

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 644 275**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/395** (2006.01)

**A61K 47/16** (2006.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

**A61K 9/08** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.08.2001 E 10194382 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.10.2017 EP 2311492**

54 Título: **Preparaciones estabilizadas que contienen anticuerpos**

30 Prioridad:

**11.08.2000 US 224623 P**

**11.08.2000 US 224834 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.11.2017**

73 Titular/es:

**CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA (100.0%)**  
**5-1, Ukima 5-chome Kita-ku**  
**Tokyo 115-8543, JP**

72 Inventor/es:

**KAKUTA, MASAYA;**  
**YAMAZAKI, TADAO;**  
**HAYASAKA, AKIRA;**  
**HAYASHI, YOSHIKI y**  
**ARAKAWA, TSUTOMU**

74 Agente/Representante:

**UNGRÍA LÓPEZ, Javier**

**ES 2 644 275 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

Preparaciones estabilizadas que contienen anticuerpos

5 La presente divulgación se refiere a preparaciones que contienen anticuerpos, particularmente a preparaciones estabilizadas que contienen anticuerpos con baja pérdida de principios activos incluso después del almacenamiento a largo plazo. La presente divulgación también se refiere a procedimientos para preparar preparaciones estabilizadas que contienen proteínas, que comprenden ajustar el pH con un derivado de aminoácido ácido o un aminoácido básico o una sal del mismo.

10 Se suministran al mercado una serie de preparaciones inyectables que contienen proteínas, en donde se adoptan diversas medidas para proporcionar preparaciones estabilizadas que contienen proteínas con poca pérdida de principios activos incluso después de un almacenamiento a largo plazo. Las preparaciones que contienen proteínas son preparadas disolviendo los principios activos y diversos aditivos, tales como diluyentes, solubilizadores, excipientes, agentes calmantes, agentes tamponantes, agentes reductores que contienen azufre, antioxidantes, estabilizadores, surfactantes, etc. en un tampón.

15 Un problema generalmente asociado al almacenamiento de proteínas como soluciones concentradas es su deterioro, como ejemplifica la formación de agregados insolubles y que se ha de prevenir.

20 Por ejemplo, los anticuerpos, tales como inmunoglobulinas, anticuerpos monoclonales y anticuerpos humanizados, son proteínas inestables susceptibles a cambios físicos o químicos, tales como asociación o agregación bajo estreses de filtración, concentración y calentamiento para eliminar virus durante el proceso de purificación. Una formulación farmacéutica acuosa estabilizada que comprende un anticuerpo se desvela en el documento WO 98/56418.

25 Un método convencional ampliamente utilizado para inhibir el deterioro de proteínas y almacenarlas de manera estable es la estabilización mediante liofilización. Sin embargo, era necesario añadir algún agente para proteger frente a la congelación y evitar la desnaturalización o los cambios químicos que podrían estar causados por estreses mecánicos durante la congelación y la liofilización.

30 Se vio un efecto de estabilización añadiendo como estabilizador para inhibir los cambios químicos o físicos polímeros o polioles, incluyendo proteínas, tales como seroalbúmina humana o gelatina purificada, u oligómeros, tales como aminoácidos, y surfactantes. Sin embargo, la adición de biopolímeros, tales como proteínas, como estabilizadores presentaba problemas, tales como la necesidad de una etapa muy compleja para eliminar contaminantes, tales como virus, derivados de los estabilizadores. Más aún, los tratamientos térmicos para inactivar virus a veces causaban problemas, tales como asociación o agregación, debido a estreses térmicos.

35 El receptor de interleuquina-6 (IL-6) es una proteína de unión a ligando que tiene un peso molecular de aproximadamente 80 KD a la que se une la IL-6. Se vio que los anticuerpos anti-receptores de IL-6 tienen un efecto terapéutico sobre diversas enfermedades mediadas por IL-6, tales como trastornos inmunes, enfermedades inflamatorias o tumores linfocíticos, por bloqueo de la transducción de señal de la IL-6 en células de mieloma inmaduras para inhibir las actividades biológicas de la IL-6 (Tsunenari, T. y col., Blood, 90: 2437, 1997; Tsunenari T. y col., Anticancer Res. 16: 2537, 1996). También vimos que los anticuerpos anti-receptores de IL-6 tienen un efecto terapéutico sobre las células de mieloma inmaduras (JP-A-8-099902).

40 Conseguiamos producir en masa un anticuerpo humanizado remodelado, hPM-1, como uno de tales anticuerpos anti-receptores de IL-6 y hemos intentado formular este anticuerpo anti-receptor de IL-6 purificado en preparaciones farmacéuticas.

45 De forma similar a otras preparaciones proteicas, un factor importante para la formulación de anticuerpos anti-IL-6R es la estabilidad química y física. Especialmente, los anticuerpos anti-receptor de IL-6 humanizados son proteínas inestables susceptibles de cambios físicos o químicos, tales como asociación o agregación bajo estreses de filtración, concentración y calentamiento para la eliminación de virus durante el proceso de purificación.

50 Por lo tanto, existe una demanda en cuanto al desarrollo y la comercialización de preparaciones que contengan un anticuerpo, especialmente un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado, que sean estables incluso después de un almacenamiento a largo plazo.

55 Como para diversas proteínas fisiológicamente activas, es también necesario establecer condiciones de preparación y condiciones de almacenamiento para mantener sus estructuras y actividades con objeto de suministrarlas como productos farmacéuticos en una cantidad constante y con una gran calidad. Especialmente, sería deseable desarrollar un método para inhibir la formación de agregados insolubles en soluciones de proteínas.

60 Como resultado de cuidadosos estudios para conseguir los anteriores objetos, logramos la presente divulgación en base al descubrimiento de que la agregación inducida por calor es controlada formulando un anticuerpo anti-receptor

de interleuquina-6 humanizado en un tampón de glicina y/o un tampón de histidina y de que dichas formulaciones son además estabilizadas añadiendo glicina y/o sacarosa.

5 También logramos la presente divulgación en base al descubrimiento de que se puede reducir la agregación y se puede aumentar el efecto de estabilización ajustando el pH con un aminoácido básico o un derivado de aminoácido básico o una sal del mismo.

10 La presente invención se refiere a las realizaciones tal como se caracteriza en las reivindicaciones. Un aspecto de la presente invención se refiere a un proceso para preparar una preparación estabilizada que contiene una proteína fisiológicamente activa, que comprende ajustar el pH a 5-7,5 con un aminoácido básico, en donde el aminoácido básico es histidina, y en donde la proteína fisiológicamente activa es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6. En este procedimiento, el anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 puede ser anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado.

15 También se proporciona en el presente documento lo siguiente:

- (1) una preparación estabilizada que contiene un anticuerpo en un tampón de glicina y/o un tampón de histidina;
- (2) la preparación estabilizada como se define en el punto (1) anterior en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado;
- 20 (3) la preparación estabilizada tal como se define en el punto (1) o (2) anterior en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6;
- (4) la preparación estabilizada tal como se define en el punto (3) anterior en donde el anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado;
- 25 (5) la preparación estabilizada tal como se define en el punto (1) anterior en donde la concentración de tampón de glicina y/o de tampón de histidina es 5 mM – 200 mM;
- (6) la preparación estabilizada tal como se define en uno cualquiera de los puntos (1) a (5) anteriores que contiene glicina y/o sacarosa como agente isotonzante;
- (7) la preparación estabilizada como se define en el punto (6) anterior que contiene glicina 0,05-1 M y/o sacarosa;
- 30 (8) la preparación estabilizada como se define en cualquiera de los puntos (1) a (7) anteriores, que no contiene NaCl como agente isotonzante;
- (9) una preparación estabilizada que contiene glicina y/o sacarosa como un agente isotonzante así como un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 en un tampón de glicina y/o un tampón de histidina;
- 35 (10) la preparación estabilizada tal como se define en uno cualquiera de los puntos (1) a (9) anteriores que tiene un pH de 5-8;
- (11) un método para estabilizar una preparación de anticuerpo que comprende incorporar un anticuerpo en un tampón de glicina y/o un tampón de histidina;
- (12) el método como se define en el punto (11) anterior, que comprende la incorporación de glicina y/o sacarosa como agente isotonzante.
- 40 (13) un método para estabilizar una preparación de anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6, que comprende incorporar glicina y/o sacarosa como un agente isotonzante así como un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado en un tampón de glicina y/o en un tampón de histidina;
- (14) un procedimiento para preparar una preparación estabilizada que contiene una proteína fisiológicamente activa, que comprende ajustar el pH con un aminoácido básico o con un derivado de aminoácido básico o una sal del mismo;
- 45 (15) el procedimiento tal como se define en el punto (14) anterior en donde el aminoácido básico es uno o más miembros seleccionados de histidina, arginina y lisina;
- (16) el procedimiento tal como se define en el punto (15) anterior en donde el aminoácido básico es histidina;
- (17) el procedimiento tal como se define en uno cualquiera de los puntos (14) a (16) anteriores en donde la proteína fisiológicamente activa es una proteína recombinante;
- 50 (18) el procedimiento tal como se define en uno cualquiera de los puntos (14) a (17) anteriores en donde la proteína fisiológicamente activa es un anticuerpo;
- (19) el procedimiento tal como se define en el punto (18) anterior en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimerizado o un anticuerpo humanizado;
- 55 (20) el procedimiento tal como se define en los puntos (18) o (19) anteriores en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6;
- (21) el procedimiento tal como se define en el punto (20) anterior en donde el anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado;
- 60 (22) una preparación estabilizada que contiene un anticuerpo en un tampón de histidina y que tiene un pH de 5-7,5;
- (23) la preparación estabilizada tal como se define en el punto (22) anterior en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6;
- (24) la preparación estabilizada tal como se define en el punto (23) anterior en donde el anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina 6 humanizado;
- 65 (25) la preparación estabilizada tal como se define en el punto (24) anterior que tiene un pH de 5,5-6,2;
- (26) la preparación estabilizada tal como se define en el punto (25) anterior en donde la concentración de

histidina es de 1-50 mM;

(27) la preparación estabilizada tal como se define en el punto (26) anterior en donde la concentración de histidina es de 3-20 mM;

5 (28) la preparación estabilizada tal como se define en el punto (27) anterior en donde la concentración de histidina es de 5-10 mM;

(29) la preparación estabilizada tal como se define en el punto (24) anterior que tiene un pH de 6,2-7,5;

(30) la preparación estabilizada tal como se define en el punto (29) anterior en donde la concentración de histidina es de 5-200 mM;

10 (31) la preparación estabilizada tal como se define en el punto (30) anterior en donde la concentración de histidina es de 10-150 mM;

(32) la preparación estabilizada tal como se define en el punto (31) anterior en donde la concentración de histidina es de 25-100 mM;

(33) la preparación estabilizada tal como se define en uno cualquiera de los puntos (22) a (32) anteriores que contiene adicionalmente glicina y/o sacarosa;

15 (34) la preparación estabilizada tal como se define en el punto (33) anterior que contiene glicina 0,05-1 M y/o sacarosa; y

(35) la preparación estabilizada tal como se define en uno cualquiera de los puntos (22) a (34) anteriores, que tiene su pH ajustado con un aminoácido básico o un derivado de aminoácido básico o una sal del mismo.

## 20 Breve descripción de los dibujos

La FIG. 1 muestra los resultados de la electroforesis en gel nativa que muestran agregación cuando se trató por calor el anticuerpo hPM-1 disuelto en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,5, a 75°C (electroforetograma).

25 La FIG. 2 muestra los resultados de la electroforesis en gel nativa que muestran el efecto del tipo de tampón sobre la agregación (electroforetograma).

La FIG. 3 muestra los resultados de la electroforesis en gel nativa que muestran el efecto de la adición de NaCl 50 mM a los tampones y del calentamiento sobre la agregación (electroforetograma).

La FIG. 4 muestra la distribución del coeficiente de sedimentación  $g(s^*)$ , obtenida por DCDT y análisis de un anticuerpo hPM-1 control en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M.

30 La FIG. 5 muestra la distribución del coeficiente de sedimentación  $g(s^*)$ , mostrando el efecto del tipo de tampón sobre la agregación.

La FIG. 6 muestra los resultados de la electroforesis en gel nativa que muestran el efecto de la glicina y de la sacarosa sobre la agregación (electroforetograma).

35 La FIG. 7 muestra los resultados del análisis en gel nativo de seis muestras (muestras 1 a 6) antes y después de calentar (electroforetograma).

La FIG. 8 muestra los resultados del análisis en gel nativo de las muestras 6-1, 6-2, 6-3 y 6-4 antes y después de calentar (electroforetograma).

La FIG. 9 muestra los resultados del análisis en gel nativo en donde se compararon las muestras 6-1 y 6-2 a varias concentraciones de histidina (electroforetograma).

40 La FIG. 10 muestra los resultados del análisis en gel nativo en donde se compararon la muestra 6-1, pH 6,5, la muestra 6-2, pH 6,0, y la muestra 6-3, pH 6,5, a varias concentraciones de histidina (electroforetograma).

La FIG. 11 muestra los resultados del análisis en gel nativo en donde se comparó el efecto de la histidina entre dos muestras a pH 6,0, es decir, las muestras 6-2 y 6-5 (electroforetograma).

45 La FIG. 12 muestra los resultados del análisis en gel nativo en donde se compararon la muestra 6-1 (fosfato/Na 5 mM, pH 6,5), la muestra 6-2 (fosfato/His 5 mM, pH 6,0) y la muestra 6-5 (fosfato/Na 5 mM, pH 6,0) (electroforetograma).

La FIG. 13 muestra los resultados del análisis en gel nativo en donde se compararon el efecto de la sacarosa (50-200 mM) añadida a la muestra 6-2 y el efecto de la glicina (50-200 mM) añadida a la muestra 6-5 (electroforetograma).

50 La FIG. 14 muestra los resultados del análisis en gel nativo en donde se comparó el efecto de la glicina o de la sacarosa 200 mM en dos muestras a pH 6,0 (muestras 6-2 y 6-5) (electroforetograma).

Los anticuerpos usados en las preparaciones estabilizadas de la presente divulgación son preferentemente anticuerpos monoclonales, los cuales pueden ser preparados por cualquier procedimiento. Los anticuerpos monoclonales pueden ser básicamente construidos por técnicas conocidas como se indica a continuación. Se inmuniza a un huésped adecuado con un antígeno inmunizante según una técnica de inmunización estándar y se fusionan las células inmunizadas resultantes con células parentales conocidas mediante una técnica de fusión celular estándar, y luego se criban las células fusionadas en cuanto a células productoras de anticuerpos monoclonales por un método de cribado estándar.

60 Los anticuerpos contenidos en preparaciones estabilizadas de la presente divulgación incluyen, pero no se limitan a, anticuerpos anti-receptor de IL-6, anticuerpos monoclonales anti-antígeno HM1,24, anticuerpos antipéptido relacionado con hormona paratiroidea (anticuerpos anti-PTHrP), anticuerpos antifactor tisular, etc. Por ejemplo los anticuerpos anti-receptor de IL-6 incluyen PM-<sup>o</sup> (Hirata et al., J. Immunol. 143:2900-2906, 1989), AUK12-20, AUK64-7 o AUK146-15 (Publicación Internacional N.º WO92/19759).

Los anticuerpos monoclonales no se limitan a aquellos producidos por hibridomas, sino que también incluyen anticuerpos quiméricos obtenidos mediante modificaciones artificiales para baja heteroantigenicidad para humanos o con otros fines. En la presente divulgación también se pueden usar anticuerpos humanizados reconfigurados, que se obtienen sustituyendo las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo humano por las regiones determinantes de complementariedad de un anticuerpo de mamífero no humano tal como un anticuerpo de ratón mediante técnicas de recombinación génica convencionales también conocidas. Estas técnicas conocidas se pueden usar para obtener anticuerpos humanizados reconfigurados.

Si fuera necesario, los anticuerpos humanizados reconfigurados pueden tener algunos cambios de aminoácidos en las regiones marco (FR) de las regiones variables, de manera que las regiones determinantes de complementariedad formen un sitio de unión a antígeno apropiado (Sato et al. Cancer Res. 53:1-6, 1993). Tales anticuerpos humanizados reconfigurados se ejemplifican preferentemente mediante anticuerpos anti-receptor de IL-6 humanizados (hPM-1) (véase la Publicación Internacional N.º WO92/19759). Otros anticuerpos preferidos para su uso en la presente divulgación incluyen anticuerpos monoclonales antiantígeno HM1,24 humanizados (véase la Publicación Internacional N.º WO98/14580), anticuerpos antipeptido relacionado con hormona paratiroidea humanizados (anticuerpos anti-PTHrP) (véase la Publicación Internacional N.º WO98/13388), anticuerpos antifactor tisular (véase la Publicación Internacional N.º WO99/51743), etc.

Los anticuerpos humanos construidos con animales transgénicos o similares también son preferidos.

Los anticuerpos también incluyen fragmentos de anticuerpo reconfigurados tales como Fab y (Fab')<sub>2</sub> y anticuerpos monovalentes o multivalentes de cadena simple (scFvs).

Las muestras que contienen proteína fisiológicamente activa o las muestras que contienen anticuerpos en el presente documento pueden ser muestras que contienen cualquier proteína o anticuerpo independientemente de si es una proteína o anticuerpo biológico o de si es una proteína o anticuerpo recombinante, preferentemente medios de cultivo de células de mamífero tales como células CHO que contienen una proteína o anticuerpo fisiológicamente activo obtenido mediante cultivo de aquellos medios que se han sometido a algún tratamiento tal como la purificación parcial.

Estudiamos la estabilidad térmica del anticuerpo hPM-1 disuelto en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,5, para descubrir que apenas se producía agregación incluso después de una incubación prolongada a 70°C o menos. Se formaron luego agregados cuando se trató con calor el anticuerpo hPM-1 a 75°C. Este resultado muestra que la agregación es inducida en el anticuerpo hPM-1 sólo después de haber pasado una transición térmica caracterizada por un punto de fusión de 72°C. Al aumentar el período de incubación, aumentaba la intensidad de la banda de agregados y prácticamente se perdía el contenido en monómeros después de 60 minutos. Estos agregados parecían ser no covalentes, ya que se disociaban en presencia de dodecilsulfato de sodio.

Tras examinar diversos factores que contribuyen a la inhibición de esta agregación inducida por calor, vimos que se puede controlar la agregación disolviendo un anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado en un tampón de glicina y/o un tampón de histidina.

Por lo tanto, se pueden preparar las preparaciones estabilizadas de la presente divulgación disolviendo un anticuerpo en tampón de glicina y/o en tampón de histidina.

El tampón de glicina o el tampón de histidina tiene una concentración de 5-200 mM, preferentemente de 5-50 mM, más preferentemente de 5-20 mM. El tampón de glicina y el tampón de histidina pueden ser usados solos o en combinación en una concentración total dentro del rango anterior.

Las preparaciones estabilizadas de la presente divulgación pueden ser preparaciones más estables con menos agregación mediante la adición de glicina y/o sacarosa como agente isotonzante. La cantidad de glicina y/o sacarosa que se ha de añadir es de 0,05-1 M. Las preparaciones de la presente divulgación están preferiblemente libres de NaCl, ya que el efecto reductor de la agregación de la glicina y/o de la sacarosa disminuye por la adición de NaCl.

Las preparaciones estabilizadas de la presente divulgación preferentemente tienen un pH de 5-8.

También examinamos diversos factores que contribuyen a la inhibición de la agregación para descubrir que la agregación se reduce y el efecto de estabilización aumenta ajustando el pH con un aminoácido básico o un derivado de aminoácido básico o una sal del mismo en lugar de NaOH como se usa en métodos convencionales.

Por consiguiente, la presente divulgación proporciona procedimientos para preparar una preparación estabilizada que contiene proteína, que comprende ajustar el pH con un aminoácido básico o un derivado de aminoácido básico o una sal del mismo.

Los procedimientos para preparar una preparación estabilizada que contiene una proteína fisiológicamente activa de la presente divulgación son útiles no solo para preparaciones que contienen anticuerpos tal como se describe anteriormente sino también otras preparaciones que contienen proteína fisiológicamente activa. Por ejemplo, las proteínas fisiológicamente activas incluyen, pero no se limitan a, factores hematopoyéticos tales como factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF), eritropoyetina (EPO) y trombopoyetina; citocinas tales como interferón, IL-1 y IL-6; anticuerpos monoclonales, activador tisular del plasminógeno (TPA); urocinasa; albúmina de suero; factor VIII de coagulación sanguínea; leptina; insulina; y factor de crecimiento de células madre (SCF). Las proteínas preferidas son factores hematopoyéticos tales como EPO, G-CSF y trombopoyetina y anticuerpos monoclonales, más preferentemente EPO, G-CSF y anticuerpos monoclonales.

Las proteínas fisiológicamente activas usadas como principios activos en la presente divulgación pueden provenir de fuentes naturales o preferentemente diseñadas genéticamente en la medida en que tienen sustancialmente las mismas actividades biológicas que las proteínas fisiológicamente activas de mamíferos, especialmente del ser humano. Las proteínas diseñadas genéticamente pueden tener las mismas secuencias de aminoácidos que las de las proteínas naturales o pueden contener delección, sustitución o adición de uno o más aminoácidos en las secuencias de aminoácidos siempre que mantengan las actividades biológicas. Las proteínas fisiológicamente activas también incluyen aquellas modificadas químicamente con PEG o similares.

Las proteínas fisiológicamente activas usadas como principios activos en la presente divulgación incluyen, por ejemplo, proteínas que tienen una cadena de azúcares. La cadena de azúcares puede provenir de cualquier fuente, pero preferentemente de las de glicosilación en células de mamífero. Las células de mamífero incluyen, por ejemplo, células de ovario de hámster chino (CHO), células BHK, células COS, células de origen humano, etc., entre las que las células CHO son las más preferidas.

Cuando la proteína fisiológicamente activa usada como principio activo en la presente divulgación es EPO, se puede preparar EPO mediante cualquier procedimiento, por ejemplo, se puede extraer a partir de la orina humana y aislar y purificar mediante diversas técnicas o se puede producir mediante técnicas de ingeniería genética (véase el documento JP-A-61-012288, por ejemplo) en células de ovario de hámster chino (CHO), células BHK, células COS, células de origen humano o similares y después extraerlas, aislarlas y purificarlas mediante diversas técnicas. La EPO modificada químicamente con PEG o similares también se incluye (véase la Publicación Internacional N.º WO90/12874). La EPO que no tiene cadena de azúcar y está modificada químicamente con PEG o similares también se incluye. Los análogos de EPO también se incluyen, en los que EPO se ha modificado para aumentar el número de uno o más sitios de glicosilación en el sitio de unión a la cadena de carbohidratos unido a N o en el sitio de unión a la cadena de carbohidratos unido a O en la secuencia de aminoácidos de EPO (véase el documento JP-A-8-151398 y JP-A-8-506023, por ejemplo). Además, se puede aumentar la cantidad de cadenas de azúcares aumentando el contenido de ácido siálico o similares sin cambiar el número de sitios de unión a la cadena de azúcares.

Cuando la proteína fisiológicamente activa usada como un principio activo en la presente divulgación es G-CSF, cualquiera de los G-CSF humanos altamente purificados se puede usar. El G-CSF en la presente divulgación se puede preparar mediante cualquier procedimiento, por ejemplo, se pueden extraer de los cultivos de una línea de células tumorales humana y aislar y purificar mediante diversas técnicas o se puede producir mediante técnicas de ingeniería genética en células bacterianas tales como E. coli, células de levadura, células de cultivo animal tales como células de ovario de hámster chino (CHO), C127 o COS y después extraerlo y aislarlo y purificarlo mediante diversas técnicas. El G-CSF se produce preferentemente mediante recombinación genética en E. coli, levaduras o células CHO, más preferentemente mediante recombinación genética en células CHO. El G-CSF químicamente modificado con PEG o similares también se incluye (véase la Publicación Internacional N.º WO90/12874).

El aminoácido básico usado para ajustar el pH es preferentemente uno o más miembros seleccionado de histidina, arginina y lisina, más preferentemente histidina.

Los aminoácidos básicos o los derivados de aminoácidos básicos o sales de los mismos incluyen aminoácidos básicos libres o derivados de aminoácidos básicos y sus sales tales como sales de sodio, sales de potasio o clorhidratos. Los aminoácidos básicos o los derivados de aminoácidos básicos o sales de los mismos usados en procesos y preparaciones de la presente divulgación pueden estar en configuración D, L o DL, más preferentemente en configuración L. Los derivados de aminoácidos básicos incluyen compuestos de nitrógeno de aminoácidos, aminoalcoholes, dipéptidos o similares. Por ejemplo, los derivados de histidina incluyen derivados descritos en el documento JP-A-11-315031, es decir, metiléster de histidina, His-Gly, His-Ala, His-Leu, His-Lys, His-Phe, imidazol, histamina o ácido imidazol-4-acético.

En procedimientos de la presente divulgación, el pH se ajusta preferentemente a 5-7,5 con un aminoácido básico o un derivado de aminoácido básico o una sal del mismo, preferentemente uno o más miembros seleccionados de histidina, arginina, lisina o derivados o sales de los mismos, más preferentemente histidina o un derivado del mismo o una sal del mismo. Más preferentemente, el pH se ajusta con histidina.

En una realización preferida de un procedimiento de la presente divulgación, se ajusta el pH de una preparación que contiene un anticuerpo en un tampón de histidina con un aminoácido básico o un derivado de aminoácido básico o una sal del mismo. Por ejemplo, la agregación se puede reducir cuando un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado está contenido en un tampón de histidina en lugar de tampones fosfato convencionales. Sin embargo, también se usan otros tampones.

Existe una correlación entre el pH de las preparaciones y las concentraciones de histidina preferidas en los tampones. Cuando el pH de las preparaciones es 5,5-6,2, preferentemente 5,7-6,2, el efecto de estabilización es especialmente notable a una concentración de histidina de 1-50 mM, preferentemente de 3-20 mM, más preferentemente de 5-10 mM. Cuando el pH de las preparaciones es 6,2-7,5, preferentemente 6,3-7,0, el efecto de estabilización es notable a una concentración de histidina de 5-200 mM, preferentemente 10-150 mM, más preferentemente 25-100 mM.

Las preparaciones estabilizadas de la presente divulgación pueden ser preparaciones más estables con menos agregación mediante la adición de más glicina y/o sacarosa. La cantidad de glicina y/o sacarosa que se ha de añadir es preferiblemente de 0,05-1 M.

Las preparaciones de la presente divulgación pueden además contener agentes isotonzantes, *v.g.*, polietilenglicol, y azúcares, tales como dextrano, manitol, sorbitol, inositol, glucosa, fructosa, lactosa, xilosa, manosa, maltosa y rafinosa.

Las preparaciones estabilizadas de la presente divulgación pueden además contener surfactantes. Como ejemplos típicos de surfactantes, se incluyen:

surfactantes no iónicos, *v.g.*, ésteres de sorbitán y ácidos grasos, tales como monocaprilato de sorbitán, monolaurato de sorbitán y monopalmitato de sorbitán; ésteres de glicerina y ácidos grasos, tales como monocaprilato de glicerina, monomiristato de glicerina y monoestearato de glicerina; ésteres de poliglicerina y ácidos grasos, tales como monoestearato de decaglicerilo, diestearato de decaglicerilo y monolinoleato de decaglicerilo; ésteres de polioxietilensorbitán y ácidos grasos, tales como monolaurato de polioxietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, monoestearato de polioxietilensorbitán, monopalmitato de polioxietilensorbitán, trioleato de polioxietilensorbitán y triestearato de polioxietilensorbitán; ésteres de polioxietilensorbitol y ácidos grasos, tales como tetraestearato de polioxietilensorbitol y tetraoleato de polioxietilensorbitol; ésteres de polioxietilenglicerina y ácidos grasos, tales como monoestearato de polioxietilenglicerilo; ésteres de polietilenglicol y ácidos grasos, tales como diestearato de polietilenglicol; polioxietilén alquil éteres, tales como polioxietilén lauril éter; polioxietilén polioxipropilén alquil éteres, tales como polioxietilén polioxipropilén glicol éter, polioxietilén polioxipropilén propil éter y polioxietilén polioxipropilén cetil éter; polioxietilén alquil fenil éteres, tales como polioxietilén nonil fenil éter; aceites de ricino endurecidos polioxietilenados, tales como aceite de ricino polioxietilenado y aceite de ricino endurecido polioxietilenado (aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado); derivados de cera de abejas polioxietilenados, tales como cera de abejas polioxietilensorbitol; derivados de lanolina polioxietilenados, tales como polioxietilensorbitol; amidas de ácidos grasos polioxietilenados, tales como la amida del ácido esteárico polioxietilenada con un HLB de 6-18; surfactantes aniónicos, *v.g.*, alquilsulfatos que tienen un grupo alquilo C10-18, tales como cetilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio y oleilsulfato de sodio; polioxietilén alquil éter sulfatos que tienen un número medio de moles de óxido de etileno de 2-4 y un grupo alquilo C10-18, tales como polioxietilensorbitol sulfato de sodio; sales de ésteres de ácidos alquilsulfosuccínicos que tienen un grupo alquilo C8-18, tales como laurilsulfosuccinato de sodio; y surfactantes naturales, *v.g.*, lecitina, glicerofosfolípidos, esfingofosfolípidos, tales como esfingomielina, y ésteres de sacarosa y ácidos grasos de ácidos grasos C12-18. Se pueden añadir uno o más de estos surfactantes en combinación a las preparaciones de la presente divulgación.

Las preparaciones estabilizadas de la presente divulgación pueden además contener diluyentes, agentes solubilizantes, excipientes, modificadores del pH, agentes calmantes, agentes tamponantes, agentes reductores que contienen azufre, antioxidantes o similares, si se desea. Por ejemplo, como agentes reductores que contienen azufre, se incluyen N-acetilcisteína, N-acetilhomocisteína, ácido tióctico, tioglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico y sus sales, tiosulfato de sodio, glutatión y compuestos que contienen sulfhidrilo, tales como ácido tioalcanoico de 1 a 7 átomos de carbono. Como antioxidantes, se incluyen ácido eritórico, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol,  $\alpha$ -tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico y sus sales, palmitato de L-ascorbilo, estearato de L-ascorbilo, bisulfito de sodio, sulfito de sodio, galato de triamillo, galato de propilo o agentes quelantes, tales como etilendiaminotetraacetato disódico (EDTA), pirofosfato de sodio y metafosfato de sodio. También pueden estar contenidos otros componentes comúnmente añadidos, *v.g.*, sales inorgánicas, tales como cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de calcio, fosfato de sodio, fosfato de potasio y bicarbonato de sodio, y sales orgánicas, tales como citrato de sodio, citrato de potasio y acetato de sodio.

Las preparaciones estabilizadas de la presente divulgación son normalmente administradas por vías parenterales, tales como inyección (*v.g.*, inyección subcutánea, intravenosa, intramuscular o intraperitoneal), o por administración percutánea, mucosal, nasal o pulmonar, pero también pueden ser administradas por vía oral.

Las preparaciones estabilizadas de la presente divulgación pueden también estar en forma de formulaciones en solución o de formulaciones liofilizadas para ser reconstituidas en solución antes de su uso. Como excipientes adecuados para la liofilización, se incluyen alcoholes de azúcares o azúcares, tales como manitol o glucosa.

5 La cantidad de anticuerpos contenida en las preparaciones de la presente divulgación depende del tipo de la enfermedad que haya de ser tratada, de la gravedad de la enfermedad, de la edad del paciente y de otros factores, pero generalmente varía de 0,1 a 200 mg/ml, preferiblemente de 1 a 120 mg/ml, expresada como concentración final.

10 Como se muestra en los ejemplos que se dan a continuación, se demostró que se puede controlar la agregación inducida por calor con las preparaciones estabilizadas de la presente divulgación formuladas en un tampón de glicina y/o un tampón de histidina, y que se puede reducir aún más la agregación añadiendo glicina y/o sacarosa.

15 De acuerdo con los procedimientos para preparar una preparación estabilizada que contiene una proteína fisiológicamente activa de la presente divulgación, la agregación inducida por calor se puede controlar para proporcionar una preparación estable mediante el ajuste del pH con un aminoácido básico o un derivado de aminoácido básico o una sal del mismo.

## 20 Ejemplos

### Métodos de ensayo

#### (1) Materiales

25 Se usó el anticuerpo hPM-1 como anticuerpo anti-receptor de IL-6 humanizado. El anticuerpo hPM-1 es un anticuerpo humanizado preparado según el protocolo descrito en el Ejemplo de referencia 2 de JP-A-8-099902 usando el promotor del factor de elongación humano  $\text{I}\alpha$  descrito en el Ejemplo 10 de la Publicación Internacional N° WO92/19759. Se purificó el anticuerpo hPM-1 a través de una columna de proteína A y se guardó en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,5.

#### (2) Determinación de las concentraciones de proteína

30 Se calcularon las concentraciones de proteína a partir de las absorbancias medidas a 280 nm con un espectrofotómetro (DU-600, Beckman-Coulter) usando coeficientes de extinción por mg/ml (calculados a partir de la secuencia de aminoácidos).

#### (3) Velocidad de sedimentación

40 La velocidad de sedimentación determinada por ultracentrifugación analítica es una excelente herramienta para detectar cambios menores en la agregación proteica. Este método puede detectar la agregación a nivel de aproximadamente un 1% en peso.

45 Se diluyeron todas las muestras con diversos tampones formulados a aproximadamente 0,5 mg/ml inmediatamente antes del análisis y se escanearon en cuanto a agregados muy grandes sedimentados por centrifugación a una baja velocidad del rotor de 3.000 rpm usando una ultracentrífuga analítica Beckman XLA a 20°C. Se sedimentaron luego el monómero y pequeños oligómeros a una velocidad del rotor de 45.000 rpm.

50 Se analizaron los datos mediante el programa DCDT+ desarrollado por John Philo usando el método  $dc/dt$  (Stafford, Anal. Biochem. 203: 295-230, 1992). En algunos casos, se usó el programa SVEDBERG (también desarrollado por John Philo).

#### (4) Electroforesis en gel nativa

55 Se analizó la agregación proteica por electroforesis en gel nativa en ausencia de SDS. En este método, la movilidad de las proteínas depende tanto del tamaño hidrodinámico como del estado de carga. La electroforesis en gel nativa permite detectar agregados proteicos no covalentes en ausencia de SDS. Desarrollamos un protocolo para el análisis en gel nativo del anticuerpo hPM-1, ya que el anticuerpo hPM-1 es una proteína básica para la cual no se puede aplicar la polaridad ordinaria en sistemas tampón de Tris-glicina normales o en electroforesis en gel de SDS.

60 Se realizó la electroforesis en gel nativa en un gel de Tris-acetato Novex NuPAGE al 7% (comprado a Novex). El tampón de electrodo utilizado era  $\beta$ -alanina 80 mM/AcOH 40 mM, pH 4,4, o histidina 30 mM/MES 30 mM, pH 6,1. El anticuerpo hPM-1 estaba positivamente cargado a pH 6,1, y se le sometió a electroforesis en una dirección del ánodo al cátodo. Se mezclaron las muestras con un exceso cinco veces mayor del tampón de electrodo que contenía sacarosa y verde de metilo.

65



## Ejemplo 1: Estabilidad térmica del anticuerpo hPM-1

Se estudió el anticuerpo hPM-1 disuelto en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,5, en cuanto a estabilidad térmica. La Fig. 1 muestra los resultados de la electroforesis en gel nativa antes y después del tratamiento térmico a 75°C durante 5-60 minutos.

En la Fig. 1, aparece una sola banda antes del tratamiento térmico, para mostrar que la proteína purificada es muy homogénea en cuanto a estado de carga y tamaño. La velocidad de sedimentación de la misma muestra era constante, para mostrar que es una especie monomérica. Después de calentar a 75°C durante 5 minutos, se observó una banda correspondiente a agregados. Al aumentar el período de incubación, aumentó la intensidad de la banda de agregados y se perdió prácticamente el contenido monomérico después de 60 minutos. Estos agregados parecían ser no covalentes, ya que se disociaban en presencia de dodecilsulfato de sodio.

## Ejemplo 2: Efecto del tipo de tampón sobre la agregación

Se usaron cinco tampones (todos 19 mM) para examinar su efecto sobre la agregación. Los pH de las muestras preparadas disolviendo una preparación de anticuerpo hPM-1 en estos tampones (a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml) son como se indica a continuación.

- 1) fosfato de sodio (pH 6,8)
- 2) histidina-HCl (pH 7,1)
- 3) citrato de sodio (pH 6,7)
- 4) Tris-HCl (pH 7,2)
- 5) glicina (pH 7,6).

Se calentaron estas muestras a 75°C durante 60 minutos y se las sometió a análisis en gel nativo. La Fig. 2 muestra los resultados antes y después del calentamiento. El contenido monomérico era el más alto, para dar la menor cantidad de agregación en glicina, y disminuía en el orden histidina-HCl, Tris-HCl, fosfato de sodio y citrato de sodio. Se observaron muy pocos agregados en glicina.

Cuando se añadió NaCl 50 mM a estos tampones, la agregación tras el calentamiento aumentó en gran medida en cualquiera de los tampones (Fig. 3).

## Ejemplo 3: Efecto del tipo de tampón sobre la distribución de sedimentación

Con objeto de examinar la naturaleza de la agregación inducida por calor en estos tampones, se realizó entonces una prueba de sedimentación. La Fig. 4 muestra la distribución del coeficiente de sedimentación  $g(s^*)$  obtenida gracias al análisis  $dc/dt$  de un anticuerpo hPM-1 control en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M. Se ve que esta muestra es una sola especie que tiene un coeficiente de sedimentación de aproximadamente 6,2 svedbergs (S).

La Fig. 5 muestra el perfil de sedimentación de una muestra de preparación que contiene anticuerpo hPM-1 disuelta en los cinco tampones mostrados en el Ejemplo 2 y calentada a 75°C durante 60 minutos. Se observaron una considerable agregación y pérdida de especies monoméricas en los tampones distintos de la glicina 19 mM, pH 7,6. La pérdida monomérica era mayor en el citrato de sodio, seguido del fosfato de sodio, del Tris-HCl, de la histidina-HCl y de la glicina en orden descendente. Se observó una amplia distribución que representaba la existencia de agregados en fosfato, citrato y Tris, que se extendían a 40 S o más y tenían un pico a aproximadamente 15-18 S. Los agregados observados en histidina no fueron observados a aproximadamente 25 S o más y tenían un pico a aproximadamente 10 S. Estos resultados concuerdan con los resultados del análisis en gel nativo sobre las preparaciones después del tratamiento térmico descrito en el Ejemplo 2.

## Ejemplo 4: Efecto de la glicina y de la sacarosa

Este ejemplo se relaciona con la evaluación del efecto de la glicina o de la sacarosa sobre la agregación al utilizarlas en lugar de NaCl. Se dializaron muestras de anticuerpo hPM-1 disuelto en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,5, frente a fosfato de sodio 19 mM, pH 6,5, que contenía glicina 0,2 M o sacarosa 0,2 M. Se calentaron estas muestras a 75°C durante 20-60 minutos en paralelo. La Fig. 6 muestra los resultados de la electroforesis en gel nativa. Comparando las bandas de monómeros, el contenido en monómeros era inferior en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M, después de calentar durante 20 minutos. Esta diferencia se hizo más significativa cuando se prolongó el período de incubación hasta 40 y 60 minutos. La sacarosa era más efectiva que la glicina en la reducción de la agregación del anticuerpo hPM-1 inducida por el tratamiento térmico. Así, el NaCl mostró un efecto negativo sobre la prevención de la agregación como lo hizo en el Ejemplo 2.

## Ejemplo 5: Análisis en gel nativo de muestras de anticuerpo hPM-1 antes y después del calentamiento

Se sometieron seis muestras (muestras 1 a 6) de dicha preparación de anticuerpo hPM-1 almacenadas en fosfato de sodio 19 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,5, a análisis en gel nativo. Se muestran los resultados de muestras de

aproximadamente 28  $\mu\text{g}$  sobre el gel en la calle derecha de la Fig. 7.

Se diluyeron dichas seis muestras en fosfato de sodio 20 mM, NaCl 0,2 M, pH 6,5, para preparar una solución de anticuerpo hPM-1 a una concentración de aproximadamente 2 mg/ml, que se dializó frente al tampón. Tras la diálisis, se determinaron espectrofotométricamente las concentraciones de proteína a un coeficiente de extinción de 1,401, con los resultados siguientes.

10 Muestra 1: 1,87 mg/ml  
 Muestra 2: 1,77 mg/ml  
 Muestra 3: 1,89 mg/ml  
 Muestra 4: 1,89 mg/ml  
 Muestra 5: 1,87 mg/ml  
 Muestra 6: 1,85 mg/ml.

15 Estas muestras fueron sometidas a análisis en gel nativo. Los resultados fueron los mismos que los mostrados en la calle derecha de la Fig. 7, lo que confirma que la agregación no estaba influenciada por la dilución y la diálisis.

20 Se calentaron luego estas muestras a 75°C durante una hora y se las sometió a análisis en gel nativo del mismo modo (excepto por usar muestras de 49  $\mu\text{g}$ ). Los resultados son mostrados en la calle izquierda de la Fig. 7. El contenido en monómeros de anticuerpo hPM-1 disminuyó notablemente en todas las muestras, para mostrar que se habían formado agregados.

Ejemplo 6: Efecto del tipo y del pH del tampón sobre la agregación

25 Se diluyó la muestra 6 en los cinco tampones siguientes para preparar soluciones de anticuerpo hPM-1 a una concentración de aproximadamente 2 mg/ml.

Muestra 6-1: fosfato/Na 5 mM, pH 6,5 [fosfato de sodio (monobásico) 5 mM ajustado a pH 6,5 con NaOH concentrado].  
 30 Muestra 6-2: fosfato/His 5 mM, pH 6,0 [fosfato de sodio (monobásico) 5 mM ajustado a pH 6,0 con histidina (base) concentrada a una concentración final de histidina de 1 mM].  
 Muestra 6-3: fosfato/His 5 mM, pH 6,5 [fosfato de sodio (monobásico) 5 mM ajustado a pH 6,5 con histidina (base) concentrada a una concentración final de histidina de 6,6 mM].  
 Muestra 6-4: fosfato/Na 5 mM + His/HCl 20 mM, pH 6,5 [fosfato 10 mM, pH 6,5, mezclado con igual cantidad de His/HCl 40 mM, pH 6,5].  
 35 Muestra 6-5: fosfato/Na 5 mM, pH 6,0 [fosfato de sodio (monobásico) 5 mM ajustado a pH 6,0 con NaOH concentrado].

40 Se dializaron estas muestras frente a los tampones respectivos mostrados anteriormente. Tras la diálisis, se determinaron las concentraciones proteicas con los resultados siguientes.

Muestra 6-1: 1,80 mg/ml  
 Muestra 6-2: 1,75 mg/ml  
 Muestra 6-3: 1,82 mg/ml  
 Muestra 6-4: 1,84 mg/ml  
 45 Muestra 6-5: 1,68 mg/ml.

Se sometieron estas muestras a análisis en gel nativo antes y después del tratamiento térmico a 75°C durante 1 hora.

50 La Fig. 8 muestra los resultados analíticos de las muestras 6-1, 6-2, 6-3 y 6-4. La agregación era menor en la muestra 6-2, seguida de la muestra 6-4. Esto mostró que un pH de 6,0 daba mejores resultados que un pH de 6,5 y que el ajuste del pH con histidina tenía un efecto de estabilización.

55 La Fig. 9 muestra los resultados de la comparación de las muestras 6-1 y 6-2 a diversas concentraciones de histidina. Se prepararon las muestras mezclando la muestra 6-1 ó 6-2 con una solución de histidina 0,25 M (mezclada con el correspondiente tampón para ajustar el pH). Se formaron menos agregados a pH 6,0 (muestra 6-2) que a pH 6,5 (muestra 6-1), lo que muestra que el efecto de la histidina varía con el pH.

60 El efecto de estabilización de la histidina era considerable a una concentración de 5-10 mM a pH 6,0, mientras que el efecto de estabilización aumentaba con la concentración de histidina a pH 6,5, como muestran los resultados a 25-50 mM.

65 Se examinó entonces el efecto de la concentración de histidina sobre la agregación en otras muestras. La Fig. 10 muestra los resultados de la comparación de la muestra 6-1, pH 6,5, la muestra 6-2, pH 6,0, y la muestra 6-3, pH 6,5, a diversas concentraciones de histidina.

Se vio algún efecto de estabilización en la muestra 6-3, pH 6,5, incluso cuando se aumentó la concentración a 100 mM, pero el efecto era mayor a concentraciones menores de histidina, tales como 5-10 mM, a pH 6,0 (muestra 6-2), que a cada concentración de histidina a pH 6,5. Sin embargo, las concentraciones reales de histidina de la muestra 6-3 son 3,3 mM superiores a lo indicado, ya que esta muestra contiene inicialmente 6,6 mM de histidina.

5 La comparación de las muestras 6-1 y 6-3 a 50 ó 100 mM (por la misma razón, la muestra 6-3 también contiene aquí histidina en una cantidad 3,3 mM superior a lo indicado) mostró que la muestra 6-3 tenía un mayor contenido en monómeros con menos agregación. Las muestras 6-1 y 6-3 difieren en el medio de ajuste del pH a 6,5. Es decir, la muestra 6-1 fue ajustada a pH 6,5 con NaOH, mientras que la muestra 6-3 fue ajustada con histidina concentrada  
10 utilizada como base. Por lo tanto, el efecto de estabilización es mayor cuando se usa histidina que cuando se usa el NaOH convencional para ajustar el pH a 6,5.

La Fig. 11 muestra los resultados de la comparación del efecto de la histidina en dos muestras a pH 6,0, es decir, las muestras 6-2 y 6-5. En ambas muestras, la histidina 5-10 mM era la más efectiva.

15 La Fig. 12 muestra los resultados de la comparación de la muestra 6-1 (fosfato/Na 5 mM, pH 6,5), la muestra 6-2 (fosfato/His 5 mM, pH 6,0) y la muestra 6-5 (fosfato/Na 5 mM, pH 6,0). El contenido en agregados era menor en 6-2, seguido de 6-5 y luego de 6-1. Esto confirmaba que el anticuerpo hPM-1 es más estable a pH 6,0. Las muestras 6-2 y 6-5 difieren en el medio de ajuste del pH a 6,0. Es decir, la muestra 6-5 fue ajustada a pH 6,0 con NaOH, mientras  
20 que la muestra 6-2 fue ajustada con histidina concentrada utilizada como base. Por lo tanto, el efecto de estabilización es mayor cuando se usa histidina que cuando se usa NaOH convencional para ajustar el pH a 6,0, de forma similar al pH 6,5.

La Fig. 13 muestra el efecto de la sacarosa (50-200 mM) añadida a la muestra 6-2. Se observó una prevención efectiva de la agregación al aumentar la concentración de sacarosa.

La Fig. 13 también muestra el efecto de la glicina (50-200 mM) añadida a la muestra 6-5. Se observó una prevención notablemente efectiva de la agregación al aumentar la concentración de glicina.

30 La Fig. 14 muestra una comparación del efecto de la glicina o la sacarosa 200 mM en dos muestras a pH 6,0 (6-2 y 6-5). La agregación era menor en 6-2 que en 6-5. Se confirmó además por estos resultados que el ajuste del pH es más efectivo con histidina que con NaOH.

Además, la presente divulgación se refiere a los siguientes puntos:

- 35
1. Una preparación estabilizada que contiene un anticuerpo en un tampón de glicina y/o un tampón de histidina.
  2. La preparación estabilizada del punto 1, en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimérico o un anticuerpo humanizado.
  3. La preparación estabilizada del punto 1 o 2 en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6
  4. La preparación estabilizada del punto 3 en donde el anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado.
  5. La preparación estabilizada del punto 1 en donde la concentración del tampón de glicina y/o del tampón de histidina es 5 mM – 200 mM.
  - 45 6. La preparación estabilizada de uno cualquiera de los puntos 1 a 5 que contiene glicina y/o sacarosa como un agente isotonzante.
  7. La preparación estabilizada del punto 6 que contiene 0,05-1 M de glicina y/o sacarosa.
  8. La preparación estabilizada de uno cualquiera de los puntos 1 a 7, que no contiene NaCl como un agente isotonzante.
  - 50 9. Una preparación estabilizada que contiene glicina y/o sacarosa como agente isotonzante así como un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado en un tampón de glicina y/o un tampón de histidina.
  10. La preparación estabilizada de uno cualquiera de los puntos 1 a 9 que tiene un pH de 5-8.
  11. Un método para estabilizar una preparación de anticuerpos, que comprende incorporar un anticuerpo en un tampón de glicina y/o un tampón de histidina.
  - 55 12. El método del punto 11, que comprende incorporar glicina y/o sacarosa como un agente isotonzante.
  13. Un método para estabilizar una preparación de anticuerpos anti-receptor de interleuquina-6, que comprende incorporar glicina y/o sacarosa como un agente isotonzante así como anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado en un tampón de glicina y/o un tampón de histidina.
  - 60 14. Un procedimiento para preparar una preparación estabilizada que contiene una proteína fisiológicamente activa, que comprende ajustar el pH con un aminoácido básico o un derivado de aminoácido básico o una sal del mismo.
  15. El procedimiento del punto 14 en donde el aminoácido básico es uno o más miembros seleccionados de histidina, arginina y lisina.
  16. El procedimiento del punto 15 en donde el aminoácido básico es histidina.
  - 65 17. El procedimiento de uno cualquiera de los puntos 14 a 16 en donde la proteína fisiológicamente activa es una proteína recombinante.

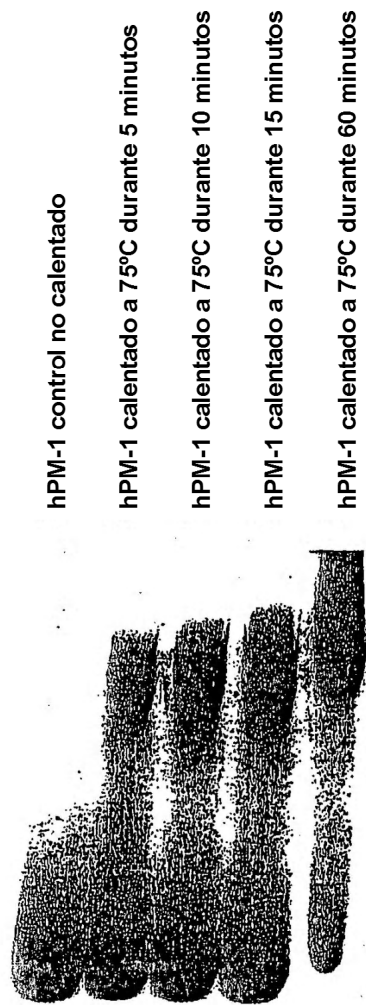
## ES 2 644 275 T3

18. El procedimiento de uno cualquiera de los puntos 14 a 17 en donde la proteína fisiológicamente activa es un anticuerpo.
19. El procedimiento del punto 18 en donde el anticuerpo es un anticuerpo quimerizado o un anticuerpo humanizado.
- 5 20. El procedimiento del punto 18 o 19 en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6.
21. El procedimiento del punto 20 en donde el anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado.
22. Una preparación estabilizada que contiene un anticuerpo en un tampón de histidina y que tiene un pH de 5-7,5.
- 10 23. La preparación estabilizada del punto 22 en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6.
24. La preparación estabilizada del punto 23 en donde el anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado.
25. La preparación estabilizada del punto 24 que tiene un pH de 5,5-6,2.
- 15 26. La preparación estabilizada del punto 25 en donde la concentración de histidina es 1-50 mM.
27. La preparación estabilizada del punto 26 en donde la concentración de histidina es 3-20 mM.
28. La preparación estabilizada del punto 27 en donde la concentración de histidina es 5-10 mM.
29. La preparación estabilizada del punto 24 que tiene un pH de 6,2-7,5.
30. La preparación estabilizada del punto 29 en donde la concentración de histidina es 5-200 mM.
- 20 31. La preparación estabilizada del punto 30 en donde la concentración de histidina es 10-150 mM,
32. La preparación estabilizada del punto 31 en donde la concentración de histidina es 25-100 mM.
33. La preparación estabilizada de uno cualquiera de los puntos 22 a 32 que comprende adicionalmente glicina y/o sacarosa.
34. La preparación estabilizada del punto 33 que contiene 0,05-1 M de glicina y/o sacarosa.
- 25 35. La preparación estabilizada de uno cualquiera de los puntos 22 a 34, que tiene su pH ajustado con un aminoácido básico o un derivado de aminoácido básico o una sal del mismo.

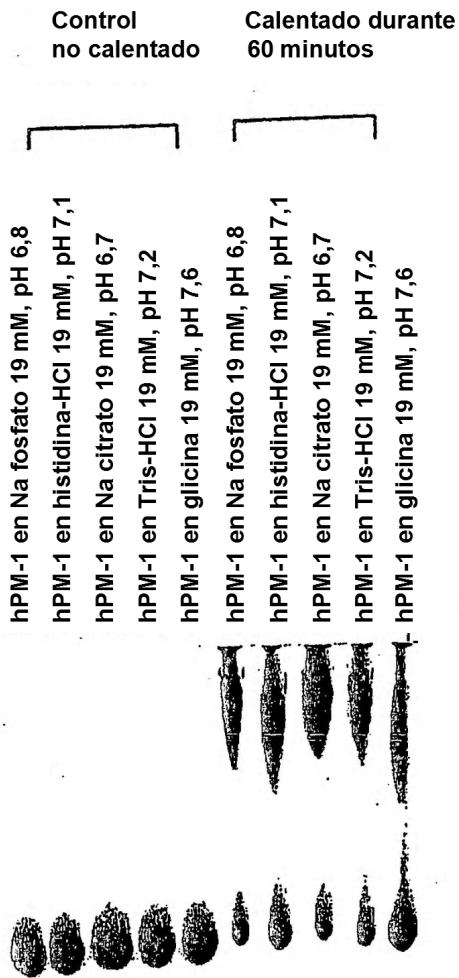
**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento para preparar una preparación estabilizada que contiene una proteína fisiológicamente activa, que comprende ajustar el pH a 5-7,5 con un aminoácido básico, en donde el aminoácido básico es histidina y en donde la proteína fisiológicamente activa es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6.  
5
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 es un anticuerpo anti-receptor de interleuquina-6 humanizado.

*Fig. 1*



*Fig. 2*



*Fig. 3*

Calentado durante 60 minutos

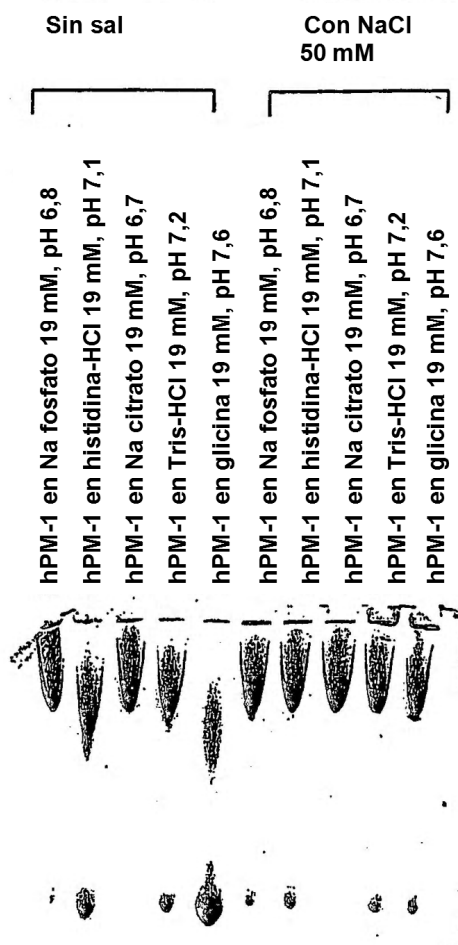




Fig. 4

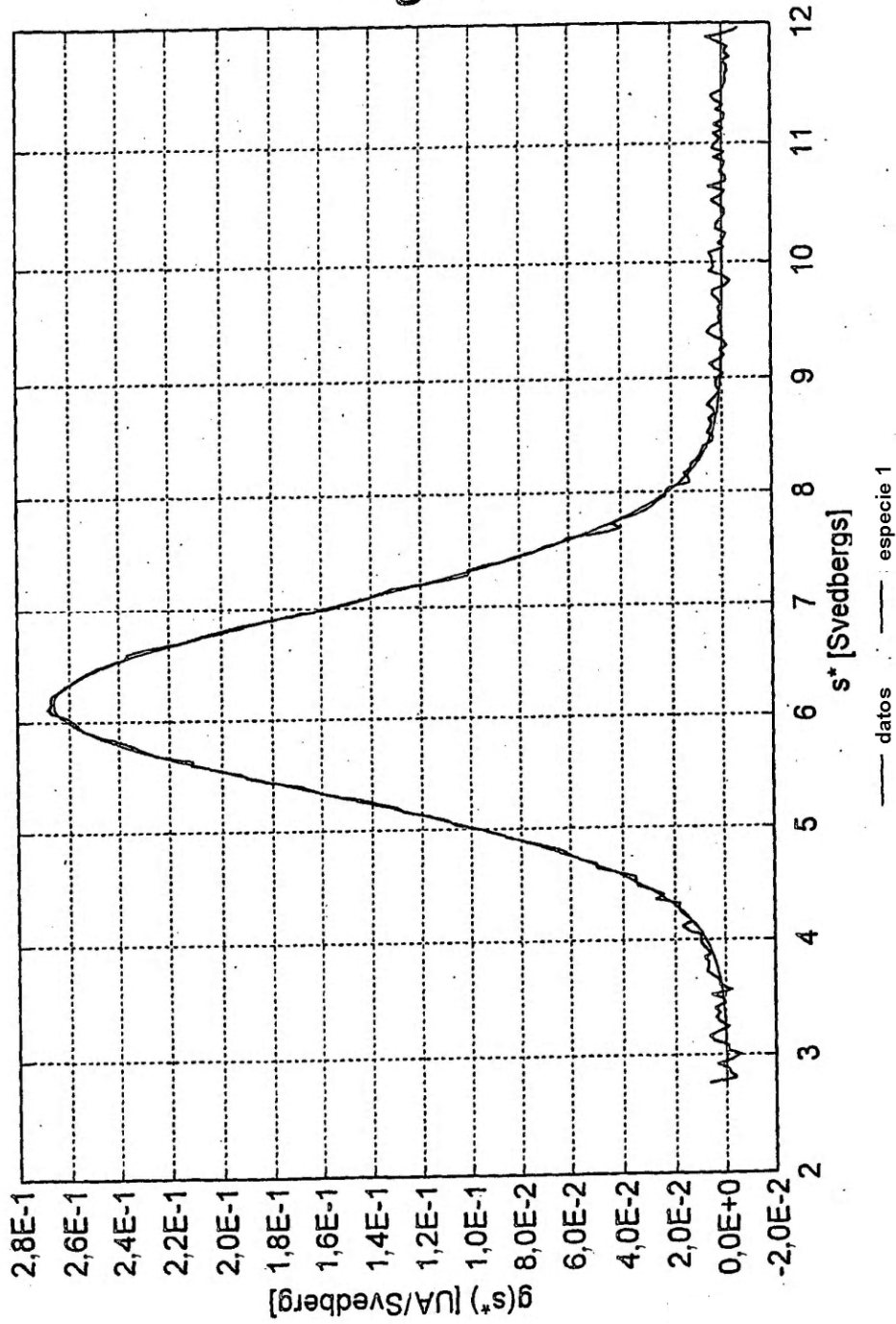


Fig. 5

Análisis de sedimentación de mAb tras calentar a 75°C durante 1 hora

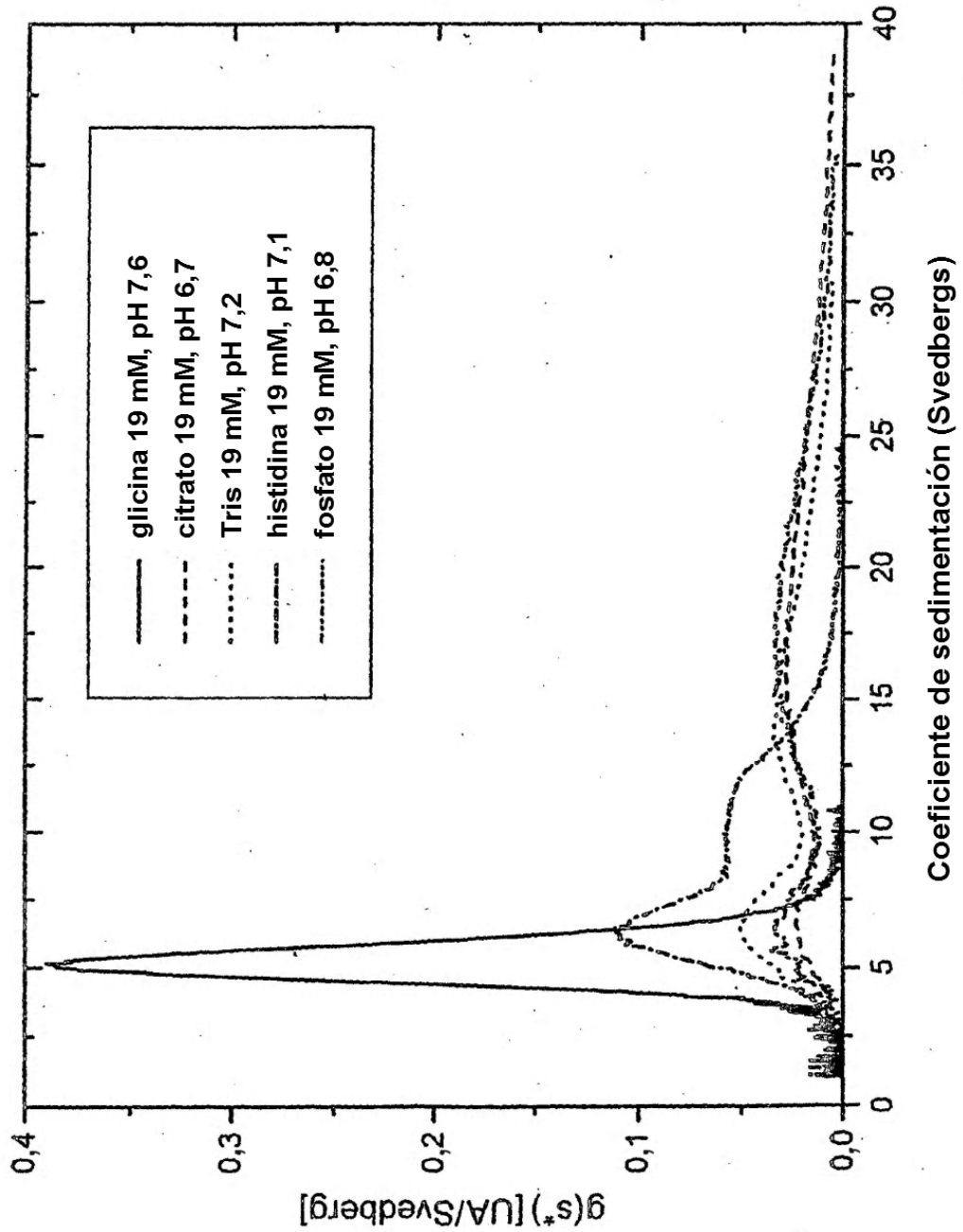
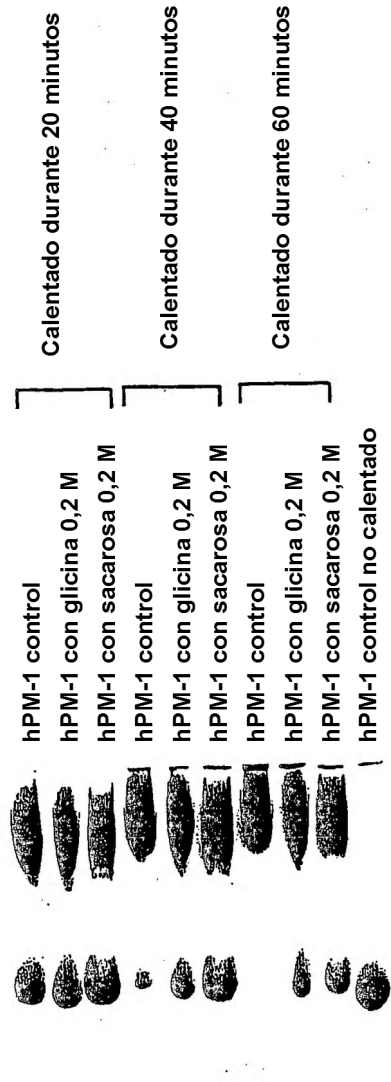
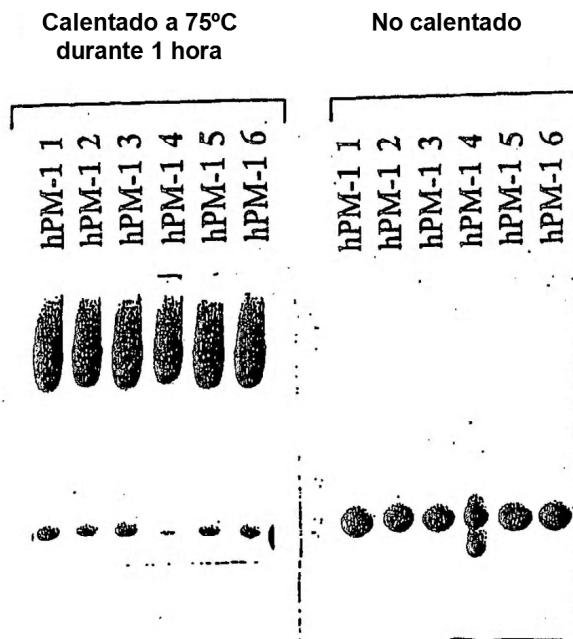


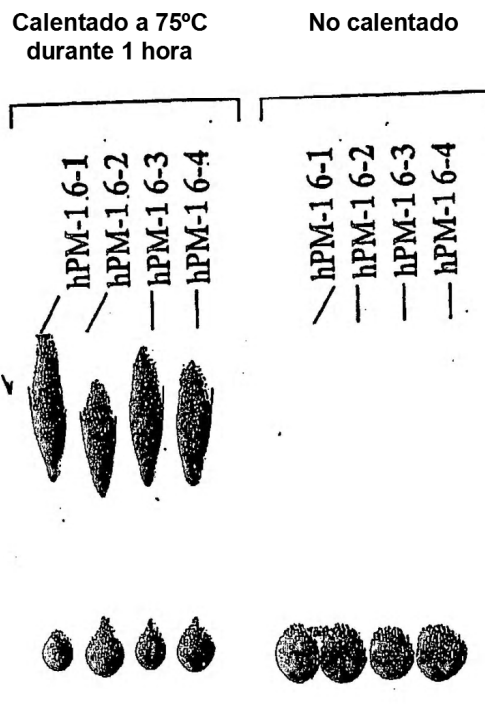
Fig. 6



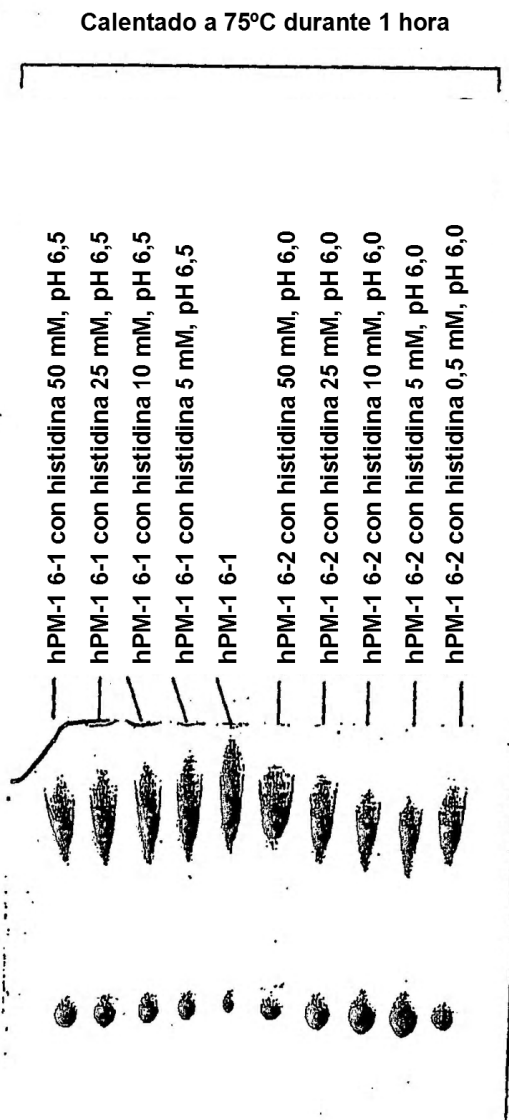
*Fig. 7*



*Fig. 8*

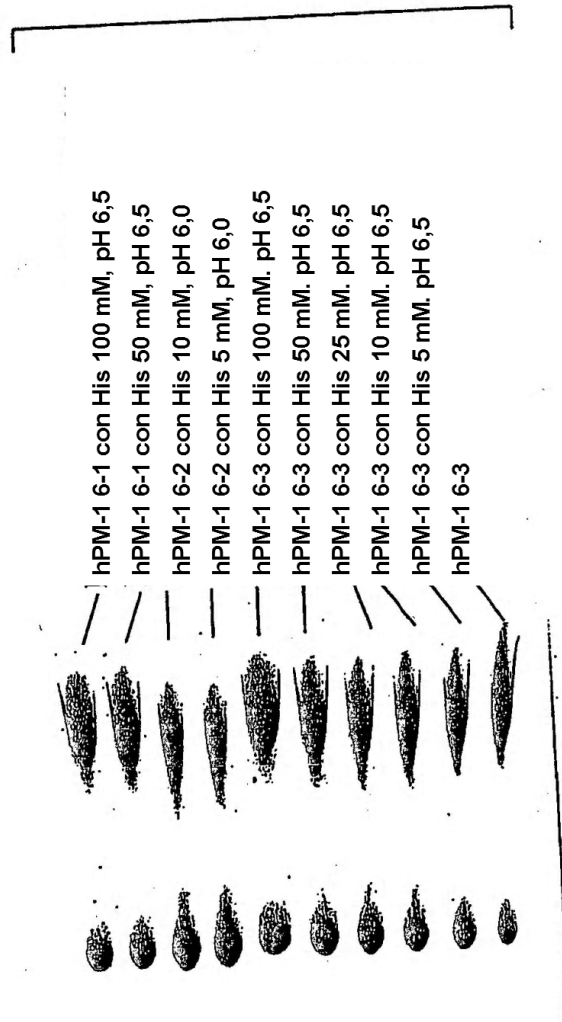


*Fig. 9*



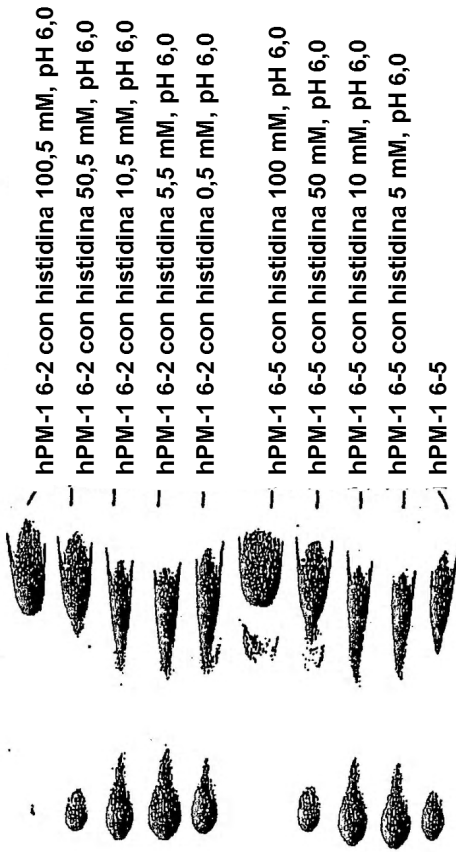
*Fig. 10*

Calentado a 75°C durante 1 hora



*Fig. 11*

Calentado a 75°C durante 1 hora

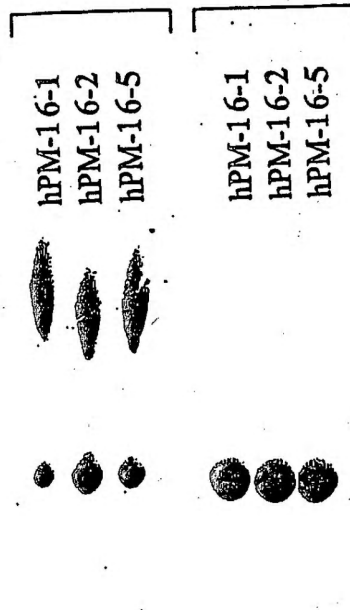




*Fig. 12*

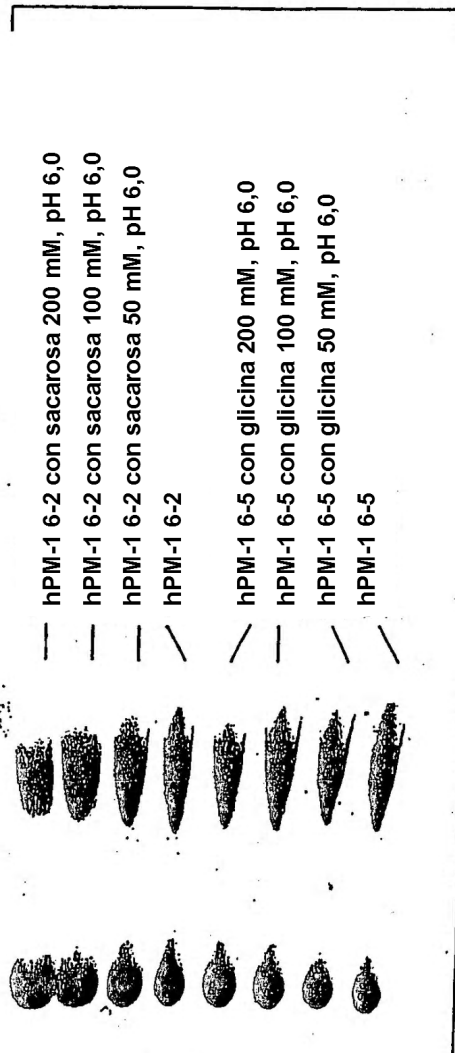
Calentado a 75°C  
durante 1 hora

No calentado



*Fig. 13*

Calentado a 75°C durante 1 hora



*Fig. 14*

Calentado a 75°C durante 1 hora

