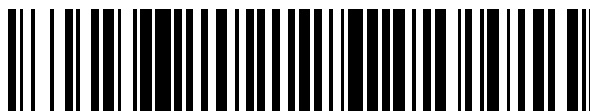


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 602 275**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)

C07K 16/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2007** **PCT/EP2007/063244**

87 Fecha y número de publicación internacional: **12.06.2008** **WO08068246**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2007** **E 07847749 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.08.2016** **EP 2088997**

54 Título: **Formulaciones líquidas de anticuerpo anti-rabia**

30 Prioridad:

05.12.2006 US 872892 P
05.12.2006 EP 06125400

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.02.2017

73 Titular/es:

JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V.
(100.0%)
Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL

72 Inventor/es:

BAKKER, ALEXANDER BERTHOLD HENDRIK y
MARISSSEN, WILLEM EGBERT

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 602 275 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 anticuerpo anti-rabia

5 Campo de la invención

La invención se refiere a medicina. En particular la invención se refiere a formulaciones estables de anticuerpos anti-rabia específicos.

10 Antecedentes de la invención

En los últimos diez años, los avances en biotecnología han hecho posible identificar, desarrollar y producir una diversidad de anticuerpos para su uso en el diagnóstico, prevención y tratamiento de muchas enfermedades y trastornos diferentes. Algunos ejemplos de dichos anticuerpos son los anticuerpos del virus anti-rabia que se describen en el documento WO 2005/118644. Un cóctel de anticuerpos con dos de tales anticuerpos, CR57 y CR4098, es particularmente ventajoso y se puede usar profilaxis después de exposición a la rabia. En el documento WO 2005/118644, estos anticuerpos se prepararon y usaron en PBS.

Al igual que cualquier proteína, la actividad biológica de un anticuerpo, tal como su afinidad de unión o actividad neutralizante, depende de la integridad conformacional de al menos una secuencia central de aminoácidos que permanece intacta a la vez que múltiples grupos funcionales de la proteína se protegen de la degradación. Cada una de la inestabilidad química y física puede contribuir a la degradación de un anticuerpo. Dado que los anticuerpos son más grandes y más complejos que los fármacos orgánicos e inorgánicos tradicionales, la formulación de tales anticuerpos plantea problemas especiales. La estabilidad de los anticuerpos se puede ver influida por factores tales como fuerza iónica, pH, temperatura, ciclos repetidos de congelación/descongelación, concentración del anticuerpo y las fuerzas de cizallamiento. Los anticuerpos activos se pueden perder como resultado de inestabilidades físicas, incluyendo desnaturalización, agregación (formación de agregados tanto solubles e insolubles), precipitación y adsorción, así como inestabilidades químicas, incluyendo, por ejemplo, racemización, eliminación beta o intercambio de disulfuro, hidrólisis, desamidación y oxidación, por nombrar solo unos pocos. Cualquiera de estas inestabilidades puede dar como resultado potencialmente la formación de productos secundarios o derivados de anticuerpo que presentan disminución de la actividad biológica, aumento de la toxicidad, y/o aumento de la inmunogenicidad.

Aunque la técnica anterior indica numerosos ejemplos de excipientes que se pueden usar de forma adecuada para crear formulaciones de anticuerpo para anticuerpos específicos, es imposible predecir qué excipientes se deberían añadir y en qué cantidad se deberían añadir para superar los problemas de inestabilidad en particular que puede tener un particular en particular. Además, es difícil encontrar condiciones óptimas, tales como concentración de anticuerpos, pH y temperatura de almacenamiento, que mantienen un anticuerpo en particular química y biológicamente estable dentro de una formulación en particular. A la vista de todos los factores que se pueden variar, la búsqueda de excipientes adecuados y condiciones óptimas para la formulación de un único anticuerpo monoclonal está lleno de desafíos. Obviamente, la búsqueda de excipientes y condiciones óptimas adecuados para la formulación de dos anticuerpos monoclonales diferentes en una única formulación es incluso más difícil y problemática. En particular, la técnica no proporciona una preparación farmacéutica estable a largo plazo que contenga dos anticuerpos monoclonales recombinantes diferentes.

Por consiguiente, en la técnica existía una necesidad de encontrar formulaciones en las que no solamente un único anticuerpo monoclonal, sino incluso dos anticuerpos monoclonales específicos diferentes frente al virus de la rabia, puedan estables al almacenamiento durante un periodo de tiempo prolongado. La estabilidad durante el almacenamiento también se debería conservar en el caso de fuerzas de cizallamiento que actuaran durante el transporte y en condiciones climáticas modificadas, en particular, a temperatura y humedad atmosférica elevadas. Además, la formulación debería ser adecuada para la vía de administración pretendida, se debería tolerar bien y debería tener una estructura sencilla.

Un objeto de la invención es proporcionar tales formulaciones.

55 Sumario de la invención

De forma sorprendente las formulaciones que satisfacen los requisitos del objeto de la invención se han encontrado en forma de soluciones acuosas que, además de los dos anticuerpos monoclonales diferentes, comprenden tampón de citrato, un agente de tonicidad y un tensioactivo. De forma sorprendente, se encontró que el tampón de fosfato llevaba a inestabilidad de los anticuerpos específicos, inestabilidad que aumentaba incluso mediante la adición de tensioactivo. Por lo tanto, la invención proporciona formulaciones para los anticuerpos CR57 y CR4098 anti-rabia específicos, o variantes funcionales de los mismos. La invención también se refiere a formulaciones de anticuerpo que comprenden tanto CR57 como CR4098, o variantes funcionales de los mismos. Las formulaciones de acuerdo con las reivindicaciones contienen, además del principio activo (el anticuerpo o anticuerpos), un tampón de citrato, un agente de tonicidad y un tensioactivo. Las formulaciones de la invención son estables durante al menos 12 meses a una temperatura entre 2 y 8 grados C.

Descripción de las figuras

Se muestra la estabilidad del anticuerpo CR57 del virus anti-rabia (Fig. 1), CR4098 (Fig. 2) y un cóctel de CR57 y CR4098 (Fig. 3) después de su almacenamiento durante 0 (columnas de color blanco), 2 (columnas de color negro) y 4 semanas (columna sombreadas) a $40 \pm 2^\circ/75 \pm 5 \%$ de humedad relativa tal como se mide mediante HP-SEC. De izquierda a derecha, se sometieron a ensayo los siguientes sistemas de tampón: citrato (20 mM, pH 6,0); citrato (20 mM, pH 6,5); fosfato (20 mM, pH 7,0); fosfato (20 mM, polisorbato 80 al 0,01 % en p/v, pH 7,0).

Descripción detallada de la invención

Las formulaciones de la invención comprenden al menos uno de, y preferentemente ambos, anticuerpo CR57 (cadena pesada SEQ ID NO: 1 y cadena ligera SEQ ID NO: 2) y anticuerpo CR4098 (cadena pesada SEQ ID NO: 3 y cadena ligera SEQ ID NO: 4). La identificación, aislamiento, preparación y caracterización de los anticuerpos monoclonales CR57 y CR4098 del virus anti-rabia se han descrito con detalle en el documento WO 2005/118644 que se incorpora en el presente documento por referencia. Las variantes funcionales de estos anticuerpos pueden tener propiedades fisicoquímicas similares basadas en su similitud elevada y por lo tanto también están incluidas dentro del alcance de la invención. En la presente invención, las variantes funcionales se definen como anticuerpos con una secuencia de aminoácidos que es homóloga en al menos un 95 %, preferentemente al menos un 97 %, por ejemplo al menos un 98 % o 99 % con CR57 o CR4098, y es capaz de competir por la unión a la diana reconocida por la molécula precursora (siendo CR57 o CR4098 la molécula precursora, respectivamente) y que tiene actividad de neutralización del virus de la rabia. Una diana para un anticuerpo es un antígeno (para los presentes anticuerpos se trata del virus de la rabia, en particular la proteína G del mismo), y se puede definir adicionalmente como un epítipo. Las dianas de las moléculas precursoras se han desvelado en el documento WO 2005/118644, y la determinación de la competición para su unión a la diana se puede realizar mediante métodos de rutina conocidos por la persona experta. Preferentemente las variantes funcionales son anticuerpos humanos, y preferentemente son moléculas de IgG1. En realizaciones preferentes, una variante funcional tiene una secuencia de aminoácidos idéntica en al menos un 95 %, 97 %, 98 %, o un 99 % con el anticuerpo precursor. Por lo tanto, la expresión "variante funcional", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo monoclonal que comprende una secuencia de aminoácidos que está alterada por uno o más aminoácidos en comparación con las secuencias de aminoácidos del anticuerpo monoclonal precursor. La variante funcional puede tener modificaciones de secuencia conservativas incluyendo sustituciones, adiciones y deleciones de aminoácidos. Las modificaciones de aminoácidos se pueden introducir mediante técnicas convencionales conocidas en la técnica, tales como mutagénesis dirigida al sitio, clonación molecular, mutagénesis dirigida a oligonucleótido y mutagénesis mediada por PCR aleatoria en el ácido nucleico que codifica los anticuerpos. Las sustituciones de aminoácidos conservativas incluyen aquellas en las que el resto de aminoácidos se sustituye con un resto de aminoácido que tiene propiedades estructurales o químicas similares. En la técnica se han definido familias de restos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (por ejemplo, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (por ejemplo, glicina, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales ramificadas beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano). Para un experto en la materia será evidente que también se pueden usar otras clasificaciones de familias de restos de aminoácidos distintas de la usada anteriormente. Además, una variante puede tener sustituciones de aminoácidos no conservativas, por ejemplo, sustitución de un aminoácido con un resto de aminoácido que tenga propiedades estructurales o químicas diferentes. Las variaciones menores similares también pueden incluir deleciones o inserciones de aminoácido, o ambas. Las directrices para determinar qué restos de aminoácidos se pueden sustituir, insertar o someter a deleción sin suprimir la actividad inmunológica se pueden encontrar usando programas informáticos bien conocidos en la técnica. Los algoritmos informáticos tales como, entre otros, Gap o Bestfit, conocidos por una persona experta en la materia se pueden usar para alinear secuencias de aminoácidos de forma óptima y para definir restos de aminoácidos similares o idénticos.

Las variantes funcionales pueden tener las mismas o diferentes afinidades, ya sea más elevadas sumas bajas, en comparación con el anticuerpo precursor pero además ser capaces de unirse de forma específica al virus de la rabia o un fragmento del mismo, y pueden tener la misma actividad neutralizante del virus de la rabia o más elevada o menor, que el anticuerpo precursor.

En una realización específica, la formulación de acuerdo con la invención comprende un primer anticuerpo monoclonal del virus anti-rabia que tiene una cadena ligera kappa y un segundo anticuerpo monoclonal del virus anti-rabia que tiene una cadena ligera lambda. Esto permite una determinación fácil de la concentración de anticuerpos para cada anticuerpo, ya que los ELISA específicos se pueden realizar para cada una de las cadenas ligeras kappa y lambda.

La expresión "anticuerpo monoclonal", como se usa en el presente documento, se refiere a una preparación de moléculas de anticuerpo de una composición molecular única. Un anticuerpo monoclonal presenta una especificidad de unión y la afinidad hacia un epítipo en particular únicas. Los anticuerpos monoclonales de la invención (CR57 y CR4098 y variantes funcionales de los mismos) para las formulaciones de la presente invención son anticuerpos

humanos y se encuentran en la clase de IgG de anticuerpos, preferentemente IgG1.

Los métodos para producción de anticuerpos monoclonales se conocen bien en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Antibodies: A Laboratory Manual*, Editado por: E. Harlow y D Lane (1988), Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York, que se incorpora en el presente documento por referencia.

La expresión "unión de forma específica" se refiere a la unión de forma inmuno-específica a un antígeno o un fragmento del mismo y no a la unión de forma inmuno-específica a otros antígenos. Un anticuerpo monoclonal que se une de forma inmuno-específica a un antígeno se puede unir a otros péptidos o polipéptidos con una afinidad menor tal como se determina, por ejemplo, mediante radioinmunoensayos (RIA), ensayos de inmunoabsorción unida a enzimas (ELISA), BIACORE, u otros ensayos conocidos en la técnica. Los anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno pueden tener reacción cruzada con antígenos relacionados. Preferentemente, los anticuerpos monoclonales o fragmentos de los mismos que se unen de forma inmuno-específica a un antígeno no tienen reactividad cruzada con otros antígenos.

Por "excipiente farmacéuticamente aceptable" se hace referencia a cualquier sustancia inerte que se combina con una molécula activa tal como anticuerpo monoclonal para preparar una forma de dosificación satisfactoria o conveniente. El "excipiente farmacéuticamente aceptable" es un excipiente que no es tóxico para los receptores en las dosificaciones y concentraciones usadas, y es compatible con otros ingredientes de la formulación que comprende el anticuerpo monoclonal.

La expresión "producto secundario" incluye productos no deseados, que quitan valor o disminuyen la proporción de anticuerpo terapéutico/profiláctico en una formulación dada. Los productos secundarios habituales incluyen agregados del anticuerpo, fragmentos del anticuerpo, por ejemplo producidos por degradación del anticuerpo mediante desamidación o hidrólisis, o mezclas de los mismos. Por lo general, los agregados son complejos que tienen un peso molecular superior al del anticuerpo monómero. Los productos de degradación del anticuerpo pueden incluir, por ejemplo, fragmentos del anticuerpo, por ejemplo, provocados por desamidación o hidrólisis. Por lo general, los productos de degradación son complejos que tienen un peso molecular inferior al del anticuerpo monómero. En el caso de un anticuerpo de IgG, tales productos de degradación tienen un peso inferior a aproximadamente 150 kD.

Una formulación "estable/estabilizada" como se usa en el presente documento es una en la que el anticuerpo en la misma retiene esencialmente en su estabilidad/identidad/integridad física y/o estabilidad/identidad/integridad química y/o actividad biológica después de su almacenamiento. En la técnica están disponibles diversas técnicas analíticas para la medición de la estabilidad de la proteína y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad se puede medir a una temperatura seleccionada y otras condiciones de almacenamiento durante un periodo de tiempo seleccionado. La estabilidad se puede determinar mediante al menos uno de los métodos seleccionados entre el grupo que consiste en inspección visual, SDS-PAGE, IEF, HPSEC, RFFIT, y ELISA de kappa/lambda. Un anticuerpo monoclonal "retiene su estabilidad física" en una formulación farmacéutica, si no muestra signos de agregación, precipitación y/o desnaturalización después de examen visual de color y/o transparencia, o tal como se mide mediante dispersión de luz UV, SDS-PAGE o mediante cromatografía por exclusión de tamaño (HPSEC) (alta presión). Preferentemente, cuando se usan las formulaciones de acuerdo con la invención, un 5 % o menos, por lo general 4 % o menos, preferentemente 3 % o menos, más preferentemente 2 % en particular un 1 % o menos de los anticuerpos forma agregados tal como se mide mediante HPSEC o cualquier otro método adecuado para medir la formación de agregación. Por ejemplo, un anticuerpo se considera estable en una formulación en particular si el anticuerpo monómero tiene una pureza $\geq$ a aproximadamente un 90 %, preferentemente $\geq$ a aproximadamente un 95 %, en particular $\geq$ a aproximadamente un 98 % tal como se mide mediante HPSEC después de un cierto periodo de tiempo determinado previamente en ciertas condiciones de almacenamiento en dicha formulación en particular. Por lo tanto, los anticuerpos CR57 y CR4098 son estables en las formulaciones de la invención después de su almacenamiento a $5 \pm 3^\circ$ durante al menos 18 meses, es decir, el pico del monómero en el cromatograma de HPSEC comprende un área > 95 % del área total de todos los picos (en la Tabla 9 se pueden observar que el área de pico principal es incluso > 99 %). La estabilidad química se puede evaluar por detección y cuantificación de las formas de la proteína químicamente alteradas. La alteración química puede implicar modificación de tamaño (por ejemplo, recorte) que se puede evaluar usando (HP)SEC, SDS-PAGE y/o espectrometría de desorción e ionización por láser asistida por matriz-tiempo de vuelo (MALDI/TOF MS), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen alteración de carga (por ejemplo, que se produce como resultado de desamidación) que se puede evaluar mediante cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo. Un anticuerpo "retiene su actividad biológica" en una formulación farmacéutica en un momento dado, si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado es al menos aproximadamente un 90 % (dentro de los errores del ensayo) de la actividad biológica presentada en el momento en el que se preparó la formulación farmacéutica tal como se determina en un ensayo de unión a antígeno ensayo neutralizante de virus, por ejemplo.

"Aproximadamente", como se usa en la presente solicitud, se refiere a ± 10 %, a menos que se indique de otro modo.

En un primer aspecto, la invención incluye una formulación farmacéutica que comprende al menos un principio activo, preferentemente en una cantidad terapéuticamente eficaz, y al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable. Preferentemente, la formulación farmacéutica comprende un tampón citrato, un agente de tonicidad, un tensioactivo y dos anticuerpos monoclonales del virus anti-rabia, en la que los anticuerpos son diferentes entre sí. La formulación puede ser sólida, por ejemplo, congelada o liofilizada, pero preferentemente es líquida, por ejemplo acuosa. La formulación puede comprender al menos dos anticuerpos monoclonales del virus anti-rabia distintos, en particular (i) CR57 (anticuerpo con secuencia de aminoácidos de cadena pesada SEQ ID NO: 1 y cadena ligera SEQ ID NO: 2) o una variante funcional del mismo y (ii) CR4098 (anticuerpo con secuencia de aminoácidos de cadena pesada SEQ ID NO: 3 y cadena ligera SEQ ID NO: 4) o una variante funcional del mismo.

En una realización específica, la formulación de acuerdo con la invención tiene una potencia de neutralización del virus de la rabia que varía de aproximadamente 250 IU/ml a aproximadamente 1500 IU/ml, por ejemplo de aproximadamente 300 IU/ml a aproximadamente 1400 IU/ml, por lo general de aproximadamente 380 IU/ml a aproximadamente 1350 IU/ml. Está bien dentro del alcance de una persona experta en la materia hacer mediciones de neutralización del virus de la rabia. La neutralización se puede medir, por ejemplo, como se describe en Laboratory techniques in rabies, Editado por: F.-X. Meslin, M.M. Kaplan y H. Koprowski (1996), 4ª edición, Capítulos 15-17, Organización Mundial de la Salud, Ginebra. Un ensayo adecuado y conocido para la neutralización de actividad es un ensayo de RFFIT.

En una realización, la potencia neutralizante del virus de la rabia de las formulaciones de la invención después de 12 meses de almacenamiento a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ es al menos un 80 %, preferentemente al menos un 90 %, más preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 98 %, y que en particular un 100 % de la potencia neutralizante del virus de la rabia de las formulaciones de la invención antes de su almacenamiento. En ciertas realizaciones, la potencia neutralizante del virus de la rabia de las formulaciones de la invención después de 3 meses de almacenamiento a $25 \pm 2^\circ\text{C}$ es al menos un 90 %, preferentemente al menos un 95 %, más preferentemente al menos un 98 %, y en particular un 100 % de la potencia neutralizante del virus de la rabia de las formulaciones de la invención antes de su almacenamiento.

Las formulaciones de acuerdo con la invención comprenden un tensioactivo, también conocido como estabilizante. Los tensioactivos pueden incluir, pero no se limitan a, polisorbatos. La persona experta es consciente de que se pueden usar otros tensioactivos, por ejemplo detergentes no iónicos o iónicos, siempre y cuando sean farmacéuticamente aceptables, es decir, adecuados para su administración a seres humanos. En una realización preferente la invención proporciona una formulación de acuerdo con la invención, en la que el tensioactivo es un polisorbato tal como polisorbato 20, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65 o polisorbato 80, con el polisorbato 80 siendo preferente. En una realización, el polisorbato 80 está presente en las formulaciones en una cantidad de aproximadamente un 0,0005 % en p/v a aproximadamente un 0,05 % en p/v, preferentemente de aproximadamente un 0,005 % en p/v a aproximadamente un 0,03 % en p/v, más preferentemente de aproximadamente un 0,008 % en p/v a aproximadamente un 0,015 % en p/v. En una realización preferente, el polisorbato 80 está presente en una cantidad de aproximadamente un 0,01 % en p/v.

En ciertas realizaciones, la invención proporciona formulaciones de acuerdo con la invención, en las que el tampón de citrato, por ejemplo tampón de deshidrato de citrato sódico (2,5 mg/ml)/monohidrato de ácido cítrico (0,3 mg/ml), está presente a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 25 mM, preferentemente de aproximadamente 7 mM a aproximadamente 20 mM, más preferentemente de aproximadamente 8 mM a aproximadamente 15 mM, y en particular de aproximadamente 9 mM a aproximadamente 12 mM. En una realización preferente, el tampón de citrato está presente a una concentración de aproximadamente 10 mM.

En ciertas realizaciones la invención se refiere a formulaciones de acuerdo con la invención, en las que el pH varía de aproximadamente 5,2 a aproximadamente 6,8, por lo general de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5, preferentemente de aproximadamente 5,7 a aproximadamente 6,3, más preferentemente de aproximadamente 5,8 a aproximadamente 6,2 y en particular de aproximadamente 5,9 a aproximadamente 6,1. En una realización preferente el pH es aproximadamente 6,0.

En una realización no limitante, específica, el agente de tonicidad es el cloruro sódico. Por ejemplo, como agentes de tonicidad también se pueden usar otras sales, o por ejemplo azúcares, y similares, siempre y cuando sean farmacéuticamente aceptables, tal como sabe la persona experta. En ciertas realizaciones de la invención, el agente de tonicidad está presente a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 250 mM, por lo general de aproximadamente 75 mM a aproximadamente 225 mM, preferentemente de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, y más preferentemente de aproximadamente 125 mM a aproximadamente 175 mM. En una realización preferente, el agente de tonicidad está presente a una concentración de aproximadamente 150 mM. En ciertas realizaciones, la osmolalidad de las formulaciones de acuerdo con la invención varía de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg, preferentemente de aproximadamente 270 mOsm/kg a aproximadamente 330 mOsm/kg, más preferentemente de aproximadamente 280 mOsm/kg a aproximadamente 320 mOsm/kg, y en particular de aproximadamente 290 mOsm/kg a aproximadamente 310 mOsm/kg. En una realización preferente, la osmolalidad es aproximadamente 300 mOsm/kg. En otras palabras, las formulaciones preferentemente son sustancialmente isotónicas, es decir, tienen sustancialmente la misma presión osmótica que la

sangre humana. La isotonicidad se puede medir usando osmómetros de tipo presión de vapor o congelación en hielo, por ejemplo. La osmolalidad de las formulaciones de la invención se puede regular, por ejemplo, con uno o más agentes de tonicidad.

La concentración de cada anticuerpo en las formulaciones de la invención está preferentemente entre aproximadamente 0,1 y 2,0 mg/ml, por lo general entre aproximadamente 0,1 y 1 mg/ml. En ciertas realizaciones no limitantes, la concentración de cada anticuerpo es de 0,15 ($\pm 20\%$) mg/ml. En otras realizaciones no limitantes, cada anticuerpo está presente en una concentración de 0,3 ($\pm 20\%$) mg/ml (es decir, un total de 0,6 mg/ml para dos anticuerpos).

En ciertas realizaciones, la proporción (proteína) de los dos anticuerpos está entre 5:1 y 1:5, preferentemente entre 2:1 y 1:2 y en particular a aproximadamente 1:1.

Además, la formulación de acuerdo con la invención puede comprender otros excipientes que incluyen, pero no se limitan a, aminoácidos y sales de los mismos, azúcares, proteínas, diluyentes, agentes solubilizantes, modificadores del pH, agentes calmantes, tampones adicionales, otras sales inorgánicas u orgánicas, antioxidantes, o similares. Preferentemente, sin embargo, las formulaciones de la presente invención no comprenden otros excipientes cerca de un tampón de citrato, un agente de tonicidad y un tensioactivo.

En las formulaciones de acuerdo con la invención, los anticuerpos monoclonales del virus anti-rabia CR57 y CR4098 son estables de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C durante al menos aproximadamente 1 año, por lo general al menos aproximadamente 18 meses. Preferentemente, pueden ser estables a aproximadamente 2-8 °C durante al menos aproximadamente 2 años, más preferentemente 3 años.

Además, los anticuerpos monoclonales del virus anti-rabia son estables en las formulaciones de acuerdo con la invención a aproximadamente 25 ± 2 °C durante al menos aproximadamente 2 meses. Además de eso, los anticuerpos monoclonales del virus anti-rabia son estables en las formulaciones de acuerdo con la invención a aproximadamente 40 ± 2 °C durante al menos 2 semanas.

En ciertas realizaciones, las formulaciones son adecuadas para su administración por vía la intramuscular, por vía intradérmica, por vía subcutánea, inyectadas por vía local en una herida, o una combinación de las mismas. Por lo tanto, las formulaciones son preferentemente estériles. Los métodos para preparar formulaciones estériles se conocen bien en la técnica incluyen filtración a través de membranas de filtración estéril o proceso de autoclave de los ingredientes de la formulación, con la excepción de los anticuerpos, a aproximadamente 120 °C durante aproximadamente 30 minutos, por ejemplo.

En realizaciones preferentes las formulaciones están sustancialmente libres de endotoxinas. Las endotoxinas son complejos de bajo peso molecular de aproximadamente 10 kDa que están asociadas con la pared celular externa de bacterias gram-negativas y pueden producir reacciones pirogénicas después de su administración parenteral a un paciente. Por consiguiente, la FDA ha establecido un límite superior de 5 EU por dosis por kilogramo de peso corporal en un periodo individual de una hora para aplicaciones de fármaco intravenosas (véase, por ejemplo, The United States Pharmacopeial Convention (USP), Pharmacopeial Forum 26 (1): 223 (2000)). En ciertas realizaciones, la formulación tiene una concentración de endotoxina inferior a aproximadamente 5,0 unidades de endotoxina por mililitro (EU/ml) (en el presente documento, una concentración inferior a aproximadamente 5,0 EU/ml se refiere a sustancialmente sin endotoxinas), preferentemente inferior a aproximadamente 2,5 EU/ml, más preferentemente inferior a aproximadamente 1,0 EU/ml, incluso más preferentemente inferior a aproximadamente 0,5 EU/ml y en particular inferior a aproximadamente 0,30 EU/ml. En cierta realización, la formulación tiene una concentración de endotoxina que varía de aproximadamente 0,001 EU/ml a aproximadamente 5,0 EU/ml. Los métodos para la medición de endotoxinas son conocidos por una persona experta en la materia e incluyen, pero no se limitan a, ensayos de coagulación de gel, ensayos turbidimétricos (espectrofotométricos) y ensayos cromogénicos.

La "profilaxis después de la exposición" (PEP) está indicada para personas expuestas posiblemente a un animal con rabia. Las exposiciones posibles incluyen exposición a mordeduras (es decir, cualquier penetración de la piel con los dientes) incluyendo mordeduras de animal, y exposición que no es mordedura. Las formulaciones de acuerdo con la invención se pueden administrar a un sujeto con necesidad de las mismas para su uso en prevención y/o tratamiento, por ejemplo profilaxis después de la exposición, de una infección por el virus de la rabia. Las formulaciones de la invención se pueden usar en conjunto con otras moléculas útiles en diagnóstico, profilaxis y/o tratamiento del virus de la rabia. Por ejemplo, se pueden coadministrar con una vacuna frente al virus de la rabia. Como alternativa, la vacuna también se puede administrar antes o después de la administración de las formulaciones de la invención. La administración de las formulaciones de la invención con una vacuna es adecuada para profilaxis después de la exposición. Las vacunas para la rabia incluyen, pero no se limitan a, vacuna de células embrionarias de pollo purificadas (PCEC) (RabAvert, Rabipur), vacuna de células diploides humanas (HDCV; vacuna Imovax) o vacuna de la rabia adsorbida (RVA). Preferentemente, se administra un solo bolo de las formulaciones de la invención. El régimen de dosificación de profilaxis después de la exposición es la administración de cinco dosis de vacuna de la rabia por vía intramuscular en el músculo deltoides los días 0, 3, 7, 14 y 28 después de la exposición en individuos no inmunizados previamente frente al virus de la rabia. Las formulaciones de acuerdo

con la invención se deberían administrar en y alrededor de las heridas el día 0 o de otro modo tan pronto como fuera posible después de la exposición, con el volumen restante siendo administrado por vía intramuscular en un sitio alejado de la vacuna. A los individuos no vacunados se les avisa de la administración de anticuerpos del virus anti-rabia. Se administra una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo o anticuerpos, cantidad que es eficaz o al menos parcialmente eficaz para PEP de la rabia, es decir, el virus de la rabia se neutraliza.

En un aspecto más la invención proporciona una forma de dosificación unitaria farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una formulación de acuerdo con la invención para tratamiento de profilaxis después de la exposición de un sujeto a través de administración de la forma de dosificación al sujeto. En una realización preferente el sujeto es un ser humano. El ser humano puede ser un adulto o puede ser un niño. La expresión "forma de dosificación unitaria farmacéutica", como se usa en el presente documento, se refiere a una unidad físicamente separada adecuada como dosificaciones unitarias para los sujetos a tratar, con cada unidad conteniendo una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico/profiláctico deseado en asociación con el vehículo, diluyente o excipiente farmacéutico necesario.

La forma de dosificación unitaria puede ser un envase que comprende la formulación. Los envases adecuados incluyen, pero no se limitan a, ampollas, viales, frascos, jeringas y tubos de ensayo cerrados herméticamente. Los envases se pueden formar a partir de una diversidad de materiales tales como vidrio o plástico y pueden tener un puerto de acceso estéril (por ejemplo el envase puede ser un vial que tiene un tapón que se puede perforar con una aguja de inyección hipodérmica). En una realización preferente el envase es un vial. El vial comprende preferentemente un volumen de aproximadamente 0,3 ml a aproximadamente 3 ml. Preferentemente, el vial contiene anticuerpos del virus anti-rabia en una cantidad de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 2,0 mg. En una realización el vial contiene un total of 750-2000 IU de anticuerpos monoclonales neutralizantes del virus de la rabia por vial. Este tipo de vial se puede usar de forma adecuada para administración a un adulto, mientras que un vial que contiene un total de 250-750 IU de anticuerpos monoclonales neutralizantes del virus de la rabia por vial se puede usar de forma adecuada para administración a un niño. Los anticuerpos por lo general se formulan en las formulaciones de la invención en una cantidad terapéuticamente eficaz. Los regímenes de dosificación se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo, una respuesta terapéutica). Un intervalo de dosificación adecuado puede ser, por ejemplo, 10-30 IU/kg de peso corporal, tal como aproximadamente 20 IU/kg de peso corporal.

La forma de dosificación unitaria farmacéutica puede estar presente en un kit, que comprende adicionalmente instrucciones para su uso. El kit puede comprender adicionalmente más envases que comprenden excipientes farmacéuticamente aceptables e incluyen otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, incluyendo filtros, agujas, jeringas. Con los kits pueden estar asociadas instrucciones incluidas normalmente en envases comerciales de productos terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico, que contienen información por ejemplo con respecto a las indicaciones, uso, dosificación, fabricación, administración, contraindicaciones y/o advertencias con respecto al uso de tales productos terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico. En ciertas realizaciones el kit comprenden instrucciones para usar el volumen apropiado necesario para conseguir una dosis de aproximadamente 5 IU/kg a aproximadamente 40 IU/kg, por ejemplo 20 IU/kg.

Además, la presente invención se refiere a un método para mejorar el almacenamiento de dos anticuerpos monoclonales del virus anti-rabia en uno, por ejemplo, una formulación individual formulando los anticuerpos (CR57 y CR4098 o variantes funcionales) en una formulación farmacéutica líquida de acuerdo con la invención. The formulación se puede almacenar a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 40 °C, por ejemplo entre aproximadamente 2-8 °C. Sin embargo, las formulaciones también se pueden almacenar a temperaturas inferiores a 2 °C, por ejemplo a aproximadamente -20 °C, -70 °C, etc. Al almacenar los anticuerpos en las formulaciones específicas de acuerdo con la invención, la cantidad de formación de producto secundario de los anticuerpos se reduce. Por razones prácticas, es preferente almacenar los anticuerpos individuales CR57 y CR4098 congelados, por ejemplo a $-70 \pm 10^\circ$, antes de su mezcla, mientras que el producto final (cóctel de CR57 y CR4098) se almacena preferentemente en forma líquida a $5 \pm 3^\circ\text{C}$.

En un aspecto más la invención también se refiere a formulaciones farmacéuticas líquidas que comprenden un anticuerpo monoclonal del virus anti-rabia individual, es decir, cualquiera de CR57 o CR4098 o una variante funcional de uno de éstos. Preferentemente, estas formulaciones comprenden todas las características y excipientes que se han descrito anteriormente en el presente documento. Por lo tanto, en realizaciones preferentes contienen tampón de citrato (5-25 mM) y tienen un pH 5,5-6,5, por ejemplo aproximadamente 6,0; contienen un agente de tonicidad (por ejemplo, cloruro sódico, 50-250 mM, por ejemplo aproximadamente 150 mM); comprenden un tensioactivo, por ejemplo polisorbato 80 (0,0005 %-0,05 %, por ejemplo aproximadamente un 0,01 %), y son preferentemente sustancialmente isotónicas, estériles y sustancialmente libres de endotoxina. A continuación se indican las características y excipientes que podrían diferenciarse de los descritos anteriormente para formulaciones que comprenden dos anticuerpos monoclonales del virus anti-rabia diferentes.

En ciertas realizaciones, las formulaciones de acuerdo con la invención pueden comprender un anticuerpo monoclonal del virus anti-rabia individual en una cantidad de aproximadamente 0,1 mg/ml a aproximadamente 6,0 mg/ml, por lo general de aproximadamente 1,0 mg/ml a aproximadamente 4,0 mg/ml, por ejemplo de

aproximadamente 2,0 mg/ml a aproximadamente 3,0 mg/ml. En una realización específica, la formulación tiene una potencia de neutralización del virus de la rabia que varía de aproximadamente 300 IU/mg a aproximadamente 1600 IU/mg, por ejemplo de aproximadamente 500 IU/mg a aproximadamente 1250 IU/mg. Las formulaciones que comprenden un anticuerpo individual como se ha descrito anteriormente se pueden combinar/mezcla con otro para obtener las formulaciones de la invención que comprenden dos anticuerpos, es decir, un cóctel de anticuerpos.

Ejemplos

Para ilustrar la invención, se proporcionan los siguientes ejemplos. Los ejemplos no pretenden limitar el alcance de la invención en modo alguno. En general, la práctica de la presente invención usa, a menos que se indique de otro modo, técnicas convencionales de química, biología molecular, tecnología de ADN recombinante, inmunología tal como tecnología de anticuerpos y técnicas convencionales de preparación de polipéptidos como se describe en Sambrook, Fritsch y Maniatis, *Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press* (1989); *Antibody Engineering Protocols (Methods in Molecular Biology)*, volumen 51, Ed.: Paul S., Humana Press (1996); *Antibody Engineering: A Practical Approach (Practical Approach Series, 169)*, Eds.: McCafferty J. *et al.*, Humana Press (1996); *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow y Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999); y *Current Protocols in Molecular Biology*, Eds. Ausubel *et al.*, John Wiley & Sons (1992), por ejemplo.

Las secuencias de aminoácidos de los anticuerpos CR57 y CR4098 se muestran en la Tabla 10. La identificación, planeación, preparación y caracterización de estos anticuerpos del virus anti-rabia neutralizantes se ha descrito con detalle en el documento WO 2005/118644. Los anticuerpos se prepararon a gran escala de una manera esencialmente similar. Un cultivo de partida de células PER.C6 que expresan de forma estable un anticuerpo del virus anti-rabia se descongeló, las células se cultivaron y los cultivos se expandieron y se usaron para inocular un biorreactor. El biorreactor funcionaba primero en modo discontinuo seguido de modo semicontinuo. El medio que contenía el anticuerpo respectivo se cosechó y se aclaró mediante centrifugación y se filtró antes del procesamiento corriente abajo adicional. El proceso de purificación corriente abajo consistía en etapas de cromatografía y filtración convencionales seguido de un intercambio de tampón por intercambio de formulación que carecía de polisorbato 80 y concentración para obtener la concentración deseada del anticuerpo. Después de la adición y filtración de polisorbato 80, la sustancia farmacológica obtenida (cualquiera del anticuerpo CR57 o anticuerpo CR4098) se almacenó a -80 °C hasta su uso adicional. Para la preparación en producto farmacológico, las sustancias farmacológicas se diluyeron con tampón de formulación, las concentraciones del anticuerpo se midieron, y ambas diluciones de anticuerpo se mezclaron y se filtraron antes de la carga final.

Para estudios de estabilidad se prepararon y analizaron diferentes formulaciones de las sustancias farmacológicas (anticuerpos individuales) y el producto farmacológico (cóctel de anticuerpos). Las muestras de las diferentes formulaciones se analizaron a diferentes momentos y temperaturas usando diversos métodos analíticos bien conocidos en la técnica.

Para evaluar los efectos estabilizantes de los diferentes tampones de la formulación en el anticuerpo CR57, el anticuerpo CR4098 y mezclas de los mismos se usaron HPSEC, SDS-PAGE (reducida y no reducida), concentración de proteína (A280), IEF, aspecto, pH, y osmolalidad.

HPSEC se usó en parte para evaluar la presencia de productos de degradación de los anticuerpos debido a agregación o proteólisis. SDS-PAGE se usó en parte para evaluar la integridad del anticuerpo intacto y la presencia de impurezas y productos de degradación potencial. La concentración de proteínas en indio para evaluar el mantenimiento de la concentración de proteína de la formulación dentro de un intervalo aceptable. IEF se usó para evaluar la presencia e integridad de isoformas de anticuerpo que pueden estar presentes en las formulaciones y para controlarlas en el tiempo para evaluar cambios que se pueden producir debido a la desaminación o pérdida de ácido siálico. El aspecto de las formulaciones se observó basándose en inspección visual para claridad, color y la presencia de partículas. El pH se midió para evaluar el mantenimiento del pH de la formulación dentro de un intervalo aceptable de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. La osmolalidad se midió para evaluar el mantenimiento de la osmolalidad de la formulación dentro del intervalo aceptable de aproximadamente 250 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg.

En un primer estudio, se sometieron a ensayo diferentes sistemas de tampón. Para ese fin, las formulaciones de anticuerpos del virus anti-rabia formuladas en tampones de citrato se compararon con formulaciones de anticuerpos del virus anti-rabia formulado en tampones de fosfato. Las formulaciones que comprenden cualquiera de CR57 (0,1 mg/ml), CR4098 (0,15 mg/ml) o una mezcla/cóctel (mezcla a 1:1,5) de CR57 (0,1 mg/ml) y CR4098 (0,15 mg/ml) en un tampón de citrato 20 mM (pH 6,0) o un tampón de citrato 20 mM (pH 6,5) eran estables después de su almacenamiento hasta 4 semanas a 5 ± 3 °C/humedad relativa ambiental, un 25 ± 2 °/60 ± 5 % de humedad relativa y un 40 ± 2 °/75 ± 5 % de humedad relativa como se indica mediante análisis de HPSEC. Todas las formulaciones tenían una pureza de anticuerpo monómero (% de área) > 96 % como se determina mediante HPSEC (véanse las Figuras 1-3). Las formulaciones que comprenden cualquiera de CR57 (0,1 mg/ml), CR4098 (0,15 mg/ml) o una mezcla (mezcla a 1:1,5) de CR57 (0,1 mg/ml) y CR4098 (0,15 mg/ml) en un tampón de fosfato 20 mM (pH 7,0) tenían una pureza de anticuerpo monómero que era significativamente menor después de su almacenamiento hasta 4 semanas a 40 ± 2 °/75 ± 5 % de humedad relativa en comparación con formulaciones en los tampones de citrato

durante el mismo periodo de tiempo y en las mismas condiciones de temperatura (véanse las Figuras 1-3). Cuando el polisorbato 80 (0,01 % en p/v) se añadía al tampón de fosfato, la pureza de anticuerpo monómero disminuía adicionalmente a valores de aproximadamente un 70 % para CR4098 y aproximadamente un 85 % para CR57 y la mezcla después de su almacenamiento hasta 4 semanas a $40 \pm 2^\circ/75 \pm 5$ % de humedad relativa (véanse las Figuras 1-3). Los resultados muestran claramente que la estabilidad de los anticuerpos separados así como la mezcla de anticuerpos es superior en tampones de citrato en comparación con tampones de fosfato. En los tampones de fosfato, los anticuerpos se degradan a través de fragmentación. Los anticuerpos son igualmente estables en formulaciones que comprenden tampones de citrato de pH 6,0 y pH 6,5. Además, se llegó a la conclusión de que la adición de polisorbato 80 en tampones de fosfato causa impurezas de anticuerpo adicionales. Los resultados encontrados con HPSEC se confirmaron con otros métodos de análisis incluyendo IEF y SDS-PAGE (reducir y no reducida) (los datos no se muestran). Basándose en el estudio, se usó citrato como un sistema de tampón.

Para determinar la concentración óptima de tensioactivo de las formulaciones, se analizaron formulaciones basadas en citrato que comprendían diferentes concentraciones de polisorbato 80 (véase la Tabla 1). Las formulaciones se prepararon como sigue a continuación. Los anticuerpos CR57 y CR4098 (sustancias farmacológicas) se prepararon esencialmente como se ha descrito anteriormente. Éstos se filtraron con un filtro de 0,1 μm . La concentración de proteína era la misma que anteriormente y después de filtración, se midió mediante determinación de concentración de proteína A280. La concentración de CR57 era de 2,5 mg/ml y la concentración de CR4098 era de 1,0 mg/ml. A continuación, se preparó un tampón que contenía citrato 10 mM (pH 6,0) y cloruro sódico 50 mM y un tampón que contenía citrato 10 mM (pH 6,0), cloruro sódico 50 mM y polisorbato 80 al 5 %. Las formulaciones se prepararon como se describe en la Tabla 2. El volumen final se alcanzó con un tampón que contenía citrato 10 mM (pH 6,0) y cloruro sódico 50 mM. La osmolalidad de todas las formulaciones se determinó y se añadió cloruro sódico para llevar las formulaciones hasta una osmolalidad de aproximadamente 300 mOsm/kg (isoosmótica), es decir, la concentración final de cloruro sódico en las formulaciones era 150 mM. Por último, todas las formulaciones se filtraron con filtros de 0,22 μm y se rellenaron (400 μl) en tubos Eppendorf de 2 ml para todos los ensayos con la excepción del ensayo de aspecto, estudio de agitación y análisis de pH, en los que se usaron viales de inyección de 5 ml (cargados con 2 ml de muestra) cerrados con tapones de 20 mm y cerrados herméticamente con tapas de aluminio. Las formulaciones se almacenaron en armarios de estabilidad a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ /humedad relativa ambiental, $25 \pm 2^\circ/60 \pm 5$ % de humedad relativa, o $40 \pm 2^\circ/75 \pm 5$ % de humedad relativa. En los momentos indicados, se tomaron dos muestras y se analizaron *in mono* de acuerdo con el programa tal como se muestra en la Tabla 3.

Como ya se ha indicado anteriormente, la concentración de proteína era la misma antes y después de su filtración tal como se mide mediante determinación de concentración de proteína A280.

Los resultados del análisis de HPSEC se muestran en la Tabla 4. Los componentes proteicos se separaron a través de HPSEC usando un método de elución isocrática, que permite un análisis rápido y una resolución elevada de los componentes proteicos y también tiene un aumento de la reproducibilidad. Los resultados muestran que a $t = 0$ semanas todas las formulaciones tenían una pureza tal como se determina por HPSEC de un 98-100 %. Todas las formulaciones presentaban una pureza comparable a $t = 13$ semanas (y todos los momentos intermedios entre $t = 0$ y $t = 13$ semanas) en comparación con $t = 0$ semanas a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ /humedad relativa ambiental (es decir $2-8^\circ\text{C}$ /humedad relativa ambiental), lo que indica estabilidad a esta temperatura durante al menos 13 semanas. Solamente para la formulación 2 la pureza a $t = 8$ y $t = 13$ semanas estaba justo por debajo de un 98 %. Además, a partir de la Tabla 4 se llegó a la conclusión de que a $25 \pm 2^\circ/60 \pm 5$ % de humedad relativa todas las formulaciones en todos los momentos presentaban una pureza superior a un 95 %, lo que indica que los anticuerpos también son estables durante al menos 13 semanas a esta temperatura. A una temperatura elevada de $40 \pm 2^\circ/75 \pm 5$ % de humedad relativa todas las formulaciones presentaban una pureza > 95 % en las primeras semanas, lo que indica que los anticuerpos son estables durante al menos dos semanas a esta temperatura elevada. En todos los momentos más allá de dos semanas, todas las formulaciones presentaban una pureza superior a aproximadamente un 90 %, lo que indica que los anticuerpos son relativamente estables durante al menos 13 semanas a esta temperatura elevada. Las impurezas encontradas con este método incluían agregados y fragmentos de los monómeros de anticuerpo. Los resultados indicaban adicionalmente que las formulaciones con un 0,01 % (p/v) de polisorbato 80 tenían una pureza más elevada que las formulaciones similares con un 0,03 % (p/v) de polisorbato 80 (comparar la pureza de la formulación 1 con 2, formulación 3 con 4, y formulación 5 con 6). Para ambas composiciones de polisorbato se observaron las mismas impurezas.

Los resultados del análisis de SDS-PAGE eran coherentes con los datos encontrados con HPSEC. Sobre la base del análisis de SDS-PAGE no reducida y reducida, las formulaciones almacenadas a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ /humedad relativa ambiental y $25 \pm 2^\circ/60 \pm 5$ % de humedad relativa no presentaban signos de degradación significativa en todos los momentos cuando se comparaban con un patrón de referencia, mientras que se encontró una cierta degradación menor en los diferentes momentos de las formulaciones almacenadas a $40 \pm 2^\circ/75 \pm 5$ % de humedad relativa (los datos no se muestran). No se observaron diferencias para todas las formulaciones entre las diferentes concentraciones de polisorbato 80.

La identificación de las muestras de anticuerpo a través de SDS-PAGE solamente confirma la integridad de los anticuerpos, pero no ilustra su estado nativo o desnaturalizado. IEF ilustra el pI de los anticuerpos y también es útil

en indicar la microheterogenicidad conformacional de los anticuerpos. La combinación de IEF con SDS-PAGE es una poderosa herramienta para la detección de diferencias incluso pequeñas en estructuras y propiedades de anticuerpos. Basándose en los resultados de IEF, para todas las formulaciones no se encontraron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de polisorbato 80 (los datos no se muestran). Cuando las formulaciones se almacenaron a $40 \pm 2^\circ/75 \pm 5\%$ de humedad relativa, se observó degradación menor (lo más probablemente debido a la desamidación) desde el momento $t = 6$ semanas.

ESa inspección visual de la claridad y color de todas las formulaciones almacenadas a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ /humedad relativa ambiental, $25 \pm 2^\circ/60 \pm 5\%$ de humedad relativa y $40 \pm 2^\circ/75 \pm 5\%$ de humedad relativa mostraban que las formulaciones estaban prácticamente libres de partículas hasta $t = 13$ semanas, aunque se observó que esta cantidad de formulaciones con partículas aumentaba ligeramente cuando se almacenaban a temperaturas más elevadas. Las formulaciones que comprenden CR57 y CR4098 y un 0,01 % (p/v) de polisorbato 80 contenían menos partículas en comparación con las formulaciones que comprenden CR57 y CR4098 y un 0,03 % (p/v) de polisorbato 80. El estudio de agitación no indicaba diferencias entre cada una de las formulaciones con respecto al aspecto. Los valores de pH de todas las formulaciones a las temperaturas y periodos de tiempo indicados.

Los valores de osmolalidad de todas las formulaciones presentaban un aumento muy pequeño durante el estudio de estabilidad cuando se mantenía a $25 \pm 2^\circ/60 \pm 5\%$ de humedad relativa y $40 \pm 2^\circ/75 \pm 5\%$ de humedad relativa. No había diferencia significativa entre las formulaciones que comprendían un 0,01 % (p/v) de polisorbato 80 en comparación con las formulaciones que comprendían un 0,03 % (p/v) de polisorbato 80.

En general, los resultados del estudio muestran que los anticuerpos del virus anti-rabia individuales así como mezclas/cócteles de anticuerpos del virus anti-rabia tienen la mejor estabilidad después de 13 semanas a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ /humedad relativa ambiental, $25 \pm 2^\circ/60 \pm 5\%$ de humedad relativa y $40 \pm 2^\circ/75 \pm 5\%$ de humedad relativa en formulaciones basadas en citrato que comprenden un 0,01 % (p/v) de polisorbato 80.

En un estudio adicional, las formulaciones que comprenden citrato (10 mM, pH 6,0), cloruro sódico (150 mM), un 0,01 % (p/v) de polisorbato 80 y el anticuerpo CR57 (1,2 mg/ml) o CR4098 (1,2 mg/ml) individuales se estudiaron cuando se almacenaban en las siguientes dos temperaturas, $5 \pm 3^\circ$ y $-70 \pm 10^\circ\text{C}$. Las formulaciones se rellenaron (250 μl) en tubos de 1,2 ml para análisis de IEF, SDS-PAGE (reducida y no reducida) y HPSEC. Para análisis de pH y aspecto, se usaron tubos de 2 ml rellenos con de 2 ml formulación. Las formulaciones se almacenaron en armarios de estabilidad a $5 \pm 3^\circ$ o $-70 \pm 10^\circ\text{C}$. En los momentos indicados (1, 2 y 3 meses), se tomaron muestras y se analizaron. Los resultados del estudio se pueden encontrar en las Tablas 5 y 6.

El análisis de SDS-PAGE (tanto reducida como no reducida) de formulaciones de CR57 y CR4098 a ambas temperaturas indicaba que la integridad de los anticuerpos permanecía intacta durante un periodo de al menos 3 meses, ya que no se observaban bandas de degradación adicionales en comparación con $t = 0$ meses. Estos resultados se confirmaron con el análisis tanto de IEF como de HPSEC mostrando que la estructura del anticuerpo y el nivel de agregado, respectivamente, después de 3 meses a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ /humedad relativa ambiental o $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ no era diferente de $t = 0$ meses. Además, la concentración de proteína y el pH no cambiaron significativamente con el tiempo. La inspección visual de cada formulación presentaba un líquido incoloro transparente, prácticamente sin partículas.

El análisis de las formulaciones almacenadas a $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ que se sometieron a un ciclo adicional de congelación/descongelación después de 1 mes o 3 meses de almacenamiento no presentaban diferencias en comparación con $t = 0$ meses basándose en los ensayos mencionados anteriormente, es decir, SDS-PAGE (reducida y no reducida), HPSEC, IEF, aspecto, DO280, y pH (los datos no se muestran).

En resumen, los resultados indican que los anticuerpos CR57 y CR4098 son estables a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ /humedad relativa ambiental y a $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ en formulaciones que comprenden tampón de citrato (10 mM, pH 6,0), polisorbato 80 (0,01 % en p/v) y cloruro sódico (150 mM), confirmando de ese modo los resultados descritos anteriormente. Además, un ciclo o área y a la de congelación/descongelación después de almacenamiento a largo plazo ($t = 1$ o $t = 3$ meses) de muestras de anticuerpo almacenadas a $-70 \pm 10^\circ\text{C}$ no tiene influencia en la estabilidad del anticuerpo CR57 o CR4098.

En un estudio de estabilidad similar, se estudiaron formulaciones que comprenden citrato (10 mM, pH 6,0), cloruro sódico (150 mM), un 0,01 % (p/v) de polisorbato 80 y los anticuerpos CR57 (2,47 mg/ml) o CR4098 (2,48 mg/ml) individuales cuando se almacenaban a dos temperaturas diferentes, es decir, $5 \pm 3^\circ$ y $-70 \pm 10^\circ$, durante un periodo de tiempo incluso más largo que 3 meses. Las formulaciones se filtraron a través de un filtro de 0,22 μm y se rellenaron en tubos de polipropileno (4 ml). Además, la combinación de CR57 y CR4098 a una proporción de 1:1 basándose en el contenido de proteína (0,3 mg/ml de cada anticuerpo dando como resultado una concentración total de proteína de 0,6 mg/ml) se estudió cuando se almacenaba en dos temperaturas diferentes, es decir, $5 \pm 3^\circ$ y $-70 \pm 10^\circ$, hasta 6 meses. Las formulaciones que comprenden el cóctel/mezcla de anticuerpos se filtraron a través de un filtro de 0,22 μm y se rellenaron en viales de vidrio (2,6 ml). Las formulaciones se sometieron a ensayo usando los siguientes métodos de análisis: SDS-PAGE (reducida y no reducida), IEF, HPSEC, RFFIT, aspecto, pH (véanse la Tablas 7 y 8). Las formulaciones con la combinación de CR57/CR4098 también se sometieron a ensayo mediante

ELISA kappa/lambda y osmolalidad (véase la Tabla 9). Además, a $t = 0$ meses, se determinaron los niveles de endotoxina de las formulaciones que comprenden los anticuerpos individuales o el cóctel de anticuerpos. Los niveles de endotoxina se evaluaron con un ensayo de Lisado de Amebocitos del Limulus (LAL) usando una técnica de coagulación de gel. La formulación que comprende CR57 contenía $< 0,30$ EU/ml, la formulación que comprende CR4098 contenía $< 0,30$ EU/ml y la formulación que contiene el cóctel de ambos anticuerpos contenía $< 0,24$ EU/ml. Las formulaciones se almacenaron en armarios de estabilidad a $-70 \pm 10^\circ$, $5 \pm 3^\circ$, $25 \pm 2^\circ$ o $40 \pm 2^\circ$ °C durante los periodos de tiempo indicados.

Las formulaciones que contienen el anticuerpo individual se analizaron durante un periodo de 6 meses y se compararon con los resultados iniciales obtenidos a $t = 0$ meses. Los patrones de bandas de IEF y SDS-PAGE de las formulaciones de CR57 y CR4098 almacenadas a $-70 \pm 10^\circ$ °C y $5 \pm 3^\circ$ durante 1, 2, 3, y 6 meses eran comparables con los patrones de bandas de las formulaciones de CR57 y CR4098 a $t = 0$ meses, respectivamente (véanse la Tablas 7 y 8). No se detectaron bandas adicionales. Los patrones de HPSEC de ambos anticuerpos almacenados a $-70 \pm 10^\circ$ °C y $5 \pm 3^\circ$ durante 6 meses se comparaban bien con el almacenamiento a $t = 0$ meses. La especificación de diana de "área de pico principal $> 95\%$ " se satisfizo en todos los casos. El pico del dímero permaneció $< 1\%$ (área superficial) y no se detectaron picos de degradación en ninguna de las muestras sometidas a ensayo.

Basándose en los resultados obtenidos con estos tres métodos, se llegó a la conclusión de que no se producía degradación tanto de CR57 como de CR4098 durante 6 meses de almacenamiento a $-70 \pm 10^\circ$ °C y $5 \pm 3^\circ$ en las formulaciones indicadas.

Además, el contenido de proteína y el pH of CR57 y CR4098 eran estables en las formulaciones con respecto al periodo de tiempo sometido a ensayo de 6 meses, tanto a $-70 \pm 10^\circ$ °C como a $5 \pm 3^\circ$ °C. El análisis de potencia (ensayo de RFFIT) indicaba un aumento del valor de la potencia para ambos anticuerpos en los momentos de 2, 3, y 6 meses en comparación con los momentos $t = 0$ meses y $t = 1$ mes en ambas condiciones de ensayo (es decir, $-70 \pm 10^\circ$ °C y $5 \pm 3^\circ$ °C). Este aumento de potencia evidente estaba causado por una muestra de control de SRIG inestable que se usó como una referencia positiva en el ensayo (véase Laboratory techniques in rabies, Editado por: F.-X. Meslin, M.M. Kaplan y H. Koprowski (1996), 4ª edición de, Capítulos 15-17, Organización Mundial de la Salud, Ginebra). El efecto se eliminó mediante la expresión de los resultados como titulaciones de punto final de neutralización de un 50 % (los datos no se muestran). Basándose en estos resultados, se llegó a la conclusión de que CR57 y CR4098 muestran titulaciones de punto final estables, por lo tanto una potencia estable, hasta al menos 6 meses en ambas condiciones de almacenamiento en las formulaciones indicadas.

En resumen, basándose en los resultados, se considera que CR57 y CR4098 son estables durante al menos 6 meses en la condición de almacenamiento en tiempo real de $-70 \pm 10^\circ$ °C así como al menos 6 meses en la condición acelerada de $5 \pm 3^\circ$ °C en formulaciones que comprenden citrato (10 mM, pH 6,0), cloruro sódico (150 mM) y un 0,01 % (p/v) de polisorbato 80.

La estabilidad se analizó después de periodos de tiempo más largos. Basándose en los resultados de estabilidad obtenidos con SDS-PAGE (NR+R), IEF, HP-SEC, RFFIT, y DO280 se llegó a la conclusión de que tanto CR57 como CR4098 son estables durante al menos 18 meses en la condición de almacenamiento de $-70 \pm 10^\circ$ °C así como al menos durante 12 meses (se encontraron resultados similares después de 9 meses, los datos no se muestran) en la condición acelerada de $5 \pm 3^\circ$ °C en formulaciones que comprenden citrato (10 mM, pH 6,0), cloruro sódico (150 mM) y un 0,01 % (p/v) de polisorbato 80.

Las formulaciones que contienen el cóctel de anticuerpos CR57 y CR4098 se analizaron durante un periodo de tiempo de 6 meses y se compararon con los resultados iniciales obtenidos a $t = 0$ meses. Después de 6 meses, el aspecto del cóctel almacenado a $5 \pm 3^\circ$ y $25 \pm 2^\circ$ °C permanecía dentro de las especificaciones de diana, es decir, el cóctel/mezcla era un líquido transparente e incoloro, prácticamente sin partículas (véase la Tabla 9). Además, se observó que el cóctel de anticuerpos permanecía dentro de las especificaciones de diana cuando se almacenan hasta 3 meses a $40 \pm 2^\circ$ °C.

El pH y la osmolalidad se controlaron a $t = 0$ y $t = 6$ meses durante $5 \pm 3^\circ$ y a $25 \pm 2^\circ$ y en el momento de 1 y 3 meses para el estudio a $40 \pm 2^\circ$ °C. Todos los datos están dentro de las especificaciones de diana.

Además, el cóctel de anticuerpos presenta una potencia estable hasta 6 meses a $5 \pm 3^\circ$ y $25 \pm 2^\circ$ (véase la Tabla 9). Un valor de potencia ligeramente menor se obtuvo después de 3 meses a $40 \pm 2^\circ$ °C. Todos los datos están dentro de la especificación de diana de aproximadamente 380 a aproximadamente 1350 IU/ml.

La cantidad de proteína total presente en el cóctel de anticuerpos tal como se determina con DO280 era estable con respecto al periodo de tiempo sometido a ensayo de 3 meses a $40 \pm 2^\circ$ °C, y 6 meses a $5 \pm 3^\circ$ y $25 \pm 2^\circ$ °C.

Los resultados de ELISA de IgG kappa y lambda (es decir, presentados como la proporción de ambos anticuerpos en el cóctel de anticuerpos) permanecían dentro de las especificaciones de diana para hasta 6 meses a $5 \pm 3^\circ$ y para hasta 3 meses a $40 \pm 2^\circ$ °C. Basándose en estos resultados, se llegó a la conclusión de que el contenido de CR57 y

CR4098 en el cóctel de anticuerpos no cambia con un periodo de tiempo de 6 meses a $5 \pm 3^\circ$ y $25 \pm 2^\circ$ y 3 meses a $40 \pm 2^\circ$ °C. El patrón de gel de IEF del cóctel de anticuerpos almacenado a $5 \pm 3^\circ$ durante 6 meses era comparable con el de $t = 0$ meses (véase la Tabla 9). Una banda adicional se observó después de 3 y 6 meses en las muestras almacenadas a $25 \pm 2^\circ$ y varias bandas adicionales se detectaron después de 1 y 3 meses en las muestras almacenadas a $40 \pm 2^\circ$ °C (véase la Tabla 9). Estas bandas adicionales obtenidas a temperaturas de almacenamiento elevadas podrían ser primeras indicaciones de degradación.

Después de 6 meses, los patrones de formación de bandas de SDS-PAGE (reducida y no reducida) del cóctel de anticuerpos almacenado a $5 \pm 3^\circ$ eran comparable con el patrón de formación de bandas a $t = 0$ meses (véase la Tabla 9). No se detectaron bandas adicionales. El cóctel de anticuerpos almacenado a $25 \pm 2^\circ$ hasta 3 meses presentaba, en condiciones de SDS-PAGE reductora, un patrón de formación de bandas idéntico al patrón de formación de bandas a $t = 0$ meses. En condiciones no reductoras, se observó una banda débil con un tamaño de aproximadamente 43 kDa después de un periodo de almacenamiento de 3 meses a $25 \pm 2^\circ$ °C. Después de 6 meses el análisis de almacenamiento a $25 \pm 2^\circ$ por SDS-PAGE reductora y no reductora presentaba bandas débiles a ~40 kDa. Un resultado similar se obtuvo con el análisis de SDS-PAGE (tanto reducida como la reducida) para el cóctel de anticuerpos almacenado a $40 \pm 2^\circ$ °C. Además, se detectaron bandas similares con un tamaño de 10-15 kDa bajo esta condición de almacenamiento. Basándose en estos resultados, se llegó a la conclusión de que a $25 \pm 2^\circ$ y $40 \pm 2^\circ$ °C se podría producir con el tiempo una cierta degradación de las cadenas pesadas y/o ligeras de CR57 y CR4098.

Los patrones de HPSEC del cóctel de anticuerpos almacenado a $5 \pm 3^\circ$ y $25 \pm 2^\circ$ hasta 6 meses se comparan bien con el patrón a $t = 0$ meses. La especificación de diana de "área de pico principal > 95 %" se satisfizo en todos los casos (véase la Tabla 9). El pico del dímero permaneció < 1 % (área superficial) y no se detectaron picos de degradación en ninguna de las muestras sometidas a ensayo. El cóctel de anticuerpos almacenado a $40 \pm 2^\circ$ °C presenta una degradación menor después de 3 meses así como un pico del dímero ligeramente aumentado (2,6 % (área superficial)) en comparación con los cócteles de anticuerpos almacenados a las dos temperaturas más bajas. Sin embargo, incluso a $40 \pm 2^\circ$ °C, la especificación de diana de "área de pico principal > 95 %" se satisfizo en todos los periodos de tiempo de almacenamiento sometidos a ensayo (véase la Tabla 9).

Basándose en los resultados obtenidos con los últimos tres métodos se llegó a la conclusión de que no se producía degradación significativa de los anticuerpos en el cóctel de anticuerpos durante el almacenamiento durante 6 meses a $5 \pm 3^\circ$ o $25 \pm 2^\circ$ °C, mientras que se observa una cierta agregación y degradación menores después de su almacenamiento hasta 3 meses a $40 \pm 2^\circ$ °C.

En resumen, se llegó a la conclusión de que el cóctel de anticuerpos es estable durante al menos 6 meses en las condiciones de almacenamiento de $5 \pm 3^\circ$ °C y $25 \pm 2^\circ$ y durante al menos 3 meses en la condición de almacenamiento de $40 \pm 2^\circ$ °C.

Basándose en los resultados después de 12 meses (se obtuvieron resultados similares después de 9 meses, los datos no se muestran) obtenidos con SDS-PAGE (NR+R), IEF, HP-SEC, RFFIT, ELISA kappa/lambda, se llegó a la conclusión de que el cóctel de anticuerpos es estable durante al menos 12 meses en la condición de almacenamiento de $5 \pm 3^\circ$ °C.

Basándose en los resultados después de 18 meses obtenidos con los ensayos analíticos (SDS-PAGE, IEF, HP-SEC, ELISA; los datos no se muestran), se llegó a la conclusión de que el cóctel de anticuerpos es estable durante al menos 18 meses en la condición de almacenamiento de $5 \pm 3^\circ$ °C.

Tabla 1: Composición de las formulaciones de anticuerpo

Número	Anticuerpo	Tampón citrato (mM)	NaCl (mM)	(% en p/v)	pH
1	0,3 mg/ml de CR57	10	150	0,01	6,0
2	0,3 mg/ml de CR57	10	150	0,03	6,0
3	0,3 mg/ml de CR4098	10	150	0,01	6,0
4	0,3 mg/ml de CR4098	10	150	0,03	6,0
5	0,3 mg/ml de CR57 + 0,3 mg/ml de CR4098	10	150	0,01	6,0
6	0,3 mg/ml de CR57 + 0,3 mg/ml de CR4098	10	150	0,03	6,0

Tabla 2. Preparación de las formulaciones

Número	Anticuerpo CR57 (2,5 mg/ml) (ml)	Anticuerpo CR4098 (1,0 mg/ml) (ml)	Polisorbato 80 al 5 % en p/v (ml)	Volumen final (ml)
1	4,20	0,00	0,70	35,00
2	4,20	0,00	2,10	35,00

Número	Anticuerpo CR57 (2,5 mg/ml) (ml)	Anticuerpo CR4098 (1,0 mg/ml) (ml)	Polisorbato 80 al 5 % en p/v (ml)	Volumen final (ml)
3	0,00	10,50	0,70	35,00
4	0,00	10,50	2,10	35,00
5	4,20	10,50	0,70	35,00
6	4,20	10,50	2,10	35,00

Tabla 3. Análisis de muestras de las diversas formulaciones en los momentos indicados y con los métodos indicados

Momentos (semanas)	5 ± 3 °C/humedad relativa ambiental	humedad relativa ambiental 25 ± 2°/60 ± 5 %	humedad relativa ambiental 40 ± 2°/75 ± 5 %
0	A-G	A-G	A-G
2	B, E	B, E	B, E
6	B-E	B-E	B-E
8	B-E	B-E	B-E
13	C-E	C-E	C-E

A: Concentración de proteína (A280)
 B: HPSEC
 C: SDS-PAGE (reducida y no reducida)
 D: IEF
 E: Aspecto
 F: pH
 G: Osmolalidad

Tabla 4. Pureza de anticuerpo monómero (% de área) tal como se determina con HPSEC

Número	Temperatura	t = 0 semanas	t = 2 semanas	t = 6 semanas	t = 8 semanas	t = 13 semanas
1	5 ± 3 °C/humedad relativa ambiental	98,9	ND	98,7	98,5	98,6
	25 ± 2°/60 ± 5 % de humedad relativa	98,9	ND	98,4	98,2	96,7
	40 ± 2°/75 ± 5 % de humedad relativa	98,9	98,0	93,7	94,3	90,4
2	5 ± 3 °C/humedad relativa ambiental	98,3	ND	98,2	96,9	97,6
	25 ± 2°/60 ± 5 % de humedad relativa	98,3	ND	97,5	96,9	95,4
	40 ± 2°/75 ± 5 % de humedad relativa	98,3	97,5	93,4	94,1	89,9
3	5 ± 3 °C/humedad relativa ambiental	100	ND	100	100	99,9
	25 ± 2°/60 ± 5 % de humedad relativa	100	ND	99,4	99,5	97,9
	40 ± 2°/75 ± 5 % de humedad relativa	100	99,4	92,3	94,2	91,8
4	5 ± 3 °C/humedad relativa ambiental	98,6	ND	99,1	97,9	98,6
	25 ± 2°/60 ± 5 % de humedad relativa	98,6	ND	98,5	97,8	96,8
	40 ± 2°/75 ± 5 % de humedad relativa	98,6	98,5	91,9	94,4	91,6
5	5 ± 3 °C/humedad relativa ambiental	99,4	ND	99,2	99,3	99,2
	25 ± 2°/60 ± 5 % de humedad relativa	99,4	ND	98,4	98,7	97,4
	40 ± 2°/75 ± 5 % de humedad relativa	99,4	98,4	91,6	93,6	89,5
6	5 ± 3 °C/humedad relativa ambiental	99,3	ND	99,1	98,8	99,0
	25 ± 2°/60 ± 5 % de humedad relativa	99,3	ND	98,1	98,3	96,9
	40 ± 2°/75 ± 5 % de humedad relativa	99,3	98,4	91,6	93,8	90,6

ND: No determinado

5

Tabla 5. Análisis de muestras de las diversas formulaciones en los momentos indicados y con los métodos indicados

Anticuerpo (temp. de almacenamiento)	SDS-PAGE reducida				SDS-PAGE no reducida				% de monómero por HPSEC				IEF			
Meses	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
CR57 (5 ± 3 °C)	-	-	-	-	-	-	-	-	98,9	98,5	98,2	98,3	-	-	-	-
CR57 (-70 ± 10 °C)	-	-	-	-	-	-	-	-	98,9	98,5	98,3	98,4	-	-	-	-

Anticuerpo (temp. de almacenamiento)	SDS-PAGE reducida				SDS-PAGE no reducida				% de monómero por HPSEC				IEF			
Meses	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
CR4098 (5 ± 3 °C)	-	-	-	-	-	-	-	-	99,7	99,4	99,2	99,6	-	-	-	-
CR4098 (-70 ± 10 °C)	-	-	-	-	-	-	-	-	99,7	98,9	99,5	99,6	-	-	-	-
-: Ninguna banda inesperada detectada																

Tabla 6 Análisis de muestras de las diversas formulaciones en los momentos indicados y con los métodos indicados

Anticuerpo (temp. de almacenamiento)	A280 mg/ml (% de A320/A280)				Aspecto				pH			
Meses	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
CR57 (5 ± 3 °C)	1,33 0,40 %	1,40 0,74 %	1,40 1,01 %	1,42 0,59 %	+	+	+	+	6,0	ND	ND	5,9
CR57 (-70 ± 10 °C)	1,33 0,40 %	1,34 1,42 %	1,34 0,60 %	1,34 0,62 %	+	+	+	+	6,0	ND	ND	6,0
CR4098 (5 ± 3 °C)	1,21 0,67 %	1,22 1,02 %	1,31 1,21 %	1,29 0,98 %	+	+	+	+	6,1	ND	ND	6,1
CR4098 (-70 ± 10 °C)	1,21 0,67 %	1,21 1,49 %	1,20 1,37 %	1,24 0,97 %	+	+	+	+	6,1	ND	ND	6,1
+: Aprobado (incolore transparente y prácticamente sin partículas)												
ND: no determinado												

Tabla 7. Ensayo de estabilidad de CR57

Ensayo	Especificación de diana	condición de almacenamiento	t = 0	1 mes	3 meses	6 meses	12 meses	18 meses
pH	6 ± 0,5	-70 °C	6,1	ND	ND	6,1	6,0	6,1
		5 °C	ND	ND	ND	6,1	6,0	ND
Aspecto	Líquido incoloro transparente, prácticamente sin partículas	-70 °C	+	+	+	+	+	+
		5 °C	+	+	+	+	+	ND
Cantidad por DO280	1-5 mg/ml	-70 °C	2,47	2,57	2,47	2,57	2,55	2,48
		5 °C	ND	2,55	2,27	2,68	2,59	ND
SDS-PAGE no reducida	Patrón de bandas de acuerdo con N.º de WS y no contiene bandas de impureza adicional	-70 °C	+	+	+	+	+	+
		5 °C	ND	+	+	+	+	ND
SDS-PAGE reducida	Patrón de bandas de acuerdo con N.º de WS y no contiene bandas de impureza adicional	-70 °C	+	+	+	+	+	+
		5 °C	ND	+	+	+	+	ND
IEF	Patrón de bandas de acuerdo con N.º de WS (bandas adicionales a informar)	-70 °C	+	+	+	+	+	+
		5 °C	ND	+	+	+	+	ND
HP-SEC	Pico principal por % de área > 95 %	-70 °C	99,5	99,7	99,4	99,7	99,8	99,7
		5 °C	ND	99,6	99,4	99,6	99,4	ND
Potencia	500-1250 IU/mg	-70 °C	937	974	1581	2130	927	1440
		5 °C	ND	922	1523	1629	1054	ND

ND: No determinado
N.º: Patrón de Trabajo de CR57 (WS) y WS de CR4098
+: De acuerdo con la especificación de diana

Tabla 8 Ensayo de estabilidad de CR4098

Ensayo	Especificación de diana	condición de almacenamiento	0 meses	1 mes	3 meses	6 meses	12 meses	18 meses
pH	6 ± 0,5	-70 °C	6,1	ND	ND	6,1	6,0	6,1
		5 °C	ND	ND	ND	6,1	6,0	ND
Aspecto	Líquido incoloro transparente, prácticamente sin partículas	-70 °C	+	+	+	+	+	+
		5 °C	+	+	+	+	+	ND
Cantidad por DO280	1-5 mg/ml	-70 °C	2,48	2,58	2,49	2,57	2,56	2,41
		5 °C	ND	2,65	2,52	3,03	2,76	ND
SDS-PAGE no reducida	Patrón de bandas de acuerdo con N.º de WS y no contiene bandas de impureza adicional	-70 °C	+	+	+	+	+	+
		5 °C	ND	+	+	+	+	ND
SDS-PAGE reducida	Patrón de bandas de acuerdo con N.º de WS y no contiene bandas de impureza adicional	-70 °C	+	+	+	+	+	+
		5 °C	ND	+	+	+	+	ND
IEF	Patrón de bandas de acuerdo con N.º de WS (bandas adicionales a informar)	-70 °C	+	+	+	+	+	+
		5 °C	ND	+	+	+	+	ND
HP-SEC	Pico principal por % de área > 95 %	-70 °C	99,6	99,7	99,7	99,8	99,7	99,7
		5 °C	ND	99,7	99,5	99,5	99,3	ND
Potencia	500-1250 IU/mg	-70 °C	924	971	1698	1695	991	1093
		5 °C	ND	897	1434	1645	1093	ND

ND: No determinado
N.º: Patrón de Trabajo de CR57 (WS) y WS de CR4098
+: De acuerdo con la especificación de diana

Tabla 9: Ensayo de estabilidad de cóctel de anticuerpos

Ensayo	Especificación de diana	Condición de almacenamiento	t = 0 meses	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses	12 meses
Osmolalidad	300 ± 50 mOsmol/kg	5 °C	307	ND	ND	ND	310	315
		25 °C	ND	ND	ND	ND	314	ND
		40 °C	ND	308	ND	312	ND	ND
pH	6 ± 0,5	5 °C	5,7	ND	ND	ND	5,7	5,7
		25 °C	ND	ND	ND	ND	5,7	ND
		40 °C	ND	5,7	ND	5,8	ND	ND
Aspecto	Líquido incoloro transparente, prácticamente sin partículas	5 °C	+	+	+	+	+	+
		25 °C	ND	+	+	+ ¹	+	ND
		40 °C	ND	+	ND	+	ND	ND
Cantidad por DO280	0,48-0,72 mg/ml	5 °C	0,60	0,60	0,60	0,61	0,60	0,61
		25 °C	ND	0,61	0,60	0,60	0,60	ND
		40 °C	ND	0,62	ND	0,60	ND	ND
Proporción de CR57/ R4098	0,6-1,4	5 °C	0,9	0,8	0,9	0,9	0,9	1,0
		25 °C	ND	0,8	0,9	0,9	0,9	ND
		40 °C	ND	0,8	ND	0,9	ND	ND
SDS-PAGE no reducida	Patrón de bandas comparable con N.º	5 °C	+	+	+	+	+	+
		25 °C	ND	+	+	+ ²	+ ⁴	ND

Ensayo	Especificación de diana	Condición de almacenamiento	t = 0 meses	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses	12 meses
	de WS y no contiene bandas de impureza adicional	40 °C	ND	+ ²	ND	+ ³	ND	ND
SDS-PAGE reducida	Patrón de bandas comparable con N.º de WS y no contiene bandas de impureza adicional	5 °C	+	+	+	+	+	+
		25 °C	ND	+	+	+	+ ⁴	ND
		40 °C	ND	+ ²	ND	+ ⁵	ND	ND
HP-SEC	Pico principal por % de área > 95 %	5 °C	99,6	100	99,5	99,5	99,9	99,2
		25 °C	ND	99,6	99,5	99,5	99,4	ND
		40 °C	ND	99,0	ND	95,1 (pico de degr. de 2,6 %)	ND	ND
IEF	Patrón de bandas de acuerdo con N.º de WS (bandas adicionales a informar)	5 °C	+	+	+	+	+	+
		25 °C	ND	+	+	+ ⁶	+ ⁷	ND
		40 °C	ND	+ ⁸	ND	+ ⁹	ND	ND
Potencia	380-1350 IU/mg	5 °C	1006	933	1089	1401	999	830
		25 °C	ND	937	1015	1001	847	ND
		40 °C	ND	807	ND	621	ND	ND
Esterilidad	Cumple los requisitos	5 °C	+	ND	ND	ND	ND	+

ND: No determinado

N.º: Patrón de Trabajo (WS) de CR57 y cóctel de anticuerpos de CR4098

+: De acuerdo con la especificación de diana

+1: Líquido incoloro transparente, > 10 partículas/ml

+2: Patrón de bandas comparable con N.º de WS y contiene banda de impureza adicional débil con un tamaño de aproximadamente 43 kDa

+3: Patrón de bandas comparable con N.º de WS y contiene bandas de impurezas adicionales débiles con un tamaño de aproximadamente 10, 15 y 43 kDa

+4: Desviado, aparecen bandas débiles a aproximadamente 40 kDa

+5: Patrón de bandas comparable con N.º de WS y contiene bandas de impurezas adicionales débiles con un tamaño de aproximadamente 10 kDa, 15 kDa y entre 25-50 kDa

+6: Patrón de bandas de acuerdo con N.º de WS; intensidad de tinción de las bandas más elevada en el área de pl de 8,0-8,5

+7: Desviado, aparecen bandas por debajo de pl de 7,5, intensidad de tinción diferente en el área de pl de 8,0-8,5

+8: Patrón de bandas de acuerdo con N.º de WS y bandas adicionales débiles (pl de 7,2, 7,3, 8,6)

+9: Patrón de bandas de acuerdo con N.º de WS y bandas adicionales débiles (intervalo de pl de 6,3-7,4 y pl de 8,6)

Tabla 10. Secuencias de CR57 y CR4098

A. CR57

cadena pesada (SEQ ID NO: 1)

```

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGFTN RYTVNWVRQA PGQGLEWMGG IIPFGTANY      60
AQRFGRLTI TADESTSTAY MELSSLRSDD TAVYFCAREN LDNSGTYYF SGWFDPWGQG      120
TLVTVSSAST KGPSVFPLAP SSKSTSGGTA ALGCLVKDYF PEPVTVSWNS GALTSGVHTF      180
PAVLQSSGLY SLSSVTVTPS SSLGTQTYIC NVNHKPSNTK VDKRVEPKSC DKHTCPCPCP      240
APELLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK      300
PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALEP PIEKTISKAK GQPREPQVYT      360
LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL      420
TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK      457

```

cadena ligera (SEQ ID NO: 2)

```

QSALTQPRSV SGSPGQSVTI SCTGTSSDIG GYNFVSWYQQ HPGKAPKLM IYDATKRPSGV      60
PDRFSGSKSG NTASLTISGL QAEDEADYYC CSYAGDYTPG VVFGGGLT VLGQPKAAP      120
VTLFPPSSEE LQANKATLVC LISDFYPGAV TVAWKADSSP VKAGVETTP SKQSNKYYAA      180
SSYLSLTPEQ WKSHRSYSCQ VTHEGSTVEK TVAPTECS      218

```

B. CR4098

cadena pesada (SEQ ID NO: 3)

QVQLVESGGG	AVQPGRSLRL	SCAASGFTFS	SYGMHWVRQA	PGKGLEWVAV	ILYDGSDFY	60
ADSVKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	TAVYYCAKVA	VAGTHFDYWG	QGTLLTVSSA	120
STKGPSVFPL	APSSKSTSGG	TAALGCLVKD	YFPEPVTWSW	NSGALTSGVH	TFFAVLQSSG	180
LYSLSSVTV	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSN	TKVDKRVPEK	SCDKTHTCPP	CPAPPELLGGP	240
SVFLFPPKPK	DTLMISRTPE	VTCVVDVSH	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS	300
TYRVSVLTIV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL	PAPIEKTISK	AKGQPREPQV	YTLPPSREEM	360
TKNQVSLTCL	VKGFPYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTPPVVL	DSGGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	420
QGNVFSCSVM	HEALHNHYTQ	KSLSLSPGK				449

cadena ligera (SEQ ID NO: 4)

DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQGIR	NDLGWYQQKP	GKAPKLLIYA	ASSLQSGVPS	60
RFGSGSGSTD	FTLTISLQP	EDFATYYCQQ	LNSYPPTFGG	GTKVEIKTVA	APSVFIFPPS	120
DEQLKSGTAS	VVCLLNNFYP	REAKVQWKVD	NALQSGNSQE	SVTEQDSKDS	TYSLSSLTTL	180
SKADYEKHKV	YACEVTHQGL	SSPVTKSFNR	GEC			213

Listado de Secuencias

- | | |
|----|---|
| 5 | <110> crucell Holland B.V. Marissen, willem Egbert Bakker, Alexander Berthold Hendrik |
| | <120> Formulaciones líquidas de anticuerpo anti-rabia |
| | <130> 0148 WO 00 ORD |
| 10 | <150> EP 06125400.9 |
| | <151> 05-12-2006 |
| | <150> US 60/872.892 |
| | <151> 05-12-2006 |
| 15 | <160> 4 |
| | <170> PatentIn versión 3.5 |
| 20 | <210> 1 |
| | <211> 457 |
| | <212> PRT |
| | <213> <i>Homo sapiens</i> |
| 25 | <220> |
| | <221> cadena pesada CR57 |
| | <222> (1)..(457) |
| | <400> 1 |

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Arg Phe
 50 55 60
 Gln Gly Arg Leu Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95
 Ala Arg Glu Asn Leu Asp Asn Ser Gly Thr Tyr Tyr Tyr Phe Ser Gly
 100 105 110
 Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120 125
 Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
 130 135 140

Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
 145 150 155 160
 Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
 165 170 175
 Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
 180 185 190
 Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
 195 200 205
 Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg
 210 215 220
 Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
 225 230 235 240
 Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
 245 250 255
 Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
 260 265 270
 Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
 275 280 285
 Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
 290 295 300
 Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
 305 310 315 320
 Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
 325 330 335
 Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
 340 345 350
 Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met
 355 360 365
 Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
 370 375 380
 Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
 385 390 395 400
 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
 405 410 415

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
420 425 430

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
435 440 445

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455

<210> 2
<211> 218
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> cadena ligera CR57
<222> (1)..(218)

<400> 2

Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15

Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Ile Gly Gly Tyr
20 25 30

Asn Phe Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Met Ile Tyr Asp Ala Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Cys Ser Tyr Ala Gly Asp
85 90 95

Tyr Thr Pro Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
115 120 125

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
130 135 140

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
145 150 155 160

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
165 170 175

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
180 185 190

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
195 200 205

Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
210 215

<210> 3
<211> 449
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<220>
<221> cadena pesada CR4098
<222> (1)..(449)

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Ala 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 Val Ile Leu Tyr Asp Gly Ser Asp Lys Phe 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

Ala Lys Val Ala Val Ala Gly Thr His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

Lys

<210> 4
 <211> 213
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<220>
 <221> cadena ligera CR4098
 <222> (1)..(213)

<400> 4

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1      5      10
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Asp
20     25     30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35     40     45
Tyr Ala Ala Ser Ser 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 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Asn Ser Tyr Pro Pro
85     90     95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Thr Val Ala Ala Pro
100    105    110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115    120    125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130    135    140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145    150    155    160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165    170    175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
180    185    190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195    200    205

Asn Arg Gly Glu Cys
210
    
```

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica de dos anticuerpos monoclonales anti-rabia que es estable durante al menos 12 meses a una temperatura entre 2 °C y 8 °C, que comprende:
 - (i) anticuerpo monoclonal del virus anti-rabia CR57 (cadena pesada SEQ ID NO: 1 y cadena ligera SEQ ID NO: 2), o un anticuerpo que tiene una homología de secuencia de al menos un 95 % con el mismo y que es capaz de competir por una unión a la diana reconocida por CR57 y que tiene actividad de neutralización del virus de la rabia; y
 - (ii) anticuerpo monoclonal del virus anti-rabia CR4098 (cadena pesada SEQ ID NO: 3 y cadena ligera SEQ ID NO: 4), o un anticuerpo que tiene una homología de secuencia de al menos un 95 % con el mismo y que es capaz de competir por una unión a la diana reconocida por CR4098 y que tiene actividad de neutralización del virus de la rabia;
- en la que la formulación comprende un tampón de citrato a una concentración de 5 mM a 25 mM, preferentemente 10 mM, cloruro sódico a una concentración de 50 mM a 250 mM, preferentemente 150 mM, y polisorbato 80 en una cantidad de 0,005 % en p/v a 0,05 % en p/v, y en la que el pH varía de 5,5 a 6,5, preferentemente en la que el pH es 6,0.
2. Una formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la osmolalidad de la formulación varía de 250 mOsm/kg a 350 mOsm/kg, preferentemente en la que la osmolalidad es 300 mOsm/kg.
3. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que cada uno de los dos anticuerpos monoclonales del virus anti-rabia está presente en una cantidad de 0,1 mg/ml a 2,0 mg/ml.
4. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación tiene una potencia de neutralización del virus de la rabia que varía de 250 IU/ml a 1500 IU/ml.
5. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la proporción de los dos anticuerpos está entre 5:1 y 1:5, preferentemente entre 2:1 y 1:2, por ejemplo 1:1.
6. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación es estéril.
7. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación está sustancialmente libre de endotoxina.
8. Una formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que la formulación tiene una pureza de anticuerpo monómero de al menos un 95 % como se determina por HPSEC después de dos semanas de almacenamiento a una temperatura de 40 ± 2 °C y una humedad relativa de un 75 ± 5 %.
9. Una forma de dosificación unitaria farmacéutica que comprende una cantidad eficaz de una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes para tratamiento de profilaxis después de exposición de un sujeto a través de administración de la forma de dosificación al sujeto.
10. Un método para mejorar el almacenamiento de dos anticuerpos monoclonales del virus anti-rabia en una formulación, que comprende formular los anticuerpos en una formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8.
11. Un método de acuerdo con la reivindicación 10, en el que la formulación se almacena a una temperatura de 2 °C a 40 °C, preferentemente de 2 °C a 8 °C.
12. Un método de acuerdo con la reivindicación 10 u 11, en el que se reduce la cantidad de formación de productos secundarios de los anticuerpos.
13. Un método de acuerdo con la reivindicación 12, en el que un 5 % o menos de los anticuerpos forma agregados tal como se mide con HPSEC en 12 meses de almacenamiento a una temperatura de 2 °C a 8 °C.
14. Una formulación farmacéutica de anticuerpo monoclonal CR57 del virus anti-rabia (cadena pesada SEQ ID NO: 1 y cadena ligera SEQ ID NO: 2), o un anticuerpo que tiene una homología de secuencia de al menos un 95 % con el mismo y que es capaz de competir por una unión a la diana reconocida por CR57 y que tiene actividad de neutralización del virus de la rabia, formulación que es estable durante al menos 18 meses a una temperatura entre 2 °C y 8 °C y a una temperatura entre -60 °C y -80 °C, en la que la formulación comprende un tampón de citrato a una concentración de 5 mM a 25 mM, preferentemente 10 mM, cloruro sódico a una concentración de 50 mM a 250 mM, preferentemente 150 mM, y polisorbato 80 en una cantidad de un 0,005 % en p/v a un 0,05 % en p/v, y en la que el pH varía de 5,5 a 6,5, preferentemente en la que el pH es 6,0.

- 5 15. Una formulación farmacéutica de anticuerpo monoclonal del virus anti-rabia CR4098 (cadena pesada SEQ ID NO: 3 y cadena ligera SEQ ID NO: 4), o un anticuerpo que tiene una homología de secuencia de al menos un 95 % con el mismo y que es capaz de competir por una unión a la diana reconocida por CR4098 y que tiene actividad de neutralización del virus de la rabia, formación que es estable durante al menos 18 meses a una temperatura entre 2 °C y 8 °C y a una temperatura entre -60 °C y -80 °C, en la que la formulación comprende un tampón de citrato a una concentración de 5 mM a 25 mM, preferentemente 10 mM, cloruro sódico a una concentración de 50 mM a 250 mM, preferentemente 150 mM, y polisorbato 80 en una cantidad de un 0,005 % en p/v a un 0,05 % en p/v, y en la que el pH varía de 5,5 a 6,5, preferentemente en la que el pH es 6,0.

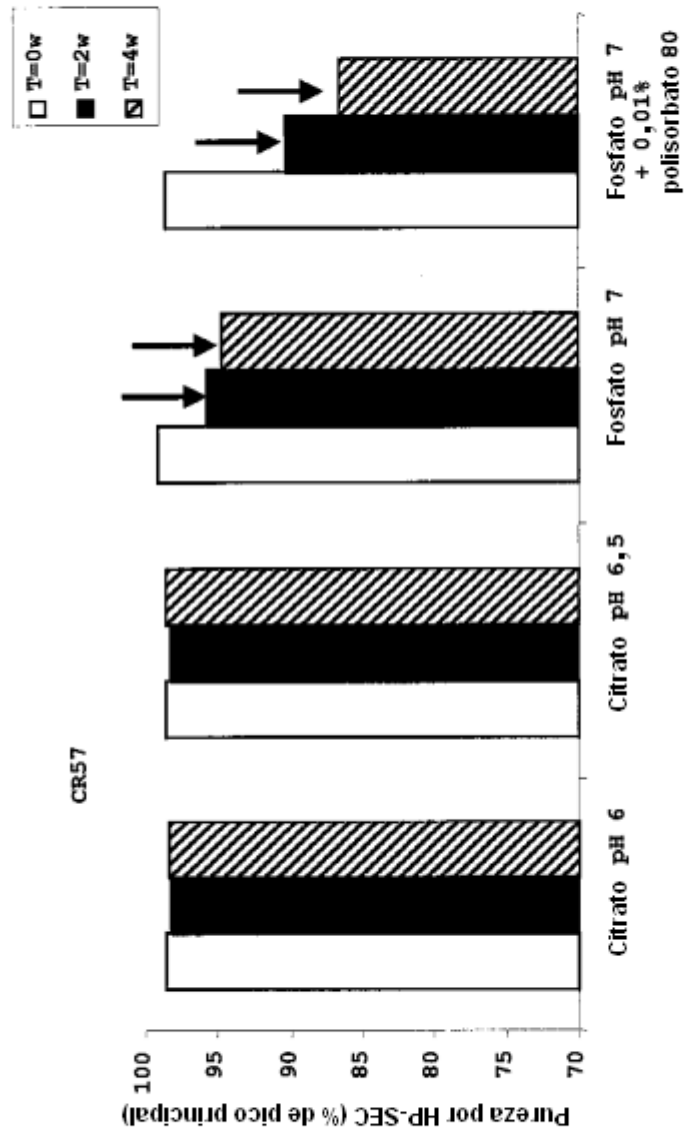


FIG 1

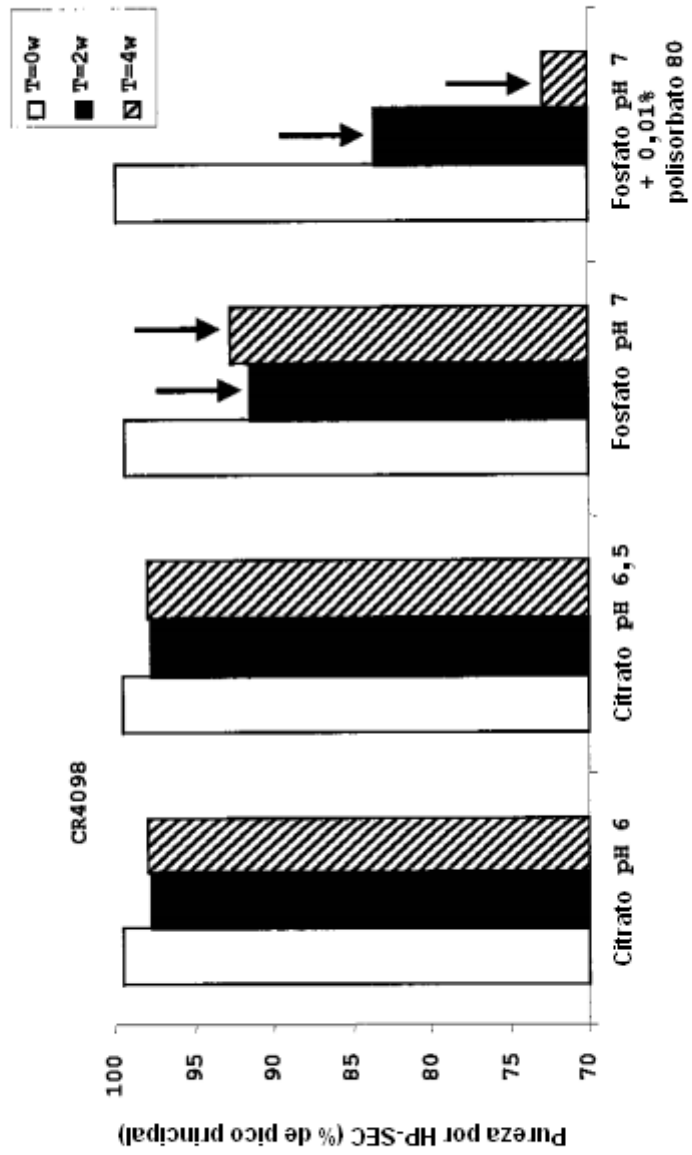


FIG 2

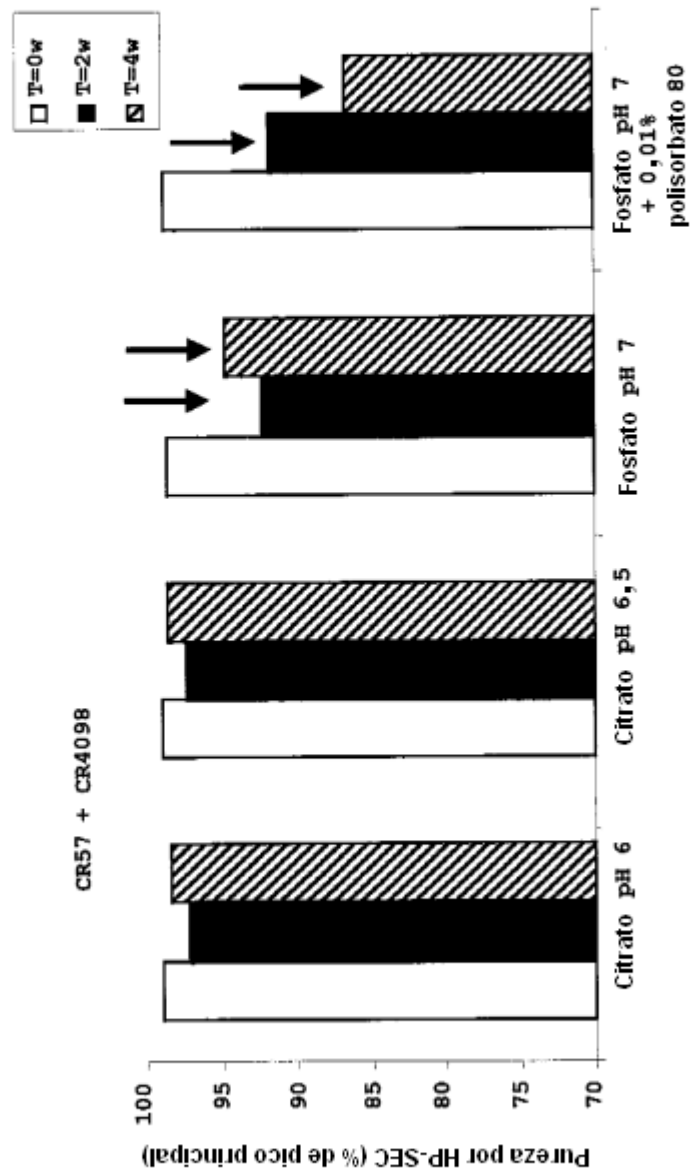


FIG 3