humano

<400> 7

50 **Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala**  
**1 5 10**

<210> 8  
 <211> 5

ES 2 601 202 T3

<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

5 <220>  
<223> anticuerpo humano  
<400> 8

Asp Tyr Ala Met His  
1 5

10 <210> 9  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

15 <220>  
<223> Región variable de la cadena ligera de 2SD4

20 <400> 9

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr
85 90 95
Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105
    
```

25 <210> 10  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30 <220>  
<223> Región variable de la cadena pesada de 2SD4

<400> 10

```

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
20 25 30
Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Glu Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ala Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Thr Lys Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120
    
```



ES 2 601 202 T3

<400> 15

**Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Thr**  
**1 5**

5 <210> 16  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera CDR3 de VLL0F9

<400> 16

**Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Thr**  
**1 5**

15 <210> 17  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 20 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera CDR3 de LOE5

25 <400> 17

**Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Tyr**  
**1 5**

30 <210> 18  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

35 <220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera CDR3 de VLLOG7

<400> 18

**Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Pro Tyr Asn**  
**1 5**

40 <210> 19  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera CDR3 de VLLOG9

<400> 19

50 **Gln Lys Tyr Thr Ser Ala Pro Tyr Thr**  
**1 5**

55 <210> 20  
 <211> 9  
 <212> PRT

ES 2 601 202 T3

<213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera CDR3 de VLLOH1

5 <400> 20

**Gln Lys Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Asn**  
**1 5**

10 <210> 21  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera CDR3 de VLLOH10

<400> 21

**Gln Lys Tyr Asn Ser Ala Ala Tyr Ser**  
**1 5**

20 <210> 22  
 <211> 9  
 <212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera CDR3 de VL1B7

30 <400> 22

**Gln Gln Tyr Asn Ser Ala Pro Asp Thr**  
**1 5**

35 <210> 23  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera CDR3 de VL1C1

40 <400> 23

**Gln Lys Tyr Asn Ser Asp Pro Tyr Thr**  
**1 5**

45 <210> 24  
 <211> 9  
 <212> PRT

50 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera CDR3 de VL0.1F4

55 <400> 24

ES 2 601 202 T3

**Gln Lys Tyr Ile Ser Ala Pro Tyr Thr**  
**1 5**

5 <210> 25  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera CDR3 de VL0.1H8  
 <400> 25

**Gln Lys Tyr Asn Arg Pro Pro Tyr Thr**  
**1 5**

15 <210> 26  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera CDR3 de LOE7.A  
 <400> 26

**Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Ala**  
**1 5**

25 <210> 27  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Región variable de la cadena pesada CDR3 de 2SD4  
 <400> 27

**Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asn**  
**1 5 10**

40 <210> 28  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

45 <220>  
 <223> Región variable de la cadena pesada CDR3 de VH1B11  
 <400> 28

**Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Lys**  
**1 5 10**

50 <210> 29  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 601 202 T3

<220>  
<223> Región variable de la cadena pesada CDR3 de VH1D8

5 <400> 29

**Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Tyr**  
**1 5 10**

<210> 30  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

10

<220>  
<223> Región variable de la cadena pesada CDR3 de VH1A11

15

<400> 30

**Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Asp Asp**  
**1 5 10**

<210> 31  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

20

<220>  
<223> Región variable de la cadena pesada CDR3 de VH1B12

25

<400> 31

**Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Phe Ser Leu Asp Tyr**  
**1 5 10**

<210> 32  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

30

<220>  
<223> Región variable de la cadena pesada CDR3 de VH1E4

35

<400> 32

**Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu His Tyr**  
**1 5 10**

<210> 33  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> Secuencia artificial

45

<220>  
<223> Región variable de la cadena pesada CDR3 de VH1F6

50

<400> 33

**Ala Ser Phe Leu Ser Thr Ser Ser Ser Leu Glu Tyr**  
**1 5 10**

55

ES 2 601 202 T3

5 <210> 34  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Región variable de la cadena pesada CDR3 de 3C-H2

10 <400> 34

Ala Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Glu Tyr  
 1 5 10

15 <210> 35  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

20 <220>  
 <223> Región variable de la cadena pesada CDR3 de VH1-D2.N

<400> 35

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Asn  
 1 5 10

25 <210> 36  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

30 <220>  
 <223> Región variable de la cadena ligera de adalimumab

<400> 36

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtagggga cagagtcacc 60  
 atcacttgtc gggcaagtca gggcatcaga aattacttag cctggatca gcaaaaacca 120  
 gggaaagccc ctaagctcct gatctatgct gcattcactt tgcaatcagg ggtcccatct 180  
 cggttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactetca ccatcagcag cctacagcct 240  
 gaagatggtg caactatta ctgtcaaagg tataaccgtg caccgtatac ttttggccag 300  
 gggaccaagg tggaaatcaa a 321

40 <210> 37  
 <211> 363  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Región variable de la cadena pesada de adalimumab

45 <400> 37

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttggtacagc ccggcaggtc cctgagactc 60  
 tcctgtgcgg cctctggatt cacctttgat gattatgcc tgcactgggt ccggcaagct 120  
 ccaggaagg gcctggaatg ggtctcagct atcacttggg atagtgggtca catagactat 180  
 gcggactctg tggagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240  
 ctgcaaatga acagtctgag agctgaggat acggccgtat attactgtgc gaaagtctcg 300  
 taccttagca ccgcgtcctc ccttgactat tggggccaag gtaccctggt caccgtctcg 360  
 agt 363

ES 2 601 202 T3

<210> 38  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 5  
 <400> 38

His Gly Ser His Asp Asn  
 1 5

10 <210> 39  
 <211> 12  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 15 <400> 39

Gln Ser Tyr Asp Arg Tyr Thr His Pro Ala Leu Leu  
 1 5 10

20 <210> 40  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 25 <400> 40

Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 1 5 10 15  
 Gly

30 <210> 41  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 41

Tyr Asn Asp Gln Arg Pro Ser  
 1 5

40 <210> 42  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 42

Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met His  
 1 5

45 <210> 43  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 50 <400> 43

Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Lys  
 1 5 10

5  
 <210> 44  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 44

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 20 25 30  
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45  
 Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys 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  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Lys Thr His Gly Ser His Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr  
 100 105 110  
 Val Ser Ser  
 115

10  
 <210> 45  
 <211> 112  
 <212> PRT  
 15 <213> Homo sapiens

<400> 45

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln  
 1 5 10 15  
 Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asn  
 20 25 30  
 Thr Val Lys Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
 35 40 45  
 Ile Tyr Tyr Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60  
 Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln  
 65 70 75 80  
 Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Arg Tyr Thr  
 85 90 95  
 His Pro Ala Leu Leu Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly  
 100 105 110

20  
 <210> 46  
 <211> 16  
 <212> PRT

ES 2 601 202 T3

<213> Homo Sapiens

<400> 46

5                   **Ser Ile His Asn Arg Gly Thr Ile Phe Tyr Leu Asp Ser Val Lys Gly**  
                       1                                   5                                           10                                           15

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

10 <213> Homo Sapiens

<400> 47

15                                   **Gly Arg Ser Asn Ser Tyr Ala Met Asp Tyr**  
                                       1                                   5                                           10

<210> 48

<211> 16

<212> PRT

20 <213> Homo Sapiens

<400> 48

25                   **Arg Ser Thr Gln Thr Leu Val His Arg Asn Gly Asp Thr Tyr Leu Glu**  
                       1                                   5                                           10                                           15

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

30 <213> Homo Sapiens

<400> 49

**Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser**  
                                       1                                   5

<210> 50

35 <211> 9

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 50

40                                   **Phe Gln Gly Ser His Val Pro Tyr Thr**  
                                       1                                   5

<210> 51

45 <211> 30

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 51

ES 2 601 202 T3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys  
 Val  
 1 5 10 15  
 20

Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr  
 25 30

5  
 <210> 52  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 <400> 52

10  
 Trp Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met Gly  
 1 5 10

15  
 <210> 53  
 <211> 32  
 <212> PRT  
 <213> Homo Sapiens  
 <400> 53

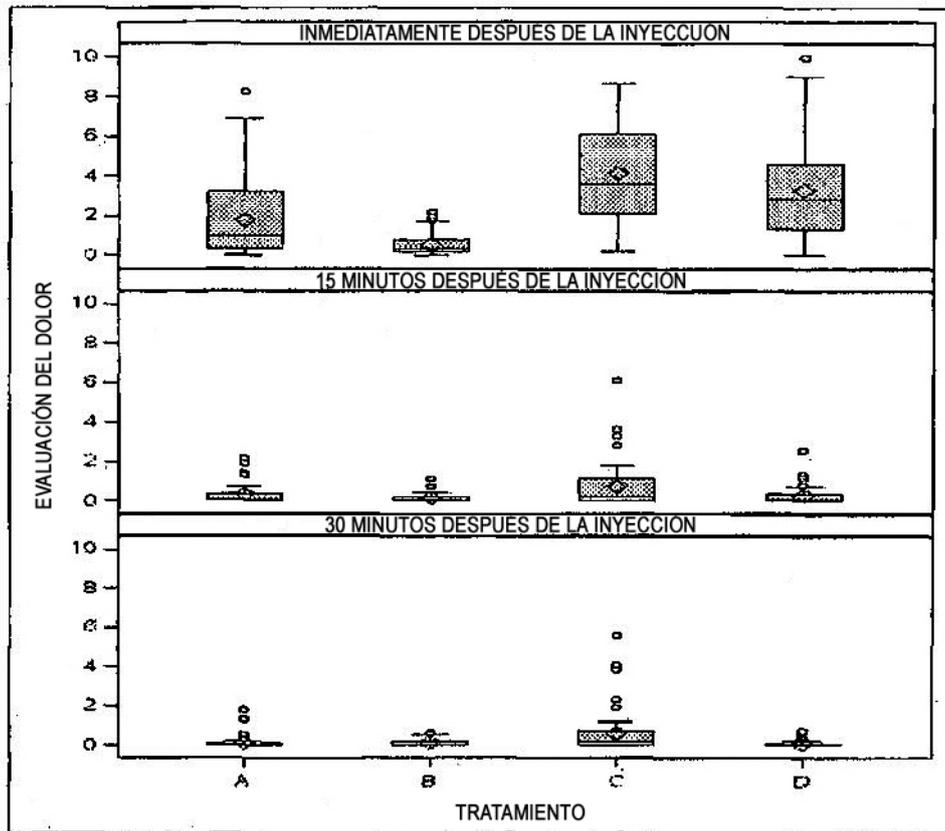
Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr Met Glu Leu Ser Ser  
 Leu  
 1 5 10 15  
 20

20  
 Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 25 30

**REIVINDICACIONES**

1. Una formulación acuosa líquida que consiste esencialmente en:
- 5 (1) 100 mg/ml de adalimumab;  
(2) 1 mg/ml de polisorbato-80;  
(3) 42 mg/ml de manitol; y  
(4) agua,
- 10 en la que la formulación no contiene un tampón.
2. La formulación acuosa líquida de la reivindicación 1, en la que la formulación consiste en:
- 15 (1) 100 mg/ml de adalimumab;  
(2) 1 mg/ml de polisorbato-80;  
(3) 42 mg/ml de manitol; y  
(4) agua.
3. La formulación acuosa líquida de la reivindicación 1 o 2, en la que la formulación es estable hasta  
20 aproximadamente 30 °C durante al menos 6 días.
4. La formulación acuosa líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la formulación es estable hasta aproximadamente 30 °C durante al menos 10 días.
- 25 5. La formulación acuosa líquida de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que tiene una característica seleccionada del grupo que consiste en:
- a) una conductividad inferior a aproximadamente 2 mS/cm;  
b) un diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) que es al menos aproximadamente el 50 % inferior al  $D_h$  de la proteína en una  
30 disolución tamponada a una concentración dada; y  
c) un diámetro hidrodinámico ( $D_h$ ) inferior a aproximadamente 4 nm.
6. Una jeringa precargada o dispositivo autoinyector, que comprende la formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5.
- 35 7. La formulación de una cualquiera de las reivindicaciones 1-5 para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica, psoriasis, artritis idiopática juvenil, espondilitis anquilosante, colitis ulcerosa o hidradenitis supurativa.

Figura 1



- A = Formulación 1 de alta conc.
- B = Formulación 3 de alta conc.
- C = Formulación 4 de alta conc.
- D = Formulación comercial

Figura 2

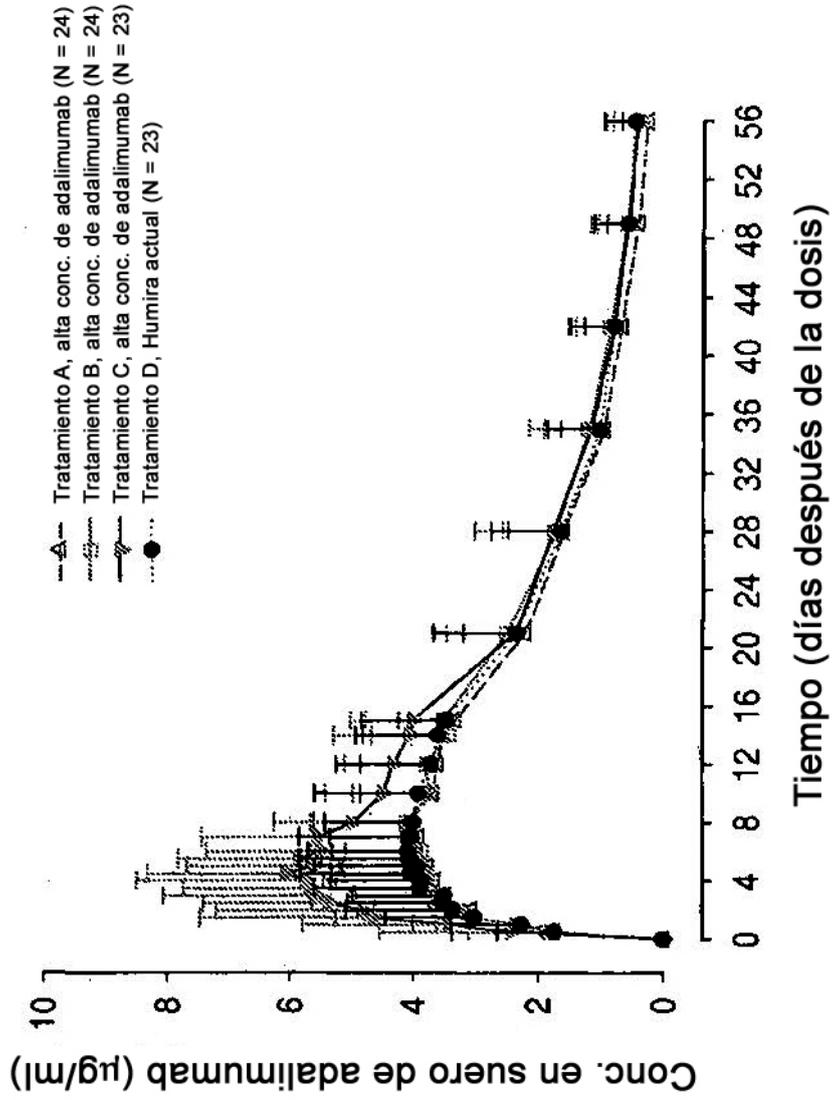


Figura 3A

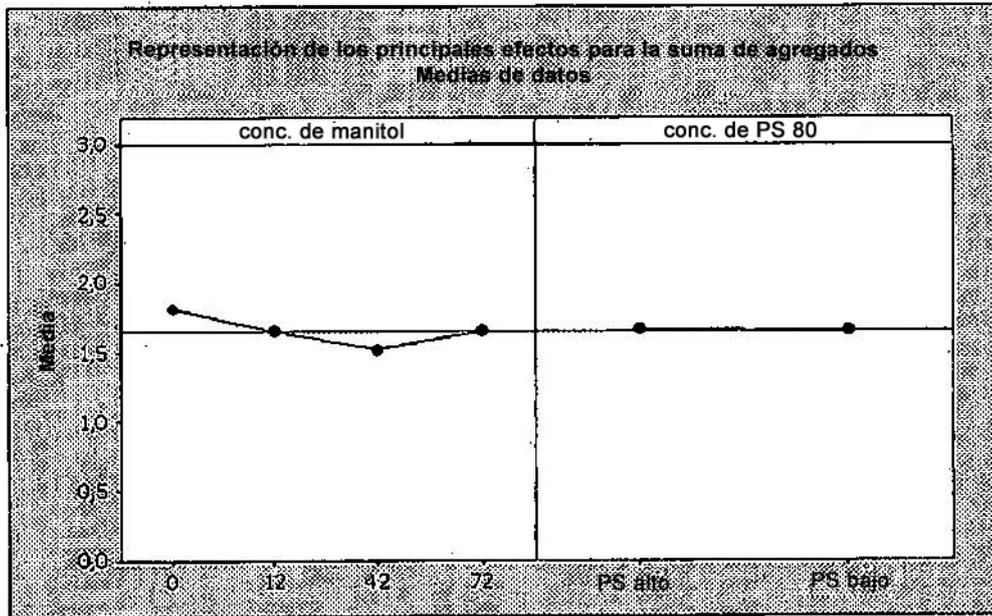


Figura 3B

