

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 671 224**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 9/08 (2006.01)

A61K 9/19 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 47/26 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.01.2011 PCT/JP2011/050911**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.07.2011 WO11090088**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.01.2011 E 11734694 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2526963**

54 Título: **Formulaciones líquidas que contienen anticuerpos estabilizados**

30 Prioridad:

20.01.2010 JP 2010010060

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

05.06.2018

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**IGAWA, TOMOYUKI y
MORIYAMA, CHIFUMI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 671 224 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 que contienen anticuerpos estabilizados

Campo de la técnica

5 La presente invención se refiere a formulaciones que contienen anticuerpos, en particular a las formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados y estables.

Antecedentes de la técnica

10 En los últimos años, existe una demanda creciente para que se desarrollen formulaciones autoinyectables que contienen anticuerpos para la inyección subcutánea según las necesidades médicas. El diseño de formulaciones que contienen anticuerpos para la inyección subcutánea hace necesario incrementar la concentración del anticuerpo en la solución administrada, ya que las dosis únicas de anticuerpo son muy altas (aproximadamente de 100 a 200 mg) y el volumen de inyección para la inyección subcutánea está por lo general limitado.

15 Las soluciones que contienen anticuerpos muy concentrados tienden a formar soluciones muy viscosas por sí mismas debido a las interacciones intermoleculares y a las características macromoleculares de las proteínas. Además, el fenómeno de la degradación, tal como la agregación, se vuelve problemático cuando las proteínas se conservan como soluciones muy concentradas y, así pues, se debe evitar esta degradación. En particular, las soluciones que contienen anticuerpos muy concentrados tienden a formar agregados durante la congelación y descongelación, o cuando se conservan en condiciones de líquido o en congelación durante un mucho tiempo (documentos que no son patentes 1 y 2).

20 Hasta la fecha, tales formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados se preparan por lo general mediante el método convencional de concentración por liofilización (documento de patente 1), que es un método para estabilizar las formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados. En el método, se obtienen formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados mediante la liofilización de una solución de anticuerpos de una concentración relativamente baja y la disolución en un volumen de agua más pequeño que el volumen anterior a la liofilización. En este caso, el incremento de la viscosidad de las formulaciones disueltas se convierte en un problema porque se debe añadir un crioprotector, tal como azúcar, para obtener las formulaciones liofilizadas.

25 En este aspecto, este problema se puede evitar cuando se prepara una formulación líquida sin liofilización. Sin embargo, tal y como está descrito más arriba, las formulaciones líquidas que contienen anticuerpos muy concentrados tienden a formar agregados. No obstante, tales formulaciones están muy solicitadas porque las formulaciones líquidas que contienen anticuerpos son más fáciles de manipular que las formulaciones liofilizadas, y se pueden formular con facilidad en formulaciones para jeringuillas precargadas.

30 Se han realizado diferentes estudios para estabilizar las formulaciones líquidas que contienen anticuerpos muy concentrados (documentos que no son patentes 1 a 4). Se ha descrito que el tampón de histidina y la arginina son útiles como tamponante y estabilizante, respectivamente, en las formulaciones líquidas que contienen anticuerpos (documentos de patente 2, 3, 4, 5 y 6). El tampón de histidina se suele utilizar en forma de la sal de ácido clorhídrico. Recientemente, se ha descrito que histidina-acetato muestra un efecto de estabilización más alto que histidina-hidrocloruro y, así pues, el ácido acético es útil a modo de contraión en el tampón de histidina (documento de patente 6). En otro orden de cosas, la arginina como estabilizante se ha utilizado por lo general en forma de arginina-hidrocloruro. Sin embargo, en algunos casos no se obtiene suficiente estabilidad cuando se utiliza el ácido clorhídrico o el ácido acético a modo de contraión para la histidina o para la arginina. Así pues, se necesitan mejores contraiones.

Documentos de la técnica anterior

Documentos de patente

Documento de patente 1: WO 1997/004801

Documento de patente 2: WO 2008/121615

45 Documento de patente 3: WO 2009/141239

Documento de patente 4: WO 2008/071394

Documento de patente 5: WO 2006/065746

Documento de patente 6: WO 2006/044908

Documentos que no son patentes

50 Documento 1 que no es patente: «Challenges in the development of high protein concentration formulations», J

Pharm. Sci., 2004, 93 (6), 1390-1402.

Documento 2 que no es patente: *Curr. Opin. Biotechnol.* Diciembre de 2009; 20(6): 708-14. Epub 31 de octubre de 2009

Documento 3 que no es patente: «Antibody structure, instability and formulation», *J. Pharm. Sci.* 2007, 96 (1), 1-26.

5 Documento 4 que no es patente: «Formulation and delivery issues for monoclonal antibody therapeutics», *Adv. Drug Del Rev*, 2006, 58 (5-6), 686-706.

Descripción de la invención

Problemas a solucionar por la invención

10 Un objetivo de la presente invención es dar a conocer formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados y estables que son idóneas para la administración subcutánea.

Medios para solucionar los problemas

15 Para conseguir el objetivo que se acaba de describir, los presentes inventores llevaron a cabo estudios especializados. Como resultado, los presentes inventores descubrieron que se conseguía un efecto de estabilización significativamente mayor con el uso de un aminoácido ácido, ácido aspártico o ácido glutámico, a modo de contraión en el tampón de histidina o en el tampón de tris(hidroximetil)aminometano, a saber, el tampón de histidina-aspartato o el tampón de histidina-glutamato, o el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-aspartato o el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-glutamato, en comparación con los tampones convencionalmente descritos para las formulaciones farmacéuticas, tales como el tampón de histidina-hidrocloreuro y el tampón de histidina-acetato. Los presentes inventores también descubrieron que se conseguía un efecto de estabilización significativamente mayor con el uso de arginina-aspartato o arginina-glutamato a modo de estabilizante, a saber, mediante el uso de un aminoácido ácido, ácido aspártico o ácido glutámico, a modo de contraión para un aminoácido básico, tal como la arginina, que se utiliza a modo de estabilizante en comparación con los estabilizantes convencionalmente descritos para las formulaciones farmacéuticas, tales como arginina-hidrocloreuro. Así pues, los presentes inventores descubrieron que se pueden obtener las formulaciones líquidas que contienen anticuerpos muy concentrados y estables cuando se les añade a modo de estabilizante y, como consecuencia de esto, completaron la presente invención.

En concreto, la presente invención da a conocer:

- [1] una formulación que comprende anticuerpos estables que comprende aminoácido básico-aspartato, en donde dicho aminoácido básico se selecciona del grupo que consiste en histidina y arginina,
- 30 y en donde dicha formulación es una formulación líquida;
- [2] la formulación de [1] que comprende el tampón de histidina-aspartato, en donde el aminoácido básico es histidina;
- [3] la formulación de [1] que comprende arginina-aspartato, en donde el aminoácido básico es arginina;
- [4] una formulación que comprende anticuerpos estables que comprende el tampón de histidina-aspartato y arginina-aspartato;
- 35 [5] una formulación que comprende anticuerpos estables que comprende el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-aspartato o el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-glutamato;
- [6] una formulación que comprende anticuerpos estables que comprende el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-aspartato y el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-glutamato;
- [7] la formulación según cualquiera de [1] a [6], que no comprende sustancialmente el ion cloruro ni el ion acetato;
- 40 [8] la formulación según cualquiera de [1] a [7], que comprende adicionalmente un azúcar;
- [9] la formulación según cualquiera de [1] a [8], en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de humano;
- [10] la formulación según cualquiera de [1] a [9], en donde el anticuerpo ha sido modificado para que tenga un punto isoeléctrico (pI) de 5 a 8;
- 45 [11] la formulación según cualquiera de [1] a [10], en donde la concentración del anticuerpo es de 50 mg/ml o más;
- [12] la formulación según cualquiera de [1] a [10], en donde la concentración del anticuerpo es de 50 a 250 mg/ml;

[13] la formulación según cualquiera de [1] a [12], en donde la viscosidad de la formulación líquida es de 30 mPa · s o menos;

[14] la formulación según cualquiera de [1] a [13], en donde la formulación líquida es estable de 2 °C a 8 °C durante al menos seis meses;

5 [15] la formulación según cualquiera de [1] a [14], que no ha sido sometida a liofilización durante la preparación de la formulación;

[16] la formulación según cualquiera de [1] a [15], que está conservada en congelación de -30 °C a -10 °C;

[17] la formulación según cualquiera de [2], [4], y [7] a [16], en donde la concentración del tampón es de 5 a 100 mM;

[18] la formulación según cualquiera de [3] y [7] a [17], en donde la concentración de arginina es de 5 a 300 mM;

10 [19] la formulación según cualquiera de [1] a [18], en donde el anticuerpo es un anticuerpo contra el receptor de IL-6;

[20] la formulación según cualquiera de [2], [4] y [7] a [19], en donde el tampón comprende sustancialmente sólo uno o varios aminoácidos;

[21] la formulación según cualquiera de [1] a [20], que es para la administración subcutánea;

15 [22] un método para suprimir la formación de agregados durante la conservación en congelación de una formulación que comprende anticuerpos muy concentrados mediante el uso de ácido aspártico a modo de contraíón para un tampón en la formulación, en donde dicho tampón es histidina-aspartato o tris(hidroximetil)aminometano-aspartato;

[23] un método para suprimir la formación de agregados durante la conservación como líquido de una formulación que comprende anticuerpos muy concentrados mediante el uso de ácido aspártico a modo de contraíón para un tampón en la formulación, en donde dicho estabilizante es arginina;

20 en donde dicha formulación es una formulación líquida;

[24] un método para suprimir la formación de agregados durante la conservación en congelación de una formulación que comprende anticuerpos muy concentrados mediante el uso de ácido aspártico a modo de contraíón para un estabilizante en la formulación, en donde dicho estabilizante es arginina; en donde dicha formulación es una formulación líquida; y

25 [25] un método para suprimir la formación de agregados durante la conservación como líquido de una formulación que comprende anticuerpos muy concentrados mediante el uso de ácido aspártico a modo de contraíón para un estabilizante en la formulación para un tampón en la formulación, en donde dicho tampón es histidina-aspartato o tris(hidroximetil)aminometano-aspartato.

30 Además, la presente especificación describe el uso de aminoácido básico-aspartato o aminoácido básico-glutamato en la fabricación de una formulación que comprende anticuerpos estables; y ácido aspártico o ácido glutámico a modo de contraíón para un tampón o estabilizante en una formulación que comprende anticuerpos muy concentrados, utilizada en un método para suprimir la agregación de la formulación durante la conservación en congelación o la conservación como líquido.

Efectos de la invención

35 La presente invención da a conocer formulaciones que contienen anticuerpos que tienen mayor estabilidad. La presente invención también puede dar a conocer formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados mediante la supresión de la formación de agregados en las formulaciones líquidas y congeladas. Las formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados de la presente invención se pueden conservar de manera estable en una condición de líquido o en congelación durante mucho tiempo. Además, las formulaciones de la presente
40 invención tienen mejorada la estabilidad contra el estrés de la congelación y descongelación. Además, en términos de presión osmótica, la estabilización se puede conseguir sin incrementar la presión osmótica, mediante el uso de ácido aspártico en vez del ácido clorhídrico y el ácido acético que se utilizan convencionalmente a modo de contraíón para histidina, arginina o tris(hidroximetil)aminometano. Es ventajoso conseguir la estabilización sin incrementar la presión osmótica, cuando se pretenden producir formulaciones estables casi isotónicas, tales como
45 formulaciones para la administración subcutánea (s.c.).

Breve descripción de los dibujos

En la figura 1 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la conservación del Acm1 a 40 °C.

50 En la figura 2 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la conservación del Acm2 a 40 °C.

- En la figura 3 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación del Acm1.
- En la figura 4 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la conservación del Acm1 a 25 °C.
- 5 En la figura 5 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la conservación del Acm1 a 5 °C.
- En la figura 6 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (de -20 °C a temperatura ambiente) del Acm1.
- 10 En la figura 7 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa la cantidad (%) de agregados al cabo de tres meses de conservación del Acm1 a -20 °C.
- En la figura 8 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (de -20 °C a temperatura ambiente) del Acm2.
- En la figura 9 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa la cantidad (%) de agregados después de conservación del Acm1 a -20 °C.
- 15 En la figura 10 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa la cantidad (%) de agregados después de la congelación y descongelación (de -20 °C a temperatura ambiente) del Acm1.
- En la figura 11 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa la cantidad (%) de agregados al cabo de tres meses de conservación del Acm1 a 25 °C.
- 20 En la figura 12 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la conservación del Acm2 a 25 °C.
- En la figura 13 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la conservación del Acm3 a 25 °C.
- En la figura 14 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (entre -20 °C y temperatura ambiente) del Acm3.
- 25 En la figura 15 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la conservación del Acm4 a 25 °C.
- En la figura 16 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (entre -20 °C y temperatura ambiente) del Acm4.
- 30 En la figura 17 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la conservación de los Acm1, Acm2 y Acm3 a 25 °C.
- En la figura 18 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (entre -20 °C y temperatura ambiente) de los Acm1, Acm2 y Acm3.
- 35 En la figura 19 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la conservación del Acm5 a 25 °C.
- En la figura 20 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (entre -20 °C y temperatura ambiente) del Acm5.
- En la figura 21 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la conservación de los Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5 a 25 °C.
- 40 En la figura 22 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (entre -20 °C y temperatura ambiente) de los Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5.
- En la figura 23 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la conservación de los Acm1, Acm2 y Acm3 a 25 °C.
- 45 En la figura 24 hay una gráfica en cuyo eje vertical se representa el cambio de la cantidad (%) de agregados en función del tiempo durante la congelación y descongelación (entre -20 °C y temperatura ambiente) de los Acm1, Acm2 y Acm3.

Modo de llevar a la práctica la invención

A continuación, en la presente memoria, la presente invención se describirá con más detalle.

La presente invención da a conocer formulaciones que contienen anticuerpos estables que contienen aminoácido básico-aspartato. En la presente invención, dicho aminoácido básico se selecciona del grupo que consiste en histidina y arginina.

En concreto, la presente invención da a conocer formulaciones que contienen anticuerpos estables que contienen el tampón de histidina-aspartato, en donde el aminoácido básico es la histidina. Además, la presente invención da a conocer formulaciones que contienen anticuerpos estables que contienen arginina-aspartato como estabilizante, en donde el aminoácido básico es la arginina. La presente invención también da a conocer formulaciones que contienen anticuerpos estables que contienen el tampón de histidina-aspartato y arginina-aspartato. Además, la presente invención da a conocer formulaciones que contienen anticuerpos estables que contienen el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-aspartato o el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-glutamato. La presente invención también da a conocer formulaciones que contienen anticuerpos estables que contienen el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-aspartato y el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-glutamato. La formulación que contiene anticuerpos de la presente invención hace referencia a una formulación que contiene un anticuerpo como un ingrediente activo y que se prepara en una forma que permite la administración a animales, tal como un humano.

En la presente memoria, «formulación que contiene anticuerpos estables» hace referencia a una formulación en la que la agregación de proteínas, tal como un anticuerpo, apenas se forma, en concreto, una formulación en la que la degradación, tal como la formación de agregados solubles e insolubles, apenas se produce durante la conservación en una condición de líquido o en congelación.

La concentración del anticuerpo en una formulación de la presente invención no está particularmente limitada; sin embargo, la formulación contiene preferiblemente un anticuerpo muy concentrado. La concentración del anticuerpo es preferiblemente de 50 mg/ml o más, más preferiblemente de 100 mg/ml o más, incluso más preferiblemente de 120 mg/ml o más, aún más preferiblemente de 150 mg/ml o más, y todavía más preferiblemente de 180 mg/ml o más. El límite superior de la concentración del anticuerpo en una formulación de la presente invención no está particularmente limitado; sin embargo, el límite es por lo general de 250 mg/ml.

Los anticuerpos utilizados en la presente invención no están particularmente limitados, con tal de que se fijen a un antígeno de interés. Los anticuerpos podrían ser anticuerpos monoclonales o policlonales; sin embargo, se prefieren los anticuerpos monoclonales ya que se pueden producir de manera estable como anticuerpos homogéneos.

Los anticuerpos monoclonales utilizados en la presente invención incluyen no solo los procedentes de animales tales como humanos, ratones, ratas, hámsteres, conejos, ovejas, camellos y monos, sino también los anticuerpos recombinantes de genes modificados artificialmente, tales como anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados y anticuerpos biespecíficos. Los anticuerpos de la presente invención también incluyen anticuerpos por recombinación génica que son el resultado de modificar artificialmente las regiones constantes del anticuerpo para alterar las propiedades físicas de la molécula de anticuerpo (en concreto, la alteración del punto isoeléctrico (pI), la mejora de la afinidad por el receptor Fc, etc.) con el propósito de mejorar la persistencia de la sangre y la farmacocinética *in vivo*.

La clase de inmunoglobulinas de los anticuerpos utilizados en la presente invención no está particularmente limitada; y la clase podría ser cualquier clase, entre ellas IgG, tales como IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4, IgA, IgD, IgE e IgM. Sin embargo, se prefieren la IgG y la IgM.

Los anticuerpos utilizados en la presente invención también incluyen no solo los anticuerpos enteros, sino también los fragmentos de anticuerpo, tales como Fv, Fab y F(ab)₂, y minicuerpos (anticuerpos de masa molecular baja), tales como Fv de cadena única monovalentes o bivalentes que son el resultado de conectar las regiones variables del anticuerpo a través de un conector, tal como un conector peptídico (scFv, sc(Fv)₂), diacuerpos tales como el dímero de scFv, etc.).

Los anticuerpos descritos más arriba que se han utilizado en la presente invención se pueden preparar mediante los métodos conocidos por los expertos en la técnica.

Básicamente, se pueden preparar hibridomas productores de anticuerpos monoclonales mediante los métodos convencionales que se describen a continuación. En concreto, la inmunización se lleva a cabo mediante un método de inmunización convencional en el que se utiliza un antígeno deseado o células que expresan el antígeno deseado, tal como un antígeno sensibilizante. Los inmunocitos preparados se fusionan con células parentales conocidas mediante un método convencional de fusión de células. Entre las células fusionadas se seleccionan las células productoras de anticuerpos monoclonales (hibridomas) mediante los métodos de detección selectiva convencionales. Los hibridomas se pueden generar, por ejemplo, según el método de Milstein et al. (Kohler, G y Milstein, C. *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46). Cuando el antígeno es poco inmunógeno, la inmunización se puede realizar con el antígeno unido a macromoléculas inmunógenas, tales como la albúmina.

Como alternativa, es posible utilizar anticuerpos recombinantes de genes mediante el uso de técnicas de recombinación génica en las que los genes de los anticuerpos se clonan de hibridomas y se insertan en los vectores apropiados, y los vectores resultantes se introducen en hospedadores (véase, por ejemplo, Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, *Therapeutic Monoclonal Antibodies*, publicado en el Reino Unido por Macmillan Publishers, 1990).

5 En concreto, los ADNc para las regiones variables de los anticuerpos (regiones V) se sintetizan a partir de los ARNm de los hibridomas mediante el uso de la transcriptasa inversa. Cuando se obtiene un ADN que codifica una región V del anticuerpo de interés, el ADN se conecta a un ADN que codifica una región constante de anticuerpo (región C) deseada. La construcción resultante se inserta en un vector de expresión. Como alternativa, el ADN que codifica la región V de anticuerpo se podría insertar en un vector de expresión que lleva el ADN de la región C del anticuerpo.

10 La construcción resultante se inserta en un vector de expresión de tal modo que se expresa bajo el control de una región reguladora de la expresión, por ejemplo, potenciador y promotor. A continuación, las células hospedadoras se transforman con el vector de expresión para expresar el anticuerpo.

En la presente invención, los anticuerpos recombinantes de genes modificados artificialmente, tales como anticuerpos quiméricos y humanizados, se pueden utilizar para reducir la antigenia heteróloga contra humano. Tales anticuerpos modificados se pueden producir con los métodos conocidos. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo que tiene las regiones variables de la cadena pesada y de la cadena ligera de un anticuerpo de un mamífero no humano, tal como ratón, y las regiones constantes de la cadena pesada y de la cadena ligera de un anticuerpo de humano. El anticuerpo quimérico se puede producir mediante la unión de un ADN que codifica las regiones variables de un anticuerpo de ratón a un ADN que codifica las regiones constantes de un anticuerpo de humano, la inserción de lo ligado en un vector de expresión y, a continuación, la introducción del vector en el interior de un hospedador para que se exprese.

15

20

Un anticuerpo humanizado también se denomina anticuerpo humano remodelado y se obtiene por sustitución de la región determinante de complementariedad (CDR, por su nombre en inglés) de un anticuerpo de humano para la región determinante de complementariedad de un anticuerpo procedente de un mamífero no humano, por ejemplo, ratón. Se conocen las técnicas convencionales de recombinación génica. En concreto, una secuencia de ADN se diseña para que tenga una CDR de anticuerpo de ratón unida a una región flanqueante (FR, por su nombre en inglés) de anticuerpo de humano, y se sintetiza por PCR con varios oligonucleótidos preparados para tener regiones solapantes en sus extremos. El ADN obtenido se liga a un ADN que codifica una región constante de anticuerpo de humano, y, a continuación, se inserta en un vector de expresión. El vector de expresión se introduce en un hospedador para producir el anticuerpo humanizado (véanse la publicación de la solicitud de patente europea n.º EP 239400 y la solicitud de patente internacional WO 96/02576). La FR del anticuerpo humano unida a la CDR se selecciona de tal modo que la región determinante de complementariedad forma un dominio de fijación al antígeno preferida. Los aminoácidos de la región flanqueante de la región variable del anticuerpo se pueden sustituir cuando sea necesario, de tal modo que la región determinante de complementariedad del anticuerpo humano remodelado forma un dominio idóneo de fijación al antígeno (Sato, K. et al., *Cancer Res.* (1993) 53, 851-856).

25

30

35

Se conocen técnicas para sustituir los aminoácidos de los anticuerpos para mejorar la actividad de los anticuerpos, las propiedades físicas, la farmacocinética, la seguridad, etc. Ejemplos de tales técnicas se describen a continuación. Los anticuerpos de la presente invención también incluyen los que tienen tales sustituciones de aminoácidos.

Se han descrito técnicas para sustituir los aminoácidos en las regiones variables de los anticuerpos IgG e incluyen la humanización (Tsurishita N., Hinton P. R., Kumar S., «Design of humanized antibodies: from anti-Tac to Zenapax», *Methods*. Mayo de 2005, 36 (1): 69-83); la maduración de la afinidad para realzar la actividad de fijación a través de la sustitución de aminoácidos en la región determinante de complementariedad (CDR) (Rajpal A., Beyaz N., Haber L., Cappuccilli G., Yee H., Bhatt R. R., Takeuchi T., Lerner R. A., Crea R., «A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries», *Proc. Natl Acad Sci USA*, 14 de junio de 2005, 102 (24): 8466-71); y la mejora de la estabilidad fisicoquímica a través de la sustitución de aminoácidos en región flanqueante (FR) (Ewert S., Honegger A., Pluckthun A., «Stability improvement of antibodies for extracellular and intracellular applications: CD grafting to stable frameworks and structure-based framework engineering», *Methods*. Octubre de 2004; 34 (2): 184-99. Revisión). También se conocen técnicas para reforzar la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC) mediante la sustitución de los aminoácidos del dominio Fc del anticuerpo de tipo IgG (Kim S. J., Park Y., Hong H. J., «Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies», *Mol Cells*. 31 de agosto de 2005; 20 (1): 17-29. Revisión). Por otra parte, además de las técnicas para realzar las funciones efectoras, hay informes publicados sobre técnicas para mejorar la semivida del anticuerpo en la sangre mediante la sustitución de aminoácidos en Fc (Hinton P. R., Xiong J. M., Johlfs M. G., Tang M. T., Keller S., Tsurushita N., «An engineered human IgG1 antibody with longer serum half-life», *J Immunol*. 1 de enero de 2006, 176 (1): 346-56; Ghetie V., Popov S., Borvak J., Radu C., Matesoi D., Medesan C., Ober R. J., Ward E.S., «Increasing the serum persistence of an IgG fragment by random mutagenesis», *Nat. Biotechnol*. Julio de 1997; 15 (7): 637-40). Otra técnica conocida incluye la técnica de sustitución de aminoácidos para controlar el punto isoeléctrico (pI) de un anticuerpo con el propósito de mejorar la persistencia en la sangre o la farmacocinética *in vivo*, en concreto, una técnica para modificar los restos aminoacídicos expuestos en la superficie de un anticuerpo para controlar el pI del anticuerpo (solicitud de patente internacional WO 07/114319). También se conocen diferentes técnicas para sustituir aminoácidos en las regiones constantes con el propósito de mejorar las propiedades físicas de un anticuerpo (solicitud de patente internacional WO 09/41613).

40

45

50

55

60

Se puede esperar una reducción de la dosificación del anticuerpo a modo de sustancia farmacéutica o que se extienda el intervalo de administración del anticuerpo cuando se prolonga la semivida o la retención plasmática de un anticuerpo. Las tecnologías prometedoras para conseguir esto incluyen una técnica para hacer disminuir el punto isoelectrico del anticuerpo (solicitud de patente internacional WO 07/114319). Las formulaciones de la presente invención tienen un efecto muy estabilizante para los anticuerpos con un punto isoelectrico alterado. El anticuerpo con el pl modificado hace referencia a un anticuerpo modificado cuyo pl es más bajo que el del anticuerpo original en una o más, preferiblemente dos o más y más preferiblemente tres o más. En general, se supone que los anticuerpos naturales (o corrientes) tienen un punto isoelectrico dentro del margen de 7,5 a 9,5. Las formulaciones de la presente invención tienen un efecto muy estabilizante para, en particular, los anticuerpos con un punto isoelectrico bajo que apenas existen en la naturaleza. El punto isoelectrico de tales anticuerpos podría ser de 5,0 a 8,0, preferiblemente de 5,0 a 7,5, más preferiblemente de 5,0 a 7,0, y aún más preferiblemente de 5,5 a 6,5. Tal y como se describe en los ejemplos que vienen a continuación, el punto isoelectrico del Acm1, que se produjo a partir de la modificación de la secuencia aminoacídica del Acm2 (punto isoelectrico = 9,3) para controlar el punto isoelectrico, era de 5,8.

También se conocen métodos para obtener anticuerpos de humano. Por ejemplo, los anticuerpos de humano deseados con actividad de fijación al antígeno se pueden obtener mediante la sensibilización de los linfocitos humanos con un antígeno de interés o con células que expresan un antígeno de interés *in vitro*; y la posterior fusión de los linfocitos sensibilizados con células de mieloma de humano, tales como U266 (véase la solicitud de patente japonesa de Kokoku con publicación n.º (JP-B) H01-59878 (solicitud de patente japonesa evaluada y aprobada, y publicada por oposición)). Como alternativa, se pueden obtener también los anticuerpos de humano deseados al inmunizar con un antígeno los animales transgénicos que tienen el repertorio completo de los genes de anticuerpos humanos (véanse las solicitudes de patente internacional n.ºs WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735). Además, se conocen las técnicas para obtener anticuerpos de humano mediante rondas de criba de una genoteca de anticuerpos de humano. Por ejemplo, las regiones variables de los anticuerpos de humano se pueden expresar como anticuerpos monocatenarios (scFvs, por su nombre en inglés) sobre la superficie de los fagos mediante un método de exposición en fagos y, a continuación, se pueden seleccionar los fagos que se fijan al antígeno. Los genes de los fagos seleccionados se pueden analizar para determinar las secuencias de ADN que codifican las regiones variables de los anticuerpos de humano que se fijan al antígeno. Cuando se identifican las secuencias de ADN de los scFvs que se fijan al antígeno, se pueden construir vectores de expresión apropiados que llevan estas secuencias para obtener los anticuerpos de humano. Tales métodos ya se conocen bien. Véanse las solicitudes de patente internacional WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388. Los anticuerpos utilizados en la presente invención también incluyen tales anticuerpos de humano.

Cuando se aíslan los genes de los anticuerpos y se introducen en los hospedadores apropiados para producir anticuerpos, se pueden utilizar hospedadores y vectores de expresión en las combinaciones adecuadas. Cuando las células eucariotas se usan a modo de hospedador, se pueden utilizar células animales, células vegetales y células de hongos. Las células animales incluyen: (1) células de mamífero, tales como células CHO, COS, de mieloma, de riñón de cría de hámster (BHK), HeLa y Vero; (2) células de anfibio, tales como de oocitos de *Xenopus*; y (3) células de insecto, tales como sf9, sf21 y Tn5. Las células vegetales conocidas incluyen las células procedentes del género *Nicotiana*, tales como *Nicotiana tabacum*, que se pueden cultivar como un callo. Las células de hongos conocidas incluyen las de levadura, tales como el género *Saccharomyces*, por ejemplo, *Saccharomyces cerevisiae*, y las de hongos filamentosos, tales como el género *Aspergillus*, por ejemplo, *Aspergillus niger*. Cuando se usan células procariontas, se pueden utilizar sistemas de producción que usan células bacterianas. Las células bacterianas conocidas incluyen *Escherichia coli* (*E. coli*) y *Bacillus subtilis*. Los anticuerpos se pueden obtener mediante la introducción por transformación de los genes del anticuerpo de interés en el interior de estas células, y a continuación el cultivo *in vitro* de las células transformadas.

Los anticuerpos utilizados en la presente invención también incluyen fragmentos de anticuerpo, minicuerpos y anticuerpos modificados. Tales fragmentos de anticuerpo y minicuerpos incluyen, por ejemplo, Fab, F(ab')₂, Fv o Fv monocatenario mono-, bi- o multivalentes (scFv, sc(Fv)₂ o similares) que son el resultado de unir las Fv de las cadenas ligera y pesada mediante los conectores apropiados (Huston S. et al, (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 85: 5879-5883). En concreto, tales fragmentos de anticuerpo se generan al tratar los anticuerpos con una enzima, tal como la papaína o la pepsina. Como alternativa, se construye el gen que codifica un fragmento de anticuerpo, se inserta en un vector de expresión y se expresa en las células hospedadoras apropiadas (véanse, por ejemplo, Co, M. S et al., *J. Immunol.* (1994) 152, 2968-2976; Better, M. y Horwitz, A. H. *Methods Enzymol.* (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. y Skerra, A. *Methods Enzymol.* (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., *Methods Enzymol.* (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., *Methods Enzymol.* (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. y Walker, B. W., *Trends Biotechnol.* (1991) 9, 132-137).

Los anticuerpos modificados incluyen anticuerpos unidos a polietilenglicol (PEG) o diferentes moléculas, tales como agentes citotóxicos (*Farmacología*. 30 de agosto de 1999; 54 (8): 497-516; *Cancer J.* Mayo-junio de 2008; 14 (3): 154-69). Los «anticuerpos» de la presente invención también incluyen tales anticuerpos modificados. Tales anticuerpos modificados se pueden preparar mediante la modificación química de los anticuerpos obtenidos. Tales métodos ya están consolidados en este campo.

Los anticuerpos que estarán contenidos en las formulaciones de la presente invención incluyen, pero sin limitarse a ellos, los anticuerpos contra la tromboplastina tisular, anticuerpos contra el receptor de IL-6, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos monoclonales contra el antígeno HM1.24, anticuerpos contra el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (anticuerpos anti-PTHrP), anticuerpos contra el glicano-3, anticuerpos contra el gangliósido GM3, anticuerpos contra el agonista del receptor de la trombopoyetina, anticuerpos a modo de sustituto funcional del factor de coagulación VIII, anticuerpos contra el receptor de IL31, anticuerpos anti-HLA, anticuerpos anti-AXL, anticuerpos anti-CXCR4, anticuerpos anti-NR10 y anticuerpos biespecíficos contra el factor IX y el factor X.

Los anticuerpos humanizados y remodelados preferidos que se utilizan en la presente invención incluyen los anticuerpos humanizados contra el receptor de la interleucina 6 (IL-6) (tocilizumab, hPM-1 y MRA) (véase la solicitud de patente internacional WO 92/19759), anticuerpos monoclonales humanizados contra el antígeno HM1.24 (véase la solicitud de patente internacional WO 98/14580), anticuerpos humanizados contra el péptido relacionado con la hormona paratiroidea (anticuerpos anti-PTHrP) (véase la solicitud de patente internacional WO 98/13388), anticuerpos humanizados contra la tromboplastina tisular (véase la solicitud de patente internacional WO 99/51743), anticuerpos humanizados IgG1k contra el glicano-3 (véase la patente internacional PCT/JP05/013103), y anticuerpos humanizados anti-NR10 (véase la solicitud de patente internacional WO 2009/072604). Los anticuerpos humanizados particularmente preferidos que se utilizan en la presente invención son los anticuerpos humanizados contra el receptor de IL-6.

Los anticuerpos de tipo IgM de humano preferidos incluyen los anticuerpos recombinantes de humano de tipo IgM contra el gangliósido GM3 (véase la solicitud de patente internacional WO 05/05636).

Los minicuerpos preferidos incluyen los diacuerpos agonistas contra el receptor de la trombopoyetina (véase la solicitud de patente internacional WO 02/33072) y los diacuerpos agonistas contra el CD47 (véase la solicitud de patente internacional WO 01/66737).

Además, los anticuerpos con un punto isoeléctrico mejorado incluyen, por ejemplo, el Acm1 (cadena pesada/SEQ ID n.º 1; cadena ligera/SEQ ID n.º 2), que es un anticuerpo contra el receptor de IL-6 descrito en la solicitud de patente internacional WO 2009/041621, los anticuerpos humanizados anti-NR10, y los anticuerpos totalmente humanizados NS22 producidos por el método descrito en el ejemplo 12 de la solicitud de patente internacional WO 2009/072604.

En una realización preferida, el tampón de una formulación de la presente invención (por ejemplo, el tampón de histidina-aspartato, el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-aspartato o el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-glutamato) se prepara mediante la valoración de una solución acuosa que contiene el aminoácido básico, tal como histidina o tris(hidroximetil)aminometano en forma de aminoácido libre, con una solución acuosa que contiene ácido aspártico y/o ácido glutámico en forma de aminoácido libre. Como alternativa, el tampón se puede preparar mediante la adición de los ingredientes en el orden inverso o mediante la valoración directa con polvos.

En una realización preferida, la arginina-aspartato en una formulación de la presente invención es una sal preparada mediante la valoración de una solución acuosa que contiene ácido aspártico (aminoácido libre) en forma de aminoácido libre con una solución acuosa que contiene arginina (base libre) en forma de aminoácido libre. Como alternativa, la sal se puede preparar por adición de los ingredientes en el orden inverso, o mediante valoración directa con polvos.

Los presentes inventores llevaron a cabo un estudio de congelación y descongelación, un estudio de aceleración térmica, un estudio de estabilidad a largo plazo y un estudio de conservación en congelación para valorar los efectos de diferentes aditivos sobre la estabilidad de las formulaciones de anticuerpos muy concentrados durante la conservación. Como resultado, los presentes inventores descubrieron que la formación de agregados se reducía significativamente mediante el uso de ácido aspártico a modo de contraión en el tampón de histidina, a saber, mediante el uso del tampón de histidina-aspartato como tampón en comparación con los tampones convencionales para las formulaciones farmacéuticas, tales como el tampón de histidina-hidrocloreuro y el tampón de histidina-acetato.

Los presentes inventores también descubrieron que se conseguía un mayor efecto de estabilización mediante la adición de arginina-aspartato que con arginina-hidrocloreuro, que se ha descrito que es estabilizante de las formulaciones que contienen anticuerpos. Los resultados de la valoración se ilustran como ejemplo en los ejemplos que vienen a continuación, mediante el uso de un anticuerpo humanizado contra el receptor de IL-6.

En concreto, se pueden preparar formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados y estables que tienen poco nivel de agregación de anticuerpos mediante la adición del tampón de histidina-aspartato, o del tampón de tris(hidroximetil)aminometano-aspartato, o del tampón de tris(hidroximetil)aminometano-glutamato. Además, se pueden preparar formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados y más estables que tienen un nivel mucho más bajo de agregación de anticuerpos mediante la adición de arginina-aspartato a modo de estabilizante. Así pues, la presente invención hace referencia a los métodos para suprimir significativamente la formación de agregados mediante el uso del tampón de histidina-aspartato, o del tampón de tris(hidroximetil)aminometano-aspartato, o del tampón de tris(hidroximetil)aminometano-glutamato, como tampón para las soluciones que

contienen anticuerpos muy concentrados, y a los métodos para suprimir significativamente la formación de agregados mediante la adición de arginina-aspartato a modo de estabilizante a las soluciones que contienen anticuerpos muy concentrados.

5 En una realización, los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, métodos para suprimir la formación de agregados durante la conservación de formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados en condiciones de congelación o en congelación y descongelación con el uso de ácido aspártico o de ácido glutámico a modo de contraión para el tampón (por ejemplo, tampón de histidina o tampón de tris(hidroximetil)aminometano) o a modo de contraión para el estabilizante (por ejemplo, arginina) en las formulaciones, tal y como está especificado en las reivindicaciones.

10 En otra realización, los métodos de la presente invención incluyen, por ejemplo, métodos para suprimir la formación de agregados durante la conservación de las formulaciones que contienen anticuerpos muy concentrados en una condición de líquido mediante el uso de ácido aspártico o de ácido glutámico a modo de contraión para el tampón (por ejemplo, tampón de histidina o tampón de tris(hidroximetil)aminometano), o a modo de contraión para el estabilizante (por ejemplo, arginina) en las formulaciones, tal y como está especificado en las reivindicaciones.

15 En la presente invención, los tampones que se pueden utilizar en vez del tampón de histidina y en los cuales se utiliza el ácido aspártico o el ácido glutámico a modo de contraión incluyen el tris(hidroximetil)aminometano (Tris). Tales tampones también se pueden añadir al tampón de histidina de la presente invención.

20 En la presente invención, los estabilizantes para los que se pueden utilizar el ácido aspártico o el ácido glutámico a modo de contraión, tal y como se especifica en las reivindicaciones, incluyen argininamida, lisina, meglumina, espermina, espermidina, magnesio, calcio, sodio y potasio, además de arginina.

25 Tal y como está descrito más arriba, la presente invención da a conocer formulaciones que contienen anticuerpos estables que comprenden el tampón de histidina-aspartato, o el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-aspartato, o el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-glutamato. Se consigue un efecto de estabilización mucho mayor en las formulaciones que contienen anticuerpos de la presente invención cuando contienen además arginina-aspartato o arginina-glutamato. Así pues, la presente invención hace referencia a formulaciones que contienen anticuerpos que contienen una sal que combina un aminoácido básico, tal como histidina o arginina (preferiblemente, histidina y/o arginina) o tris(hidroximetil)aminometano, con ácido aspártico o ácido glutámico en líquido.

30 La histidina utilizada en la presente invención podría ser la propia histidina o un derivado de la misma, y la L-histidina es particularmente preferida. La arginina utilizada en la presente invención podría ser la propia arginina, un derivado de la misma, o una sal de la misma, y es particularmente preferida la L-arginina o una sal de la misma. Las sales de arginina preferidas incluyen la sal de aspartato.

En las formulaciones de la presente invención, la concentración (cantidad) de tampón de histidina-aspartato es preferiblemente de 1 a 100 mM, más preferiblemente de 5 a 100 mM, incluso más preferiblemente de 5 a 50 mM, y aún más preferiblemente de 10 a 25 mM.

35 En las formulaciones de la presente invención, la concentración (cantidad) de arginina es preferiblemente de 5 a 300 mM, más preferiblemente de 25 a 200 mM, y aún más preferiblemente de 50 a 150 mM.

40 Las formulaciones de la presente invención son soluciones (formulaciones líquidas que contienen anticuerpos). Las formulaciones líquidas de la presente invención también incluyen soluciones antes de la una o varias etapas de liofilización, y las soluciones disueltas. Las formulaciones líquidas de la presente invención se producen preferiblemente sin la una o varias etapas de liofilización en la producción. En otro orden de cosas, las formulaciones liofilizadas de la presente invención se pueden obtener mediante la liofilización de las formulaciones líquidas de la presente invención con el uso de los métodos conocidos por los expertos en la técnica.

El pH de las formulaciones de la presente invención es preferiblemente de 4 a 8, más preferiblemente de 5,0 a 7,5, y aún más preferiblemente de 5,5 a 6,5.

45 La viscosidad de las formulaciones líquidas de la presente invención a temperatura ambiente (25 °C) es preferiblemente de 30 mPa · s o menos, más preferiblemente de 20 mPa · s o menos, y aún más preferiblemente de 15 mPa · s o menos.

50 No se observan cambios significativos para las formulaciones líquidas de la presente invención durante al menos 6 meses, preferiblemente 12 meses, más preferiblemente dos años, incluso más preferiblemente tres años, a la temperatura de refrigeración (de 2 °C a 8 °C), o durante al menos seis meses, preferiblemente un año, y más preferiblemente dos años, a temperatura ambiente (de 22 °C a 28 °C). En concreto, la presente invención hace referencia a formulaciones líquidas que son estables durante al menos seis meses de 22 °C y hasta 28 °C.

Las formulaciones líquidas de la presente invención se pueden congelar y conservar a una temperatura en el margen de -30 °C a -10 °C.

- 5 Las formulaciones de la presente invención podrían contener además tensioactivos. Tal y como se utiliza en la presente invención, los tensioactivos preferidos incluyen ésteres de ácidos grasos con polioxietileno sorbitano y éteres alquílicos de polioxipropilenaalquilo polioxietileno, y los tensioactivos más preferidos incluyen polisorbatos 20 y 80, y Pluronic F-68 (poloxámero 188). Los tensioactivos se pueden añadir a las formulaciones de la presente invención en general del 0,0001% al 10% (p/v), preferiblemente del 0,001% al 5%, y más preferiblemente del 0,005% al 3%.
- 10 Las formulaciones de la presente invención podrían además contener aminoácidos. Tal y como se utiliza en la presente invención, los aminoácidos preferidos incluyen los aminoácidos naturales y los derivados de aminoácidos, y los aminoácidos particularmente preferidos incluyen la L-metionina y la L-prolina.
- Las formulaciones de la presente invención podrían además contener azúcares. Los azúcares preferidos que se utilizan en la presente invención incluyen sacarosa, trehalosa, meglumina y sorbitol.
- La cantidad de aminoácido o de azúcar que se puede añadir a las formulaciones de la presente invención es por lo general de 1 a 1000 mM, preferiblemente de 5 a 500 mM, y más preferiblemente de 10 a 300 mM.
- 15 Las formulaciones de la presente invención podrían además contener sales inorgánicas. Las sales inorgánicas preferidas que se utilizan en la presente invención incluyen sales de magnesio y sales de calcio.
- Las formulaciones de la presente invención están sustancialmente constituidas por los ingredientes de A a D que vienen a continuación.
- (A) Anticuerpo contra el receptor de IL-6;
- (B) Tampón de histidina-aspartato y/o tampón de histidina-glutamato;
- 20 (C) Arginina (que incluye arginina-aspartato y arginina-glutamato), aminoácidos diferentes a la arginina, y/o azúcares según se necesite; y
- (D) Tensioactivos.
- 25 «Sustancialmente constituido» significa que la concentración de los aditivos optativos que se describen más adelante, que son ingredientes diferentes a los ingredientes que se añaden por lo general a las formulaciones, son de 5 mM o menos, preferiblemente de 2 mM o menos, y más preferiblemente 1 mM o menos. Tales aditivos optativos incluyen crioprotectores, agentes de suspensión, solubilizantes, agentes de isotonicidad, conservantes, inhibidores de la adsorción, diluyentes, excipientes, ajustadores del pH, analgésicos, reductores que contienen azufre, y antioxidantes.
- 30 Además, se prefiere que las formulaciones de la presente invención no contengan aniones diferentes al ácido aspártico y al ácido glutámico a modo de contraiones para el tampón o para el estabilizante, tal y como está especificado en las reivindicaciones. En una realización, tales formulaciones incluyen, por ejemplo, las que no contienen sustancialmente ion cloruro ni ion acetato. «No contiene sustancialmente ion cloruro ni ion acetato» significa que la concentración de ion cloruro y de ion acetato es, por ejemplo, de 5 mM o menos, preferiblemente de 2 mM o menos, y más preferiblemente de 1 mM o menos. Se pueden producir formulaciones que contienen
- 35 anticuerpos muy estables sin incrementar la presión osmótica, como resultado de la utilización de ácido aspártico y ácido glutámico, que tienen un mayor efecto estabilizante, a modo de contraiones y que no incluyen sustancialmente ion cloruro ni ion acetato con poco efecto de estabilización.
- Si se necesita, las formulaciones de la presente invención podrían además contener los adecuados crioprotectores, agentes de suspensión, solubilizantes, agentes de isotonicidad, conservantes, inhibidores de la adsorción, diluyentes,
- 40 excipientes, ajustadores del pH, analgésicos, reductores que contienen azufre, antioxidantes y similares.
- Los crioprotectores incluyen, por ejemplo, azúcares, tales como trehalosa, sacarosa y sorbitol.
- Los solubilizantes incluyen, por ejemplo, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno, polisorbato 80, nicotinamida, monolaurato de polioxietilensorbitano, macrogol y éster etílico de ácidos grasos de aceite de ricino.
- Los agentes de isotonicidad incluyen, por ejemplo, cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio.
- 45 Los conservantes incluyen, por ejemplo, parahidroxibenzoato de metilo, parahidroxibenzoato de etilo, ácido sórbico, fenol, cresol y clorocresol.
- Los inhibidores de la adsorción incluyen, por ejemplo, seroalbúmina humana, lecitina, dextrano, copolímero de óxido de etileno/óxido de propileno, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno, y polietilenglicol.
- 50 Los reductores que contienen azufre incluyen, por ejemplo, los que contienen grupos sulfhidrilo, tales como *N*-acetilcisteína, *N*-acetilhomocisteína, ácido tióctico, tioglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico

y sales del mismo, tiosulfato de sodio, glutatión y ácidos tioalcanoicos que tienen de uno a siete átomos de carbono.

Los antioxidantes incluyen, por ejemplo, ácido eritórico, dibutilhidroxitolueno, butilhidroxianisol, α -tocoferol, acetato de tocoferol, ácido L-ascórbico y sales del mismo, palmitato de ácido L-ascórbico, estearato de ácido L-ascórbico, hidrogenosulfito de sodio, sulfito de sodio, galato de triamilo, galato de propilo, y quelantes, tales como etilendiaminatetraacetato de disodio (EDTA), pirofosfato de sodio y metafosfato de sodio.

Las formulaciones de la presente invención se podrían administrar por vía oral o parenteral. En general, las formulaciones se administran por vía parenteral, en concreto por inyección, administración transdérmica, administración transmucosa, administración nasal, administración pulmonar o similares. La inyección incluye, por ejemplo, las administraciones sistémicas y locales mediante inyección subcutánea, inyección intravenosa, inyección intramuscular o similares. El volumen de la inyección está limitado en la inyección subcutánea; sin embargo, una única dosis de anticuerpo podría ser de una gran cantidad (aproximadamente de 100 a 200 mg). Así pues, las formulaciones de la presente invención son particularmente idóneas para la administración subcutánea (inyección).

En términos de dolor, se prefiere que la relación de la presión osmótica del agente tamponante sea próxima a 1,0 isotónica en las formulaciones para la administración subcutánea. Así pues, la relación de la presión osmótica de las formulaciones líquidas de la presente invención es preferiblemente de aproximadamente 1. Arginina, azúcares y similares se añaden para mejorar la estabilidad de las formulaciones durante la conservación. Sin embargo, cuando la presión osmótica es mayor que el nivel isotónico, podría causar dolor por administración subcutánea. Así pues, se prefiere añadir tales estabilizantes con vistas a la presión osmótica.

Además, la presente especificación describe el uso de aminoácido básico-aspartato o aminoácido básico-glutamato en la fabricación de una formulación estable que comprende anticuerpos; y ácido aspártico o ácido glutámico a modo de contraíón para un tampón o estabilizante en una formulación que comprende anticuerpos muy concentrados, utilizada en un método para suprimir la agregación de la formulación durante la conservación en congelación o la conservación como líquido.

Todos los documentos de la técnica anterior en la especificación se incorporan en la presente memoria mediante referencia.

Ejemplos

A continuación, la presente invención se describe específicamente con referencia a los ejemplos, pero no se debe considerar que el alcance de la presente invención esté limitado por estos.

Ejemplo 1. Valoración del efecto de estabilización que tiene el contraíón con el Acm1 y el Acm2

El Acm1 (cadena pesada/SEQ ID n.º 1; cadena ligera/SEQ ID n.º 2) y el Acm2 (cadena pesada/SEQ ID n.º 3; cadena ligera/SEQ ID n.º 4; tocilizumab), que se describen como un anticuerpo contra el receptor de IL-6 en la solicitud de patente internacional WO 2009/041621, se expresaron mediante un método conocido por los expertos en la técnica que utiliza una línea de células CHO de expresión estable y a continuación se purificaron a alta pureza mediante un método conocido por los expertos en la técnica con el uso de la proteína A. Los Acm1 y Acm2 purificados se utilizaron en el estudio de estabilidad que se describe en los ejemplos que vienen a continuación.

La estabilidad de dos tipos de formulaciones, que contienen histidina-cloruro o histidina-acetato, se valoró por congelación y descongelación, o por conservación a 40 °C con el Acm1 y el Acm2. Las formulaciones de Acm1 y de Acm2 se prepararon mediante diálisis durante una noche contra cada solución formulada (tabla 1), seguido de la concentración de las soluciones. La concentración final del Acm1 y del Acm2 se ajustó a 37 mg/ml. El estudio de congelación y descongelación se realizó mediante diez ciclos de congelación y descongelación lenta (congelación a -20 °C seguida de la descongelación a temperatura ambiente) y a continuación diez ciclos de congelación y descongelación rápida (congelación a -20 °C seguida de la descongelación en un baño de agua caliente (37 °C)). La cantidad de agregado en cada formulación después de la congelación y descongelación, o de la conservación a 40 °C se calculó mediante el método del porcentaje del área con el uso de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC, por su nombre en inglés). Un incremento de los agregados (%) sugiere la reducción de la estabilidad del Acm1 y del Acm2. Así pues, el incremento en la cantidad de agregado se utilizó como indicador para comparar la estabilidad entre las correspondientes formulaciones.

Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

Se realizó la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para analizar la cantidad de agregados y los productos de degradación de masa molecular baja en cada formulación. Cada formulación se diluyó a aproximadamente 0,4-2,0 mg/ml con la fase móvil que se describe más adelante y, entonces, se analizó con una columna G3000SW_{XL} (Tosoh Co.) a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min con una fase móvil de tampón de fosfato a 50 mM (pH 7,0) que contenía NaCl a 300 mM (longitud de onda de la detección: 220 nm). El pico de elución que apareció antes que el pico del monómero se consideró que eran los agregados, y el pico de elución que apareció después del pico del monómero, pero antes que el pico procedente del tampón, se consideró que eran los productos de degradación de masa molecular baja. Se calculó el correspondiente contenido (%) mediante el método del porcentaje del área.

Tabla 1

Lista de formulaciones

N.º	Tampón	Estabilizante	pH
1	Histidina-cloruro a 20 mM	NaCl a 150 mM	6,0
2	Histidina-acetato a 20 mM		

5 Los resultados del estudio de estabilidad de los dos tipos de formulaciones que contienen histidina-cloruro o histidina-acetato con el Acm1 y el Acm2 se muestran en las figuras 1 a 3. Los resultados demostraban que el Acm1 era ligeramente más estable en histidina-cloruro que en histidina-acetato durante la conservación como líquido y la congelación y descongelación. El resultado de la conservación como líquido demostró que el Acm2 era aproximadamente dos veces más estable en histidina-cloruro que en histidina-acetato.

Ejemplo 2. Valoración del efecto de estabilización que tiene el contraíón con el Acm1 (1)

10 Por lo general, se ha utilizado el ácido clorhídrico a modo de contraíón para la histidina y para la arginina. Según un informe anterior (PCT/US2005/037471), los resultados de la valoración del ácido acético, del ácido fosfórico y del ácido sulfúrico como contraíones para la histidina demostraron que el ácido acético tiene un mejor efecto estabilizante cuando se utiliza a modo de contraíón para la histidina. No obstante, tal y como se describe en el ejemplo 1 de más arriba, la presente invención demostró que el ácido clorhídrico era ligeramente mejor que el ácido acético a modo de contraíón para la histidina cuando se utilizaba para el Acm1 y el Acm2. El ácido clorhídrico es un contraíón habitual, mientras que el ácido clorhídrico se ha descrito que tiene una tendencia a corroer el acero inoxidable que se suele utilizar en los contenedores (*Dent. Mater.* 17: 409-414 (2001); *J. Pharm. Sci.* 86: 1250-1255 (1997)). Además, se ha descrito que el pH tiende a alterarse en ácido acético debido a su volatilidad (*Injectable Drug Development*, Autores: Pramod K. Gupta (Editor), Gayle A. Brazeau, Gayle A).

20 Así pues, en este ejemplo, los presentes inventores buscaron contraíones no volátiles que no sean corrosivos para el acero inoxidable y que tengan un mejor efecto de estabilización que el ácido acético y que el ácido clorhídrico a modo de contraíón en el tampón para el Acm1 y el Acm2. Los presentes inventores valoraron especies aniónicas diferentes de ácido clorhídrico, ácido acético, ácido fosfórico y ácido sulfúrico previamente descritos en la PCT/US2005/037471. En concreto, el ácido aspártico y el ácido glutámico, los cuales son aminoácidos, se valoraron a modo de contraíón. Tal y como se describe en el ejemplo 1, se demostró que histidina-cloruro tiene un mejor efecto de estabilización que histidina-acetato, tanto con el Acm1 como con el Acm2, por lo que el efecto de estabilización que tiene el contraíón se comparó con el del ácido clorhídrico. En concreto, según las tres formulaciones mostradas en la tabla 2, el efecto del ácido clorhídrico, del ácido aspártico y del ácido glutámico sobre la estabilidad del Acm1 se valoró a modo de contraíón para la histidina como tampón o para la arginina como estabilizante.

35 Cada formulación se preparó con el mismo método que se describe en el ejemplo 1. El Acm1 se dializó contra la solución de cada formulación (tabla 2) durante una noche. A continuación, se concentró cada solución y la concentración final del Acm1 se ajustó a 200 mg/ml. El estudio de congelación y descongelación se realizó llevando a cabo diez ciclos de congelación y descongelación lenta (congelación a -20°C seguida de la descongelación a temperatura ambiente). El método para preparar cada solución formulada se describe más adelante. La muestra de la formulación n.º 3 se preparó del siguiente modo: se disolvieron L-histidina y L-arginina en agua MilliQ a 20 mM y 50 mM, respectivamente, y las soluciones se llevaron a pH 6 con ácido clorhídrico a 1 N. Las muestras de las formulaciones n.ºs 4 y 5 se prepararon del siguiente modo: se disolvieron L-histidina, L-arginina y ácido L-aspártico o ácido L-glutámico en agua MilliQ a 20 mM, 50 mM y 60 mM, respectivamente, y, a continuación, las soluciones se llevaron a pH 6 con una solución de ácido L-aspártico o ácido L-glutámico de 30 a 40 mM. La cantidad de agregado en cada muestra después de la congelación y la descongelación, o de la conservación a -20°C , 25°C y 5°C , se calculó con el método del porcentaje del área mediante la cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Tabla 2

Lista de formulaciones

N.º	Tampón	Estabilizante	pH
3	Histidina-cloruro a 20 mM	Arginina-cloruro a 50 mM	6,0
4	Histidina-aspartato a 20 mM	Arginina-aspartato a 50 mM	
5	Histidina-glutamato a 20 mM	Arginina-glutamato a 50 mM	

45

El incremento de la cantidad (%) de agregado para cada formulación durante la congelación y descongelación, o durante la conservación a -20 °C, 25 °C y 5 °C, se muestra en las figuras 4 a 7. El incremento de la cantidad (%) de agregados durante la conservación a 5 °C y 25 °C demostró que la estabilidad mejoró en el orden de: ácido glutámico = ácido aspártico > ácido clorhídrico a modo de contraión para la histidina y para la arginina. Así pues, se demostró que la estabilidad del Acm1 mejoraba con el ácido aspártico o con el ácido glutámico a modo de contraión, en lugar del ácido clorhídrico. Se observó la misma tendencia en la congelación y descongelación, y en la conservación en congelación. El incremento de la cantidad (%) de agregados durante la conservación a -20 °C durante tres meses con la formulación de ácido glutámico, la formulación de ácido aspártico o la formulación de ácido clorhídrico fue de aproximadamente el 0,8%, el 1,2% o el 3,0%, respectivamente. Así pues, el efecto de estabilización del ácido glutámico era ligeramente más fuerte que el del ácido aspártico.

Los ejemplos 1 y 2 demostraron que, cuando se utilizaban a modo de contraión, el ácido glutámico y el ácido aspártico tienen un mejor efecto estabilizante del Acm1 que el ácido clorhídrico y que el ácido acético. No hay ningún informe que demuestre que el ácido glutámico y el ácido aspártico sean volátiles ni corrosivos para el acero inoxidable. Así pues, se ha hallado que el ácido glutámico y el ácido aspártico son prometedores a modo de contraión para el Acm1. En concreto, histidina-glutamato e histidina-aspartato son mejores como tampón que histidina-cloruro e histidina-acetato, y que arginina-glutamato y arginina-aspartato son mejores como estabilizantes que arginina-cloruro y arginina-acetato.

Ejemplo 3. Valoración del efecto de estabilización que tiene el contraión con el Acm2 (1)

Tal y como se describe en el ejemplo 1, se halló que el Acm2 era más estable en el tampón de histidina-cloruro que en el tampón de histidina-acetato (como el Acm1, figura 2). Además, tal y como se describe en el ejemplo 2, la estabilidad en las condiciones de líquido y en congelación del Acm1 mejoró significativamente cuando se utilizó ácido aspártico o ácido glutámico en vez de ácido clorhídrico a modo de contraión para la histidina y para la arginina. En particular, la estabilidad en las condiciones de congelación del Acm1 mejoró enormemente (hasta aproximadamente el triple) cuando se utilizó el ácido glutámico en vez del ácido clorhídrico a modo de contraión para la histidina y para la arginina. En este contexto, el ácido glutámico y el ácido clorhídrico se valoraron a modo de contraión para la histidina por su capacidad para estabilizar el Acm2 durante la congelación y la descongelación. Las formulaciones que contienen arginina que tienen efecto de estabilización alto también se valoraron al mismo tiempo, y se utilizaron como control para comparar el efecto de estabilización observado cuando se utilizó el ácido glutámico a modo de contraión para la histidina.

Cada formulación se preparó con el mismo método que se describe en el ejemplo 1. El Acm2 se dializó durante una noche contra cada solución formulada (tabla 3). A continuación, cada solución se concentró y la concentración final del Acm2 se ajustó a aproximadamente de 40 a 230 mg/ml. El método para preparar cada solución formulada se describe a continuación. Las muestras de las formulaciones n.º 6 y 8 se prepararon del siguiente modo: se disolvieron L-histidina y L-arginina (formulación n.º 8 sola) en agua MilliQ a 50 mM, y las soluciones se llevaron a pH 6 con ácido clorhídrico a 1 N. La muestra de la formulación n.º 7 se preparó del siguiente modo: se disolvieron L-histidina y ácido L-glutámico en agua MilliQ a 50 mM y 25 mM, respectivamente, y, a continuación, la solución se llevó a pH 6 con una solución de ácido L-glutámico de 30 a 40 mM. La concentración del Acm2 en cada formulación después de la preparación de la muestra se presenta en la tabla 4. El estudio de congelación y descongelación se realizó con diez ciclos de congelación a -20 °C seguido de la descongelación a temperatura ambiente (congelación y descongelación lenta). Después de la congelación y descongelación lenta, la cantidad de agregados en cada formulación se calculó con el método del porcentaje del área mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Tabla 3

Lista de formulaciones

N.º	Tampón	Estabilizante	pH
6	Histidina-cloruro a 50 mM	-	6,0
7	Histidina-glutamato a 50 mM		
8	Histidina-cloruro a 50 mM	Arginina-cloruro a 50 mM	

Tabla 4

Resultado de la medición: Lista de concentraciones del Acm2 en la solución de cada formulación

N.º	Tampón	Estabilizante	pH	Concentración del Acm2 (mg/ml)
6A	Histidina-cloruro a 50 mM		6,0	47
6B				70
6C				97
6D				122
6E				143
6F				164
6G				186
6H				229
7A	Histidina-glutamato a 50 mM			46
7B				72
7C				97
7D				119
7E				144
7F				165
7G	196			
8A	Histidina-cloruro a 50 mM			Arginina-cloruro a 50 mM
8B		68		
8C		94		
8D		120		
8E		144		
8F		168		
8G		192		

5 El incremento de la cantidad (%) de agregados para cada formulación en el estudio de congelación y descongelación se muestra en la figura 8. Los resultados demostraron que, con el uso del ácido glutámico en vez del ácido clorhídrico a modo de contraíón para la histidina, la estabilidad del Acm2 mejoraba a aproximadamente el doble. Además, el efecto de estabilización del ácido glutámico era comparable al de arginina-cloruro a 50 mM, que es un estabilizante convencional. Así pues, el ácido glutámico por sí solo demostró ejercer un efecto de estabilización alto a modo de contraíón.

10 En otro orden de cosas, se cree que la relación de la presión osmótica del tampón es preferiblemente cercana a 1,0, isotónica, en las formulaciones para la administración subcutánea debido al dolor de la inyección. La estabilidad durante la congelación y descongelación era comparable entre histidina-cloruro a 50 mM/arginina-cloruro a 50 mM e histidina-glutamato a 50 mM. La presión osmótica del tampón en el último era de aproximadamente 100 mOsm más bajo que en el primero. Así pues, tal y como está descrito más arriba, cuando mejora la estabilidad con el uso de ácido aspártico o ácido glutámico a modo de contraíón, la estabilidad puede mejorar sola sin incrementar la presión osmótica. Eso puede ser una gran ventaja para el desarrollo de formulaciones para la administración subcutánea.

15 En otro orden de cosas, se añaden arginina, azúcares y similares para mejorar la estabilidad de las formulaciones durante la conservación. Sin embargo, cuando la presión osmótica es mayor que el nivel isotónico, puede provocar dolor durante la inyección por administración subcutánea. Así pues, se deben añadir tales estabilizantes al tener en cuenta la presión osmótica (*Injectable Drug Development*, Autores: Pramod K. Gupta (Editor), Gayle A. Brazeau, Gayle A. «Challenges in the development of high protein concentration formulations», *J. Pharm. Sci.* 2004, 93 (6), 20 1390-1402). Cuando el ácido clorhídrico o el ácido acético se añade a modo de contraíón para la histidina o la arginina, ni el ácido clorhídrico ni el ácido acético tienen el efecto de estabilizar el Acm1. Así pues, el ácido clorhídrico y el ácido acético solo producen el efecto de incrementar la presión osmótica. Por consiguiente, desde el punto de vista de la presión osmótica, se debería disminuir al mínimo en las formulaciones la concentración de las especies de iones que no tienen el efecto de estabilización. En concreto, también desde el punto de vista de la 25 presión osmótica, se prefiere la ausencia de ácido clorhídrico y ácido acético. Histidina-glutamato e histidina-aspartato a modo de tampón son mejores que histidina-cloruro e histidina-acetato; y arginina-glutamato y arginina-aspartato son mejores a modo de estabilizante que arginina-cloruro y arginina-acetato.

Ejemplo 4. Valoración del efecto de estabilización que tiene el contraíón con el Acm1 (2)

Tal y como se describe en los ejemplos 2 y 3, con el uso del ácido glutámico a modo de contraíón para la histidina y para la arginina, la estabilidad del Acm1 mejoró significativamente a aproximadamente el doble o el triple, en particular durante la conservación en congelación. En este contexto, se realizó un estudio de la estabilidad de conservación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para valorar la estabilidad del Acm1 a una conservación de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ cuando se utilizaba ácido glutámico a modo de contraíón para la histidina y para la arginina, y un azúcar (trehalosa) como estabilizante. También se realizaron al mismo tiempo un estudio de conservación como líquido y un estudio de congelación y descongelación.

Cada formulación se preparó del siguiente modo: el Acm1 se dializó durante una noche contra cada solución formulada (tabla 5); a continuación, se concentraron las soluciones y la concentración final del Acm1 se ajustó a 200 mg/ml. El método para preparar cada solución formulada se describe a continuación. Se disolvieron L-histidina, L-arginina, ácido L-glutámico y trehalosa en agua MilliQ a 100 mM, 50 mM, 100 mM y 0 a 150 mM, respectivamente, y, a continuación, las soluciones se llevaron a pH 6 con una solución de ácido glutámico de 30 a 40 mM. El estudio de congelación y descongelación se realizó con diez ciclos de congelación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ seguido de la descongelación a temperatura ambiente (congelación y descongelación lenta). La cantidad de agregados en cada formulación después de la congelación y descongelación, o la conservación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, se calculó con el método del porcentaje del área mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Tabla 5

Lista de formulaciones

N.º	Tampón	Estabilizante	Azúcar	pH
9	Histidina-glutamato a 100 mM	Arginina-glutamato a 50 mM	-	6,0
10			Trehalosa a 50 mM	
11			Trehalosa a 100 mM	
12			Trehalosa a 150 mM	

El incremento de la cantidad (%) de agregados de cada formulación después de la conservación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, congelación y descongelación, y conservación a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ se muestra en las figuras 9 a 11. Al añadir trehalosa a 50 mM o más, se obtuvo una formulación en la que el agregado apenas se incrementa durante la conservación a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ y la congelación y descongelación, como se observa de las figuras 9 a 11. Además, el efecto de estabilización dependiente de la concentración que tiene la trehalosa se observó en la conservación como líquido a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tal y como está descrito más arriba, los presentes inventores descubrieron formulaciones sencillas que consistían solo en aminoácidos y azúcar, que contribuyen a la estabilización durante la conservación como líquido y la conservación en congelación.

Ejemplo 5. Valoración del efecto de estabilización que tiene el contraíón con el Acm2 (2)

Tal y como se describió en el ejemplo 1, se demostró que el Acm2 estaba más estabilizado con histidina-cloruro que con histidina-acetato, al igual que el Acm1 (figura 2). Además, tal y como se describe en el ejemplo 2, la estabilidad del Acm1 en las condiciones de líquido y en las condiciones de congelación mejoró significativamente cuando se utilizó el ácido aspártico o el ácido glutámico en vez del ácido clorhídrico a modo de contraíón para la histidina y para la arginina. En este contexto, la estabilidad del Acm2 durante la conservación como líquido ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) se utilizó para valorar el ácido clorhídrico y el ácido glutámico a modo de contraíón para la histidina. También se valoraron al mismo tiempo las formulaciones con arginina que tienen un efecto de estabilización alto y se utilizaron como control para comparar el efecto de estabilización observado cuando se utiliza el ácido glutámico a modo de contraíón para la histidina.

Cada formulación se preparó por el mismo método que está descrito en el ejemplo 1. El Acm2 se dializó durante una noche contra cada solución formulada (tabla 3). A continuación, las soluciones se concentraron y la concentración final del Acm2 se ajustó a aproximadamente de 40 a 230 mg/ml. El método para preparar las soluciones formuladas fue el mismo que se describe en el ejemplo 3. La concentración del Acm2 en cada formulación después de la preparación de la muestra se presenta en la tabla 4. La cantidad de agregado en cada formulación durante de dos a cuatro semanas de conservación a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ se calculó con el método del porcentaje del área mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

El incremento de la cantidad (%) de agregados para cada formulación después de la conservación a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ se muestra en la figura 12. Los resultados demostraron que, a diferencia de lo que ocurre en el estudio de congelación y descongelación, la estabilidad del Acm2 no se alteró ni siquiera cuando se utilizó ácido glutámico en vez de ácido clorhídrico a modo de contraíón para la histidina. El pI del Acm1 y del Acm2 es de 5,8 y 9,3, respectivamente. Esto sugiere que era significativo el efecto de estabilización que tiene el contraíón con un pI bajo sobre la conservación

como líquido.

Ejemplo 6. Valoración del efecto de estabilización que tiene el contraión con Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5

El Acm3 es un anticuerpo biespecífico contra el factor IX y contra el factor X, y tiene una región constante procedente de IgG4. Además, su valor de pI ha disminuido a 6,8 por alteración de la secuencia de aminoácidos.

5 El Acm4 es un anticuerpo humanizado anti-NR10 (anticuerpo NS22 completamente humanizado y preparado según el método descrito en el ejemplo 12 de la solicitud de patente internacional WO 2009/072604) y su clase de anticuerpo es la IgG2. Su valor de pI ha disminuido a 5,6 por alteración de la secuencia de aminoácidos.

10 El Acm5 es un anticuerpo humanizado contra el glicoproteína 3 (se humanizó mediante el método descrito en el ejemplo 24 de la solicitud de patente internacional WO 2006/006693 y su cadena ligera se alteró mediante el método del ejemplo 25). Su clase de anticuerpo es la IgG1.

15 Tal y como se describe en los ejemplos 2 y 3, se demostró que la estabilidad del Acm1 y del Acm2 en las condiciones de líquido y en congelación mejoraba significativamente cuando se utilizaba ácido aspártico o ácido glutámico, en vez de ácido clorhídrico, a modo de contraión para la histidina y para la arginina. A continuación, Acm1 y Acm2, así como Acm3, Acm4 y Acm5, que son anticuerpos modificados para su punto isoeléctrico sea de 5 a 8, se utilizaron para valorar la estabilidad en solución y la estabilidad tras congelación y descongelación cuando se utiliza ácido clorhídrico y ácido aspártico a modo de contraión para la histidina y para la arginina. Los pI de Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5 se muestran en la tabla 6 que viene a continuación.

Tabla 6

Muestra	Acm1	Acm2	Acm3	Acm4	Acm5
pI	5,8	9,4	6,8	5,6	9,0

20 Las muestras se prepararon del siguiente modo: Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5 se dializaron contra cada tampón de diálisis (tabla 7) durante una noche. A continuación, se concentró cada solución de anticuerpo y se les añadió un tampón concentrado para cada formulación (tabla 8) de tal modo que la concentración final del anticuerpo se ajustó de aproximadamente 100 a 190 mg/ml. Una lista de las soluciones formuladas que se prepararon como está descrito más arriba se muestra en la tabla 9. Para cada formulación, se llevó a cabo un estudio de conservación como líquido a 25 °C y un estudio de congelación y descongelación. El estudio de congelación y descongelación se llevó a cabo en diez ciclos de congelación a -20 °C seguidos de la descongelación a 25 °C (congelación y descongelación lenta). Después de la congelación y descongelación lenta, se calculó la cantidad de agregados en cada muestra con el método del porcentaje del área mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

30 Tabla 7

N.º	Muestra	Tampón de diálisis	pH
13	Acm3	Agua	6,0
14	Acm3		
15	Acm4	Histidina-cloruro a 50 mM	
16	Acm4	Histidina-aspartato a 50 mM	
17	Acm2	Histidina-cloruro a 20 mM	
18	Acm2		
19	Acm1		
20	Acm1		
21	Acm3	Agua	
22	Acm3		
23	Acm5	Histidina-cloruro a 20 mM	
24	Acm5		

Tabla 8

N.º	Muestra	Tampón concentrado	pH
13	Acm3	Histidina-cloruro a 500 mM	6,0
14	Acm3	Histidina-aspartato a 500 mM	
15	Acm4	Histidina-cloruro a 50 mM	
16	Acm4	Histidina-aspartato a 50 mM	
17	Acm2	Histidina-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 500 mM	
18	Acm2	Histidina-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 500 mM	
19	Acm1	Histidina-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 500 mM	
20	Acm1	Histidina-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 500 mM	
21	Acm3	Histidina-cloruro a 200 mM, arginina-cloruro a 500 mM	
22	Acm3	Histidina-cloruro a 200 mM, arginina-aspartato a 500 mM	
23	Acm5	Histidina-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 500 mM	
24	Acm5	Histidina-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 500 mM	

Tabla 9

N.º	Muestra	Formulación	pH	Concentración del Acm (mg/ml)
13	Acm3	Histidina-cloruro a 50 mM	6,0	100
14	Acm3	Histidina-aspartato a 50 mM		
15	Acm4	Histidina-cloruro a 50 mM		
16	Acm4	Histidina-aspartato a 50 mM		
17	Acm2	Histidina-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 50 mM		190
18	Acm2	Histidina-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 50 mM		
19	Acm1	Histidina-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 50 mM		110
20	Acm1	Histidina-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 50 mM		
21	Acm3	Histidina-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 50 mM		
22	Acm3	Histidina-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 50 mM		
23	Acm5	Histidina-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 50 mM		120
24	Acm5	Histidina-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 50 mM		

- 5 El resultado sobre el incremento de la cantidad (%) de agregados en cada formulación después de la congelación y descongelación o de la conservación como líquido a 25 °C se muestra en las figuras 13 a 20. La comparación del incremento de la cantidad de agregados durante la conservación como líquido a 25 °C demostró que la estabilidad era comparable entre la formulación de histidina-aspartato y la formulación de histidina-cloruro, y entre la formulación de arginina-aspartato y la formulación de arginina-cloruro (figuras 13, 15, 17 y 19).
- 10 En otro orden de cosas, la comparación del incremento de la cantidad de agregados después de la congelación y descongelación reveló que la estabilidad con la formulación de histidina-aspartato era dos o más veces mayor que con la formulación de histidina-cloruro, y la estabilidad con la formulación de arginina-aspartato era mayor que con la formulación de arginina-cloruro (figuras 14, 16, 18 y 20). Así pues, la estabilidad del anticuerpo en la condición en congelación se demostró que estaba mejorada significativamente con el uso de ácido aspártico en vez de ácido clorhídrico a modo de contraíón para la histidina o para la arginina.
- 15

Ejemplo 7. Valoración del efecto de estabilización que tiene contraíón con Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5

Tal y como se describe en los ejemplos 2, 3 y 6, está demostrado que la estabilidad del anticuerpo en las condiciones de líquido y en congelación se mejoraba significativamente cuando se utilizaba ácido aspártico o ácido glutámico en vez de ácido clorhídrico a modo de contraíón en la formulación de histidina. A continuación, se

utilizaron ácido clorhídrico y ácido aspártico a modo de contraión en la formulación de tris(hidroximetil)aminometano (Tris) y se valoró la estabilidad de la conservación como líquido y la estabilidad tras congelación y descongelación con Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5.

- 5 Las muestras se prepararon del siguiente modo: Acm1, Acm2, Acm3, Acm4 y Acm5 se dializaron contra cada tampón de diálisis (tabla 10) durante una noche. A continuación, se concentró cada solución de anticuerpo y se les añadió un tampón concentrado para cada formulación (tabla 11) de tal modo que la concentración final del anticuerpo quedaba ajustada de aproximadamente 100 a 110 mg/ml. En la tabla 12 se muestra una lista de las soluciones formuladas preparadas tal y como está descrito más arriba. Para cada solución formulada, se llevó a cabo un estudio de conservación a 25 °C y un estudio de congelación y descongelación. El estudio de congelación y descongelación se llevó a cabo en diez ciclos de congelación a -20 °C seguidos de la descongelación a 25 °C (congelación y descongelación lenta). Después de la congelación y descongelación lenta, se calculó la cantidad de agregados en cada muestra con el método de porcentaje del área mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaños (SEC).

Tabla 10

N.º	Muestra	Tampón de diálisis	pH
25	Acm1	Tris-cloruro a 20 mM	6,5
26	Acm1	Tris-aspartato a 20 mM	
27	Acm2	Tris-cloruro a 20 mM	
28	Acm2	Tris-aspartato a 20 mM	
29	Acm3	Agua	
30	Acm3	Agua	
31	Acm4	Tris-cloruro a 20 mM	
32	Acm4	Tris-aspartato a 20 mM	
33	Acm5	Tris-cloruro a 20 mM	
34	Acm5	Tris-aspartato a 20 mM	

15

Tabla 11

N.º	Muestra	Tampón concentrado	pH
25	Acm1	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 500 mM	6,5
26	Acm1	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 500 mM	
27	Acm2	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 500 mM	
28	Acm2	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 500 mM	
29	Acm3	Tris-cloruro a 200 mM, arginina-cloruro a 500 mM	
30	Acm3	Tris-cloruro a 200 mM, arginina-aspartato a 500 mM	
31	Acm4	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 500 mM	
32	Acm4	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 500 mM	
33	Acm5	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 500 mM	
34	Acm5	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 500 mM	

Tabla 12

N.º	Muestra	Formulación	pH	Concentración del Acm (mg/ml)
25	Acm1	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 50 mM	6,5	100
26	Acm1	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 50 mM		
27	Acm2	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 50 mM		
28	Acm2	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 50 mM		
29	Acm3	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 50 mM		
30	Acm3	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 50 mM		110
31	Acm4	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 50 mM		
32	Acm4	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 50 mM		
33	Acm5	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-cloruro a 50 mM		
34	Acm5	Tris-cloruro a 20 mM, arginina-aspartato a 50 mM		

5 El resultado sobre el incremento de la cantidad (%) de agregados en cada formulación después de la congelación y descongelación o de la conservación como líquido a 25 °C se muestra en las figuras 21 y 22. La comparación del incremento de la cantidad de agregados durante la conservación como líquido a 25 °C demostró que la estabilidad era comparable entre la formulación de Tris-aspartato/arginina-aspartato y Tris-cloruro/arginina-cloruro (figura 21).

10 En otro orden de cosas, la comparación del incremento de la cantidad de agregados después de la congelación y descongelación reveló que la estabilidad con la formulación de Tris-aspartato/arginina-aspartato era mayor que con la formulación de Tris-cloruro/arginina-cloruro (figura 22). Así pues, la estabilidad del anticuerpo en la condición en congelación también se demostró que estaba significativamente mejorada con el uso de ácido aspártico en vez de ácido clorhídrico a modo de contraíón en la formulación de Tris.

Ejemplo 8. Valoración del efecto de estabilización que tiene el contraíón para Tris con Acm1, Acm2 y Acm3

15 Tal y como se describe en el ejemplo 7, la estabilidad del anticuerpo en la condición en congelación se demostró que estaba significativamente mejorada cuando se utilizaba ácido aspártico en vez de ácido clorhídrico a modo de contraíón en la formulación de Tris. A continuación, el ácido clorhídrico y el ácido aspártico se utilizaron a modo de contraíones para Tris y se valoró la estabilidad de conservación como líquido y la estabilidad tras congelación y descongelación con Acm1, Acm2 y Acm3.

20 Las muestras se prepararon del siguiente modo: Acm1, Acm2 y Acm3 se dializaron contra cada tampón de diálisis (tabla 13) durante una noche. A continuación, cada solución de anticuerpo se concentró a 100 mg/ml o a una concentración más elevada y se le añadió cada dializado de tal modo que la concentración final de anticuerpo quedaba ajustada a aproximadamente 100 mg/ml. En la tabla 14 se muestra una lista de las soluciones formuladas que se prepararon tal y como está descrito más arriba. Se llevó a cabo un estudio de conservación a 25 °C y un estudio de congelación y descongelación con cada solución formulada. El estudio de congelación y descongelación se llevó a cabo en diez ciclos de congelación a -20 °C seguidos de la descongelación a 25 °C (congelación y descongelación lenta). Después de la congelación y descongelación lenta, se calculó la cantidad de agregados en cada muestra con el método del porcentaje del área mediante el uso de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Tabla 13

N.º	Muestra	Tampón de diálisis	pH
35	Acm1	Tris-cloruro a 50 mM	6,5
36	Acm1	Tris-aspartato a 50 mM	
37	Acm2	Tris-cloruro a 50 mM	
38	Acm2	Tris-aspartato a 50 mM	
39	Acm3	Tris-cloruro a 50 mM	
40	Acm3	Tris-aspartato a 50 mM	

Tabla 14

N.º	Muestra	Formulación	pH	Concentración del Acm (mg/ml)
35	Acm1	Tris-cloruro a 50 mM	6,5	100
36	Acm1	Tris-aspartato a 50 mM		
37	Acm2	Tris-cloruro a 50 mM		
38	Acm2	Tris-aspartato a 50 mM		
39	Acm3	Tris-cloruro a 50 mM		
40	Acm3	Tris-aspartato a 50 mM		

- 5 El resultado sobre el incremento de la cantidad (%) de agregados después de la congelación y descongelación o de la conservación como líquido a 25 °C en cada formulación se muestra en las figuras 23 y 24. La comparación del incremento de la cantidad de agregados sobre la base de este resultado demostró que tanto durante la conservación como líquido a 25 °C como durante la congelación y descongelación, la estabilidad con la formulación de Tris-aspartato era mayor que con la formulación de Tris-cloruro, y que la estabilidad durante la congelación y descongelación era, en particular, dos o más veces mayor. Así pues, también se demostró que la estabilidad del anticuerpo se mejoraba significativamente con ácido aspártico en vez de ácido clorhídrico a modo de contraión para
- 10 Tris cuando se utiliza como tamponante.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA

<120> Formulaciones líquidas que contienen anticuerpos estabilizados

5 <130> S68264PCEP

<140> EP 11734694.0

<141> 20-01- 2011

10 <150> JP 2010-010060

<151> 20-01-2010

<160> 4

15 <170> PatentIn versión 3.4

<210> 1

<211> 443

20 <212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de un péptido sintetizado artificialmente

25 <400> 1

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Glu
1				5					10					15	
Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	His	Ser	Ile	Ser	His	Asp
			20					25						30	
His	Ala	Trp	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Glu	Gly	Leu	Glu	Trp
		35					40					45			
Ile	Gly	Phe	Ile	Ser	Tyr	Ser	Gly	Ile	Thr	Asn	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
	50					55					60				
Gln	Gly	Arg	Val	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	Arg	Ser	Leu	Ala	Arg	Thr	Thr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Glu	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

ES 2 671 224 T3

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de un péptido sintetizado artificialmente

5

<400> 2

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Ser Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Thr Asp Ile Ser Ser His
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Gly Ser His Leu Leu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ala
65 70 75 80

Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gly Gln Gly Asn Arg Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Glu Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

10

<210> 3

<211> 449

<212> PRT

<213> Artificial

15

<220>

<223> Secuencia de un péptido sintetizado artificialmente

ES 2 671 224 T3

<400> 3

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

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

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

Ile Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Ile Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Leu
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Met Leu Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
 65 70 75 80

Leu Arg Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Leu Ala Arg Thr Thr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Ser 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

ES 2 671 224 T3

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 Lys 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 Asp Glu Leu 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

- 5 <210> 4
- <211> 214
- <212> PRT
- <213> Artificial

ES 2 671 224 T3

<220>

<223> Secuencia de un péptido sintetizado artificialmente

<400> 4

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

5 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

10

REIVINDICACIONES

1. Una formulación que comprende anticuerpos estables que comprende aminoácido básico-aspartato, en donde dicho aminoácido básico se selecciona del grupo que consiste en histidina y arginina, y en donde dicha formulación es una formulación líquida.
- 5 2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el tampón de histidina-aspartato.
3. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende arginina-aspartato.
4. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende el tampón de histidina-aspartato y arginina-aspartato.
- 10 5. Una formulación que comprende anticuerpos estables, que comprende el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-aspartato y/o el tampón de tris(hidroximetil)aminometano-glutamato.
6. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5,
- i) en donde la formulación no comprende sustancialmente ni ion cloruro ni ion acetato;
- y/o
- ii) en donde la formulación comprende además un azúcar;
- 15 y/o
- iii) en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o un anticuerpo de humano;
- y/o
- iv) en donde la concentración del anticuerpo es de 50 mg/ml o más;
- y/o
- 20 v) en donde la concentración del anticuerpo es de 50 a 250 mg/ml.
7. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde el anticuerpo ha sido modificado para tener un punto isoeléctrico (pI) de 5 a 8.
8. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7,
- i) en donde la viscosidad de la formulación líquida es de 30 mPa · s o menos;
- 25 y/o
- ii) en donde la formulación líquida es estable de 2 °C a 8 °C durante al menos seis meses;
- y/o
- iii) en donde la formulación no se ha sometido a la liofilización durante la preparación de la formulación;
- y/o
- 30 iv) en donde la formulación se conserva en congelación de -30 °C a -10 °C.
9. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 4 y 6 a 8, en donde la concentración del tampón es de 5 a 100 mM.
10. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 3 y 6 a 9, en donde la concentración de arginina es de 5 a 300 nM.
- 35 11. La formulación de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo es un anticuerpo contra el receptor de la IL-6.
12. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2, 4, y 6 a 11, en donde el tampón comprende sustancialmente solo uno o varios aminoácidos.
- 40 13. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, que es para la administración subcutánea.

14. Un método para suprimir la formación de agregados durante la conservación en congelación de una formulación que comprende anticuerpos muy concentrados mediante el uso de ácido aspártico a modo de contraión

1) para un tampón en la formulación, en donde dicho tampón es histidina-aspartato o tris(hidroximetil)aminometano-aspartato,

5 o

2) para un estabilizante en la formulación, en donde dicho estabilizante es arginina;

en donde dicha formulación es una formulación líquida.

15. Un método para suprimir la formación de agregados durante la conservación como líquido de una formulación que comprende anticuerpos muy concentrados mediante el uso de ácido aspártico a modo de contraión

10 1) para un tampón en la formulación, en donde dicho tampón es histidina-aspartato o tris(hidroximetil)aminometano-aspartato,

o

2) para un estabilizante en la formulación, en donde dicho estabilizante es arginina;

en donde dicha formulación es una formulación líquida.

15

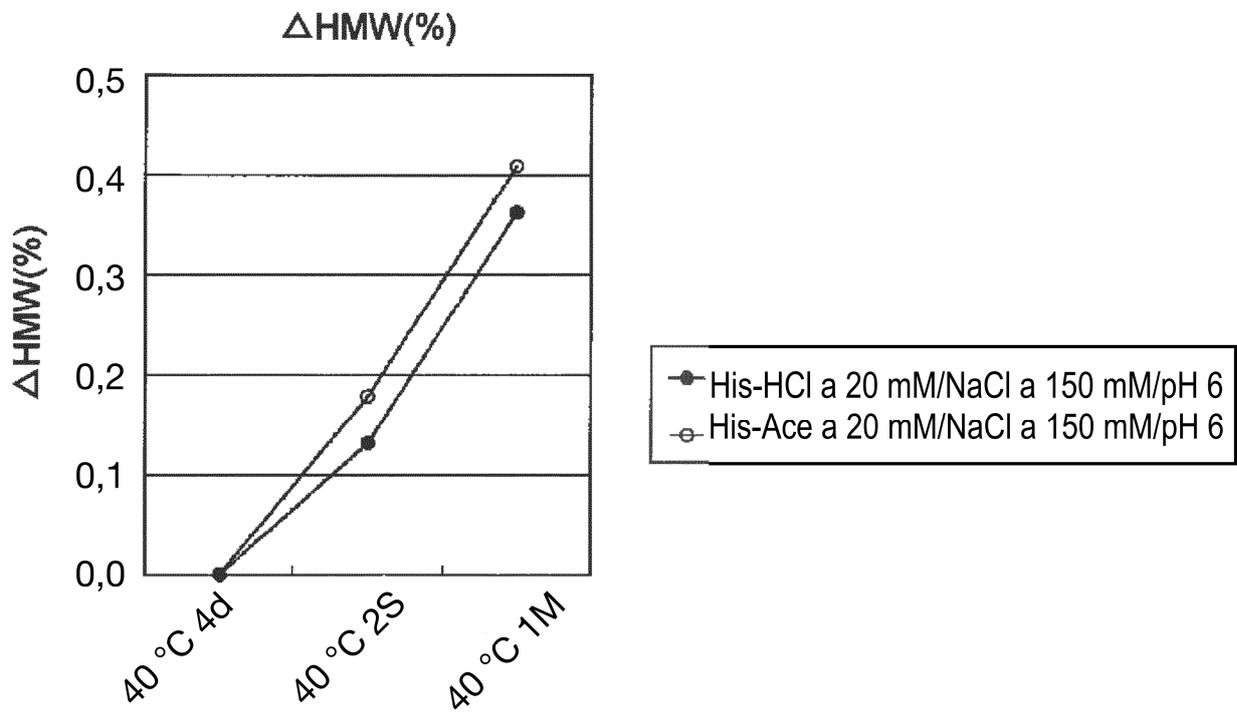


FIG. 1

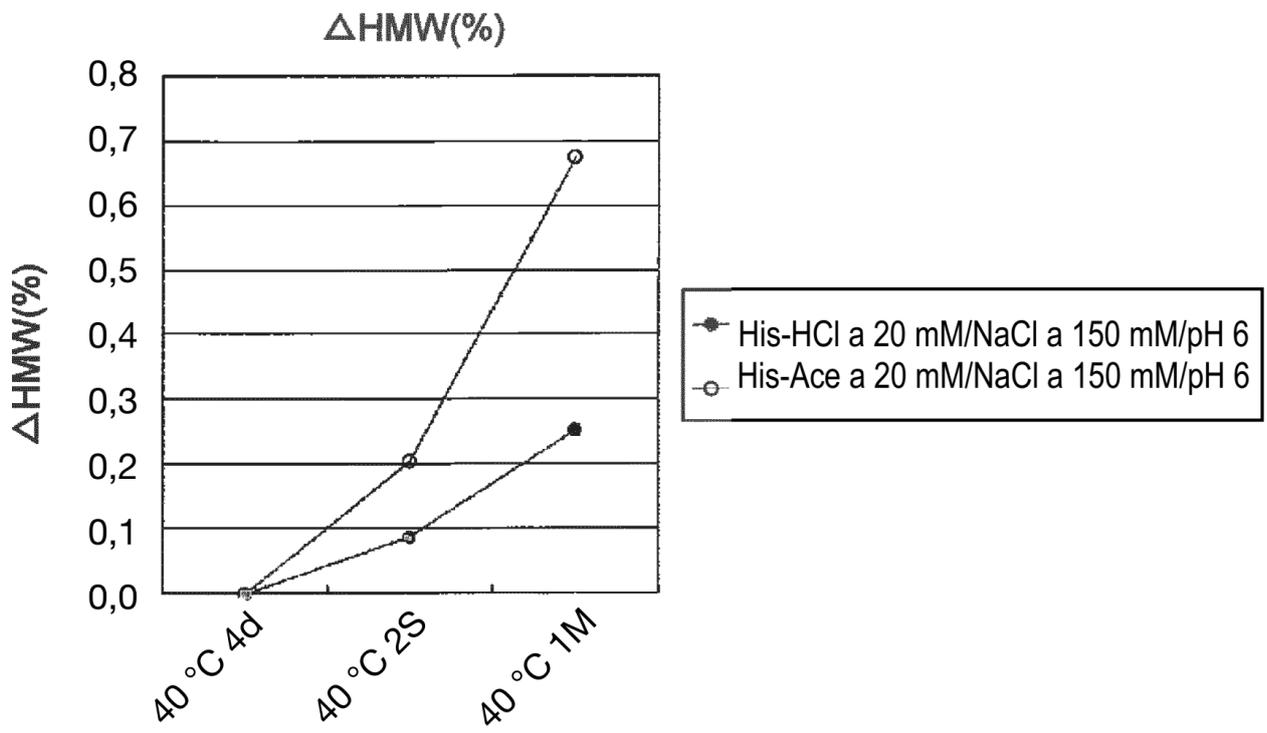


FIG. 2

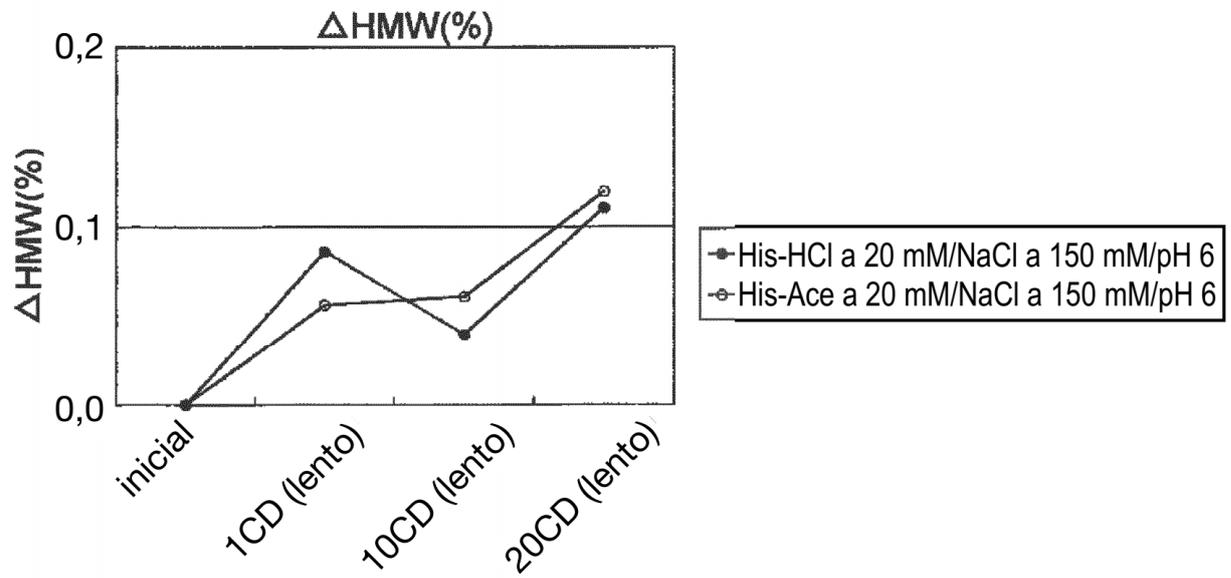


FIG. 3

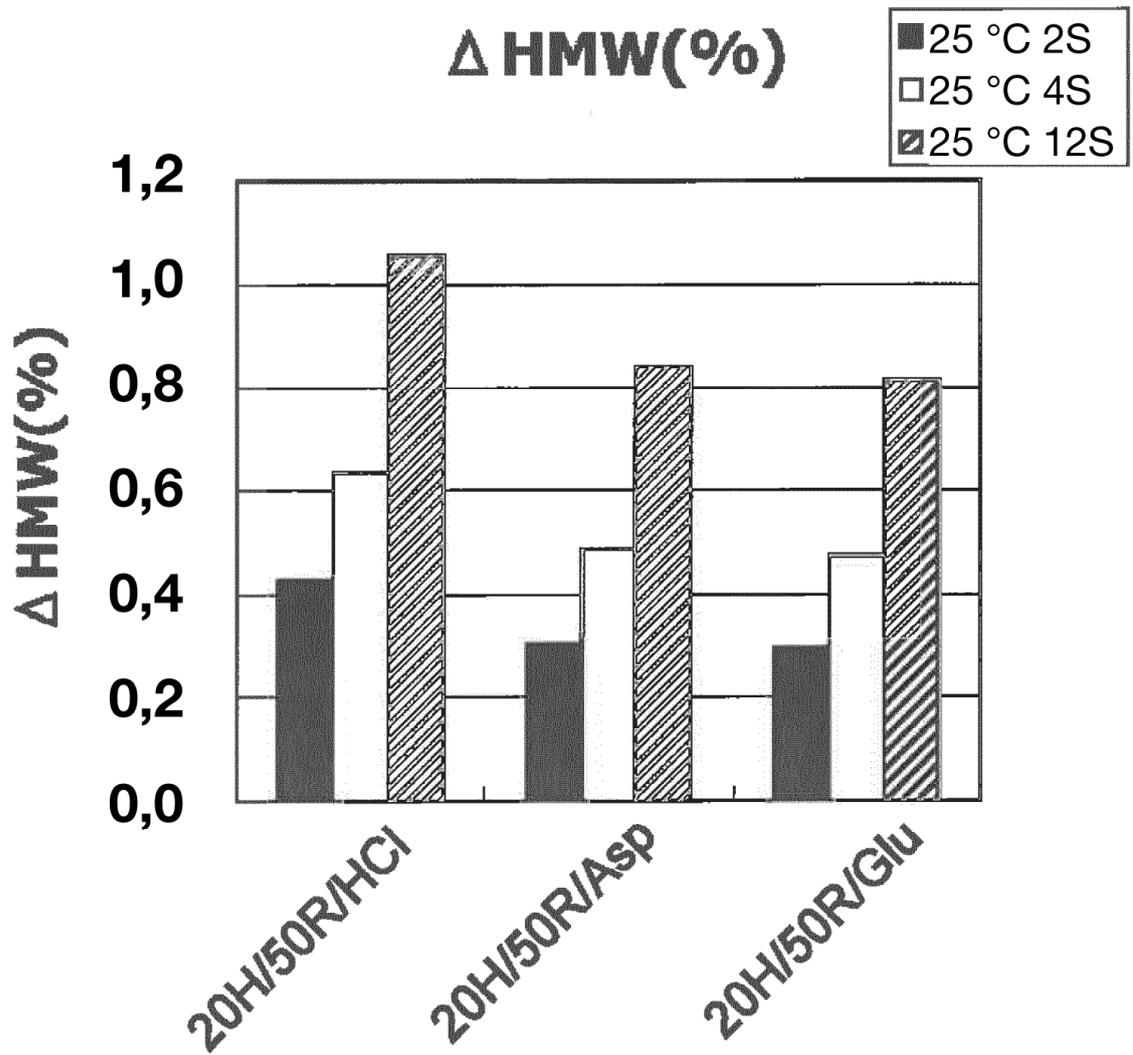


FIG. 4

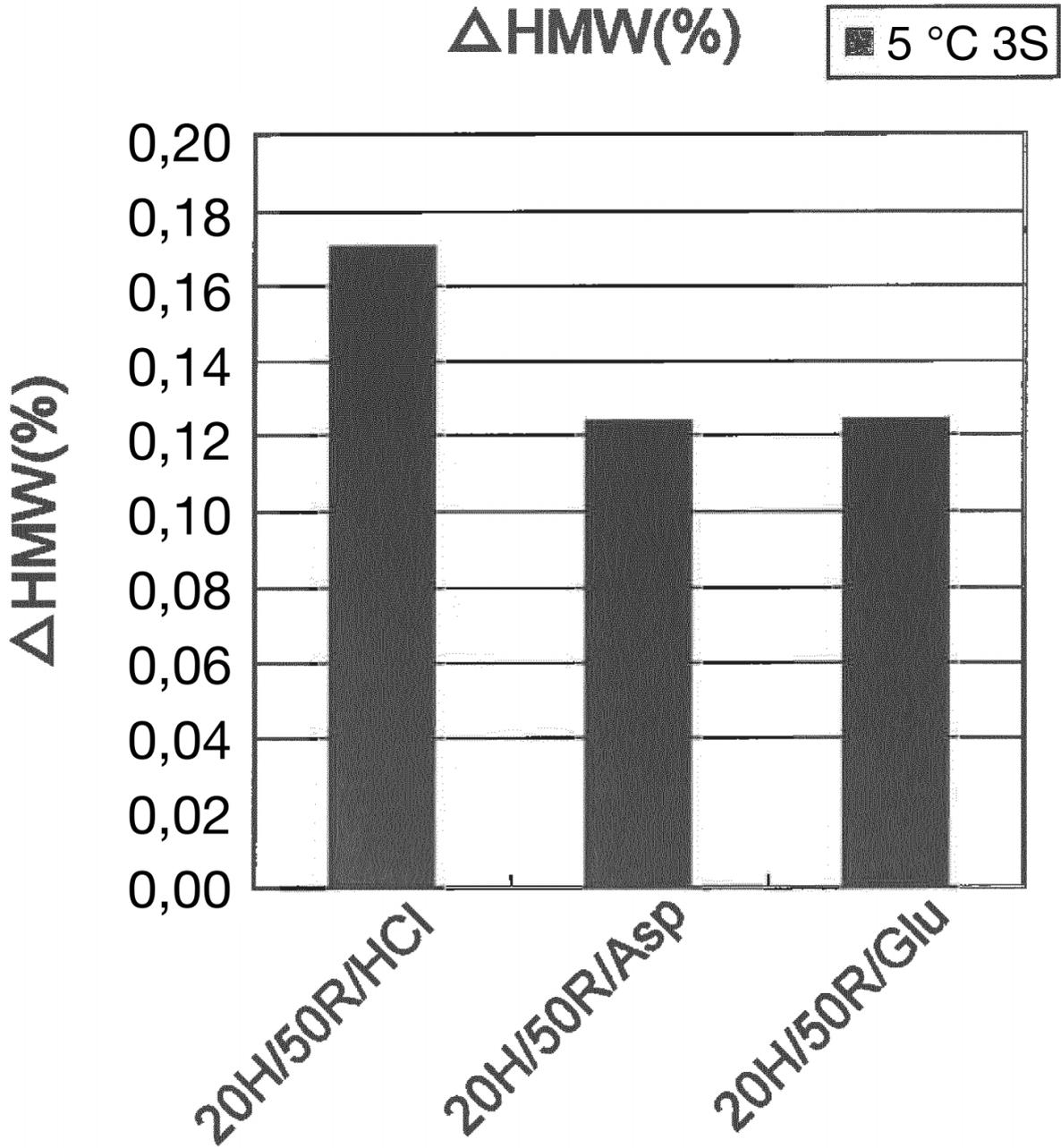


FIG. 5

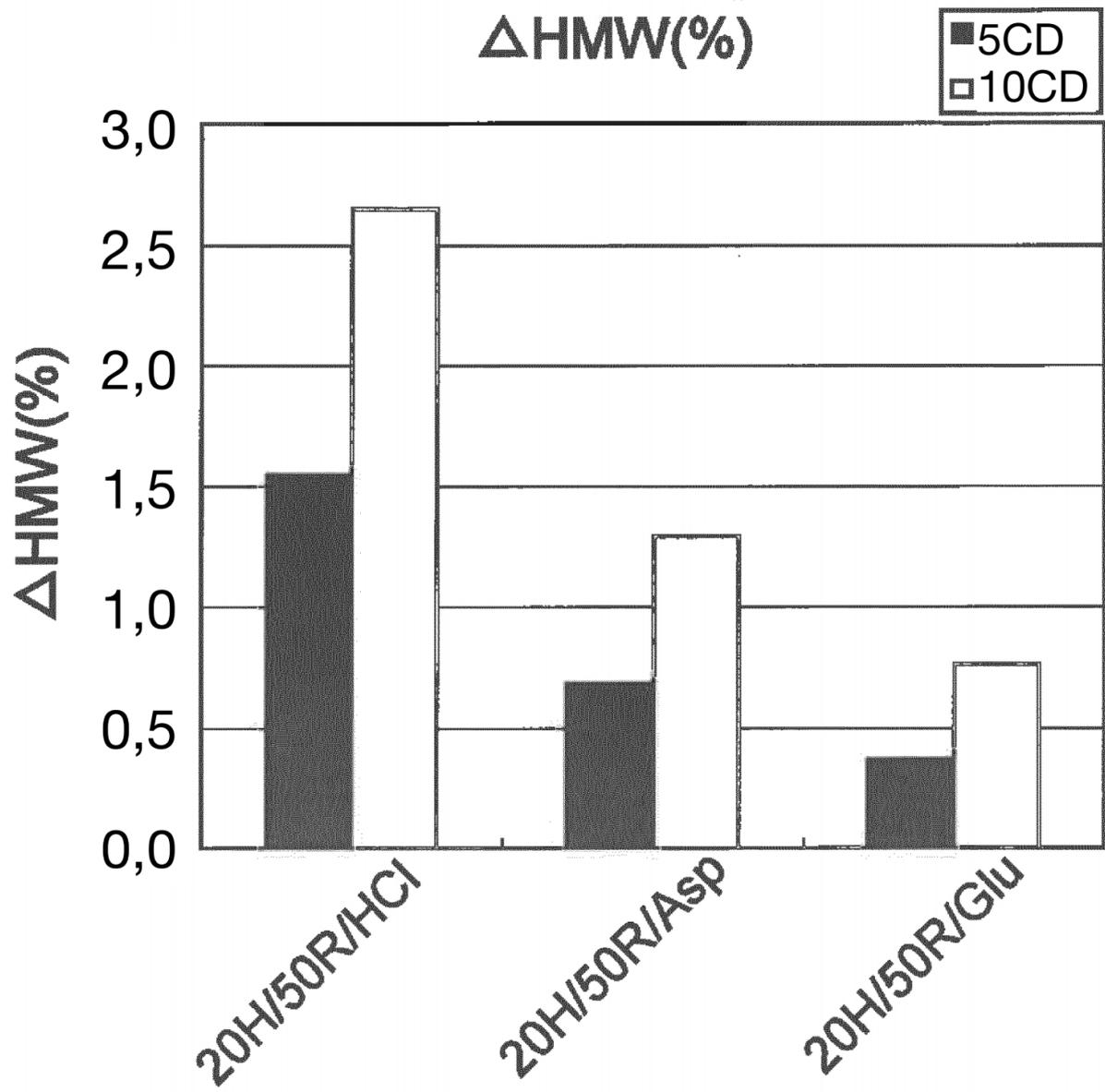


FIG. 6

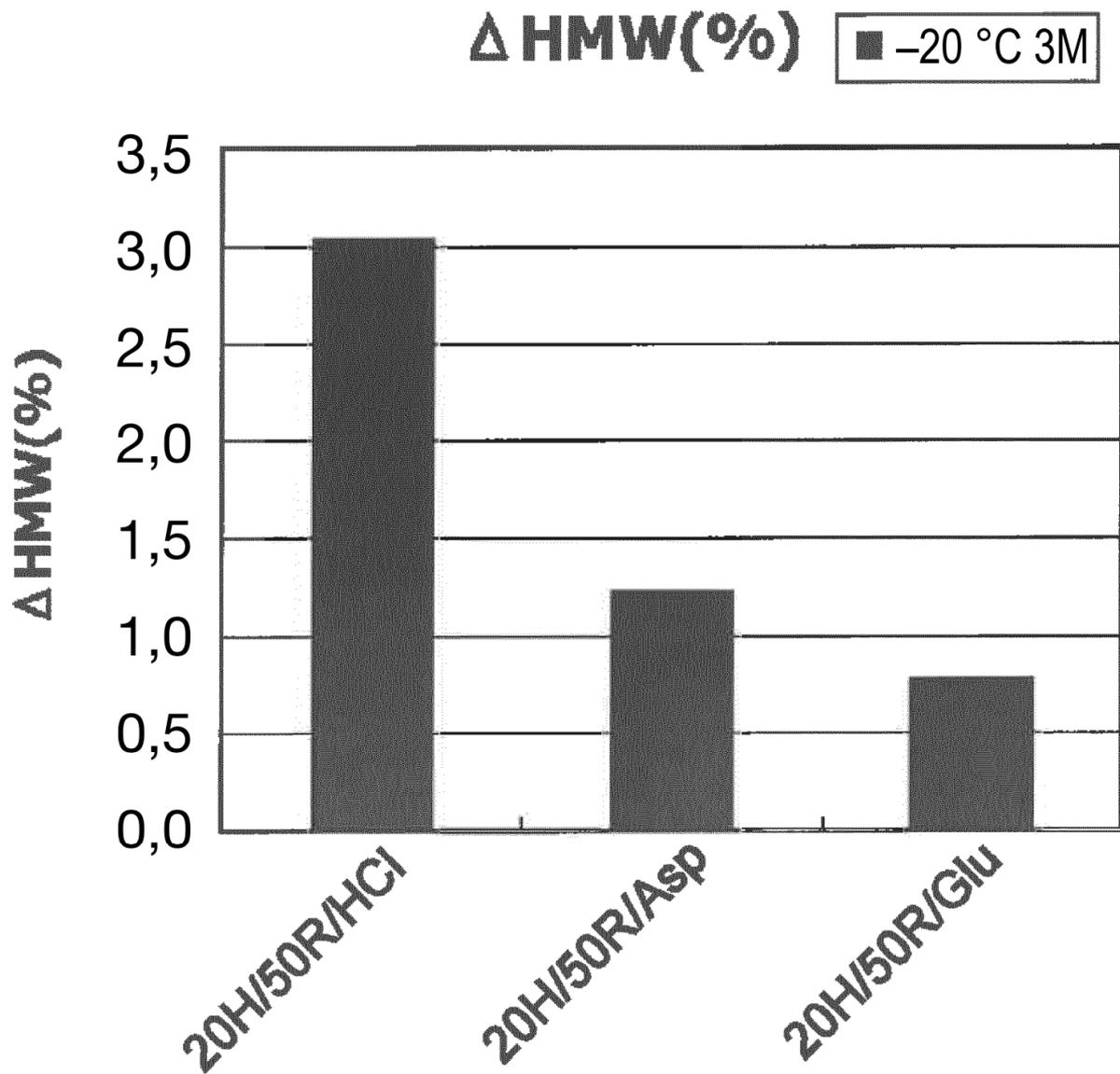


FIG. 7

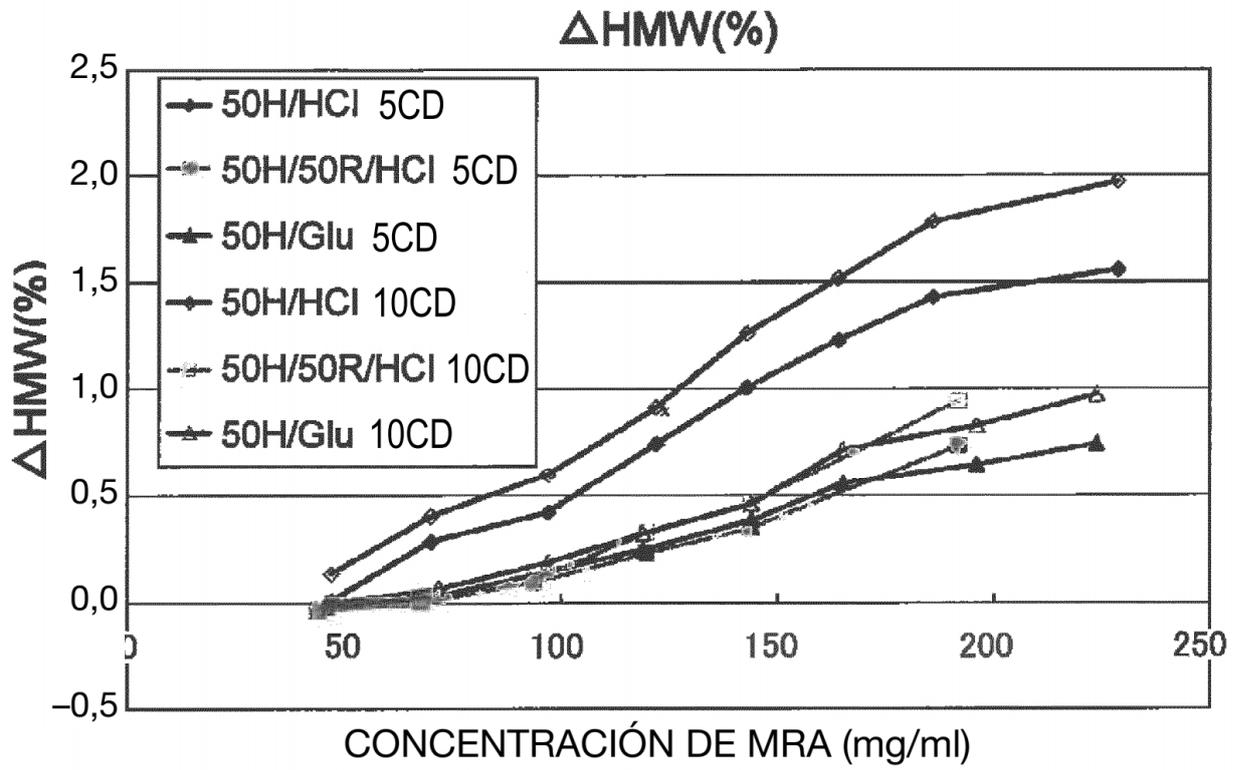


FIG. 8

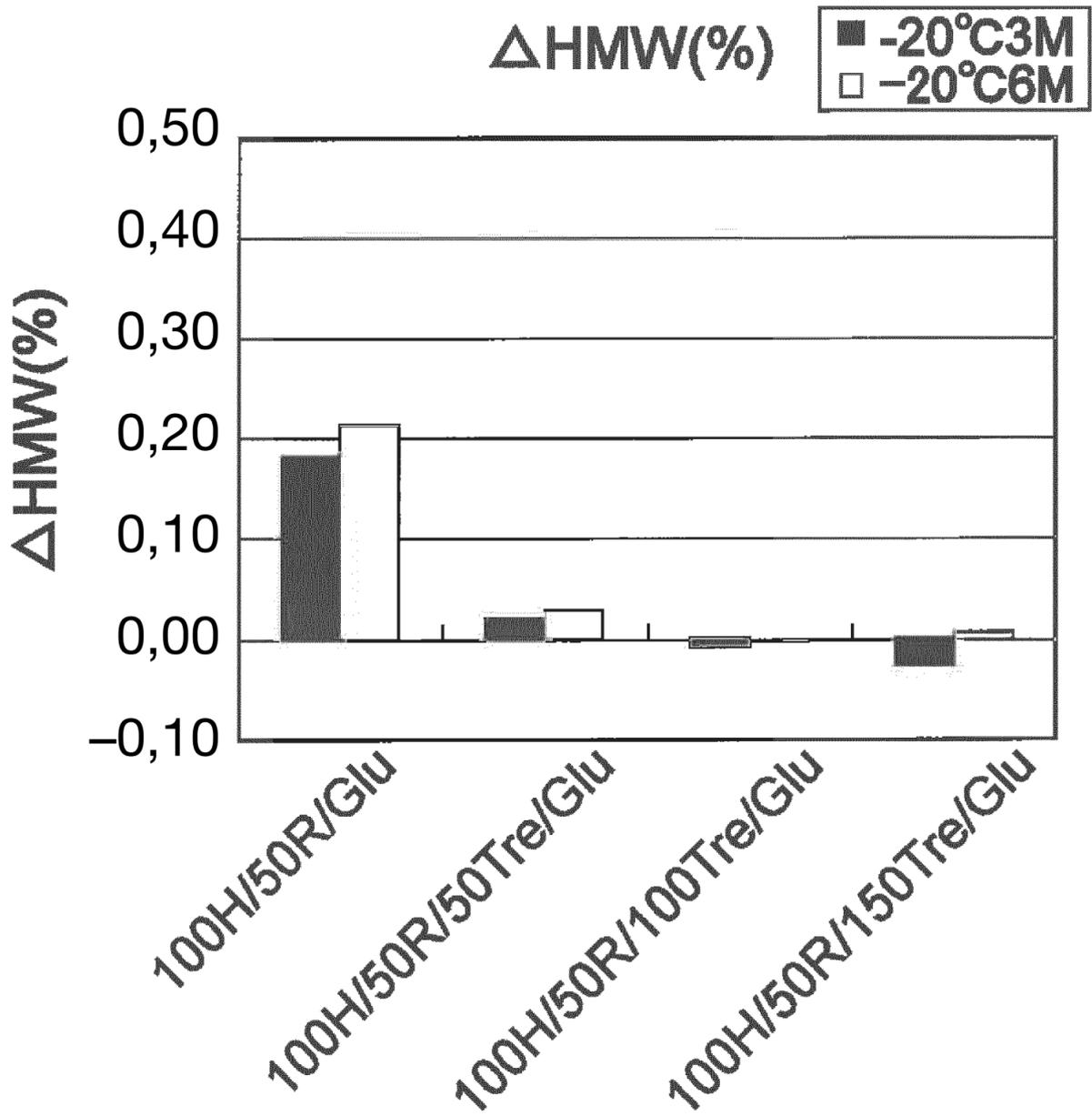


FIG. 9

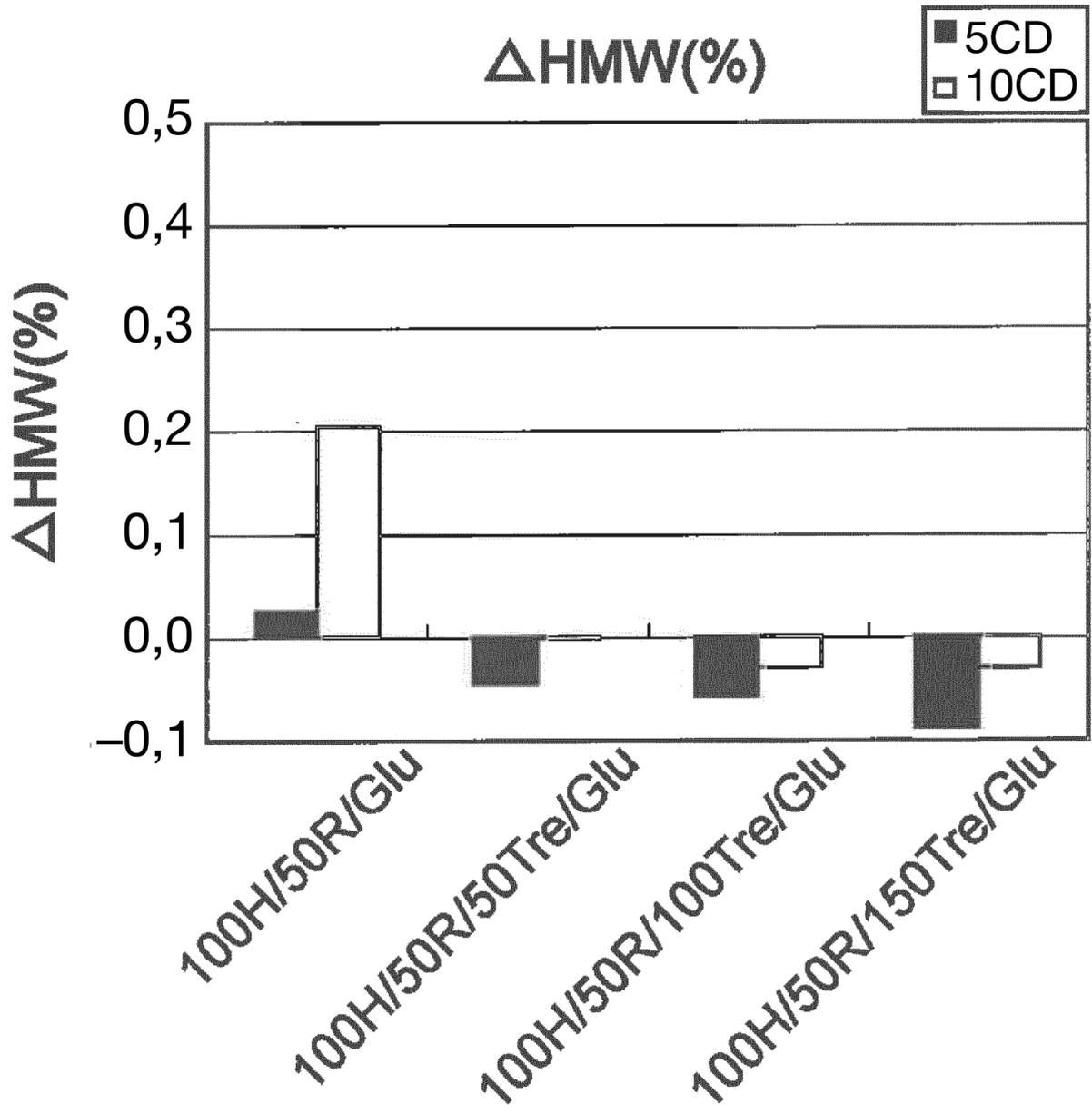


FIG. 10

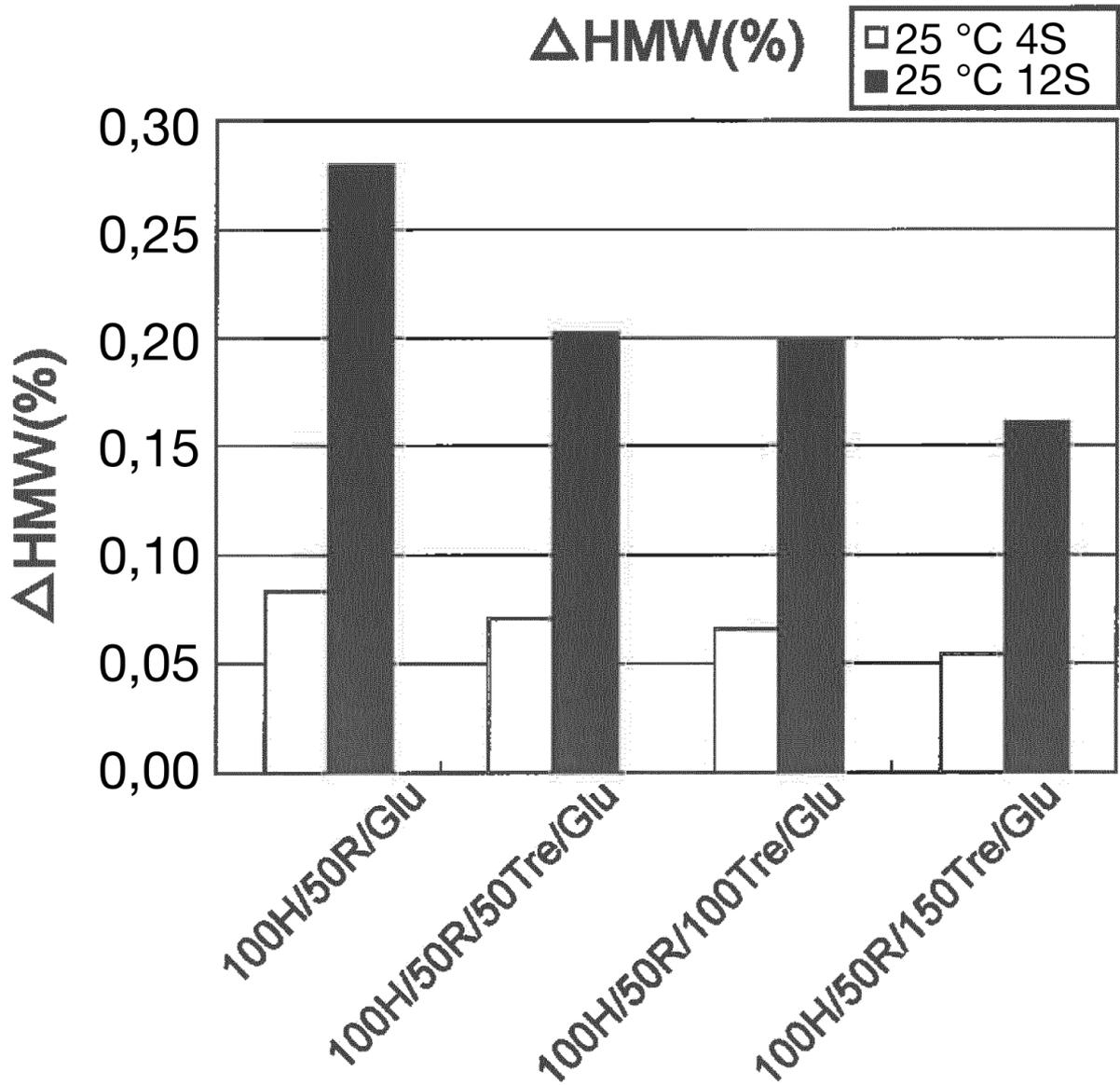


FIG. 11

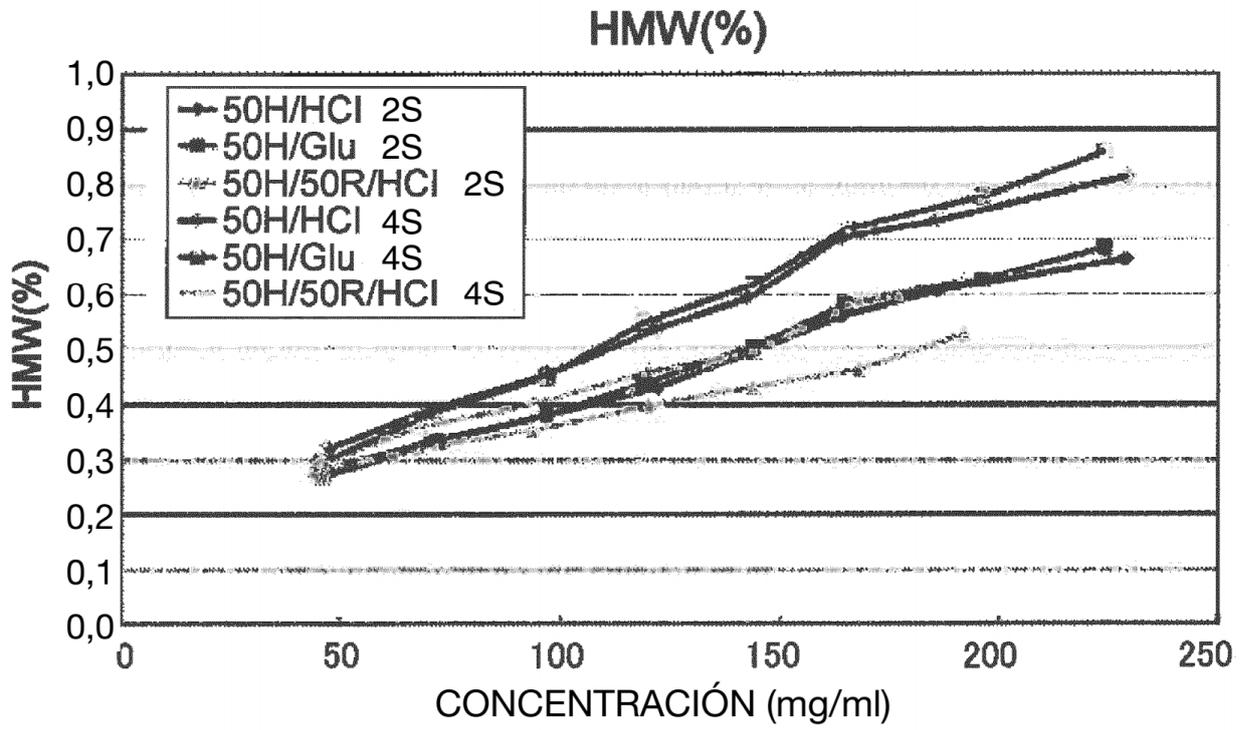


FIG. 12

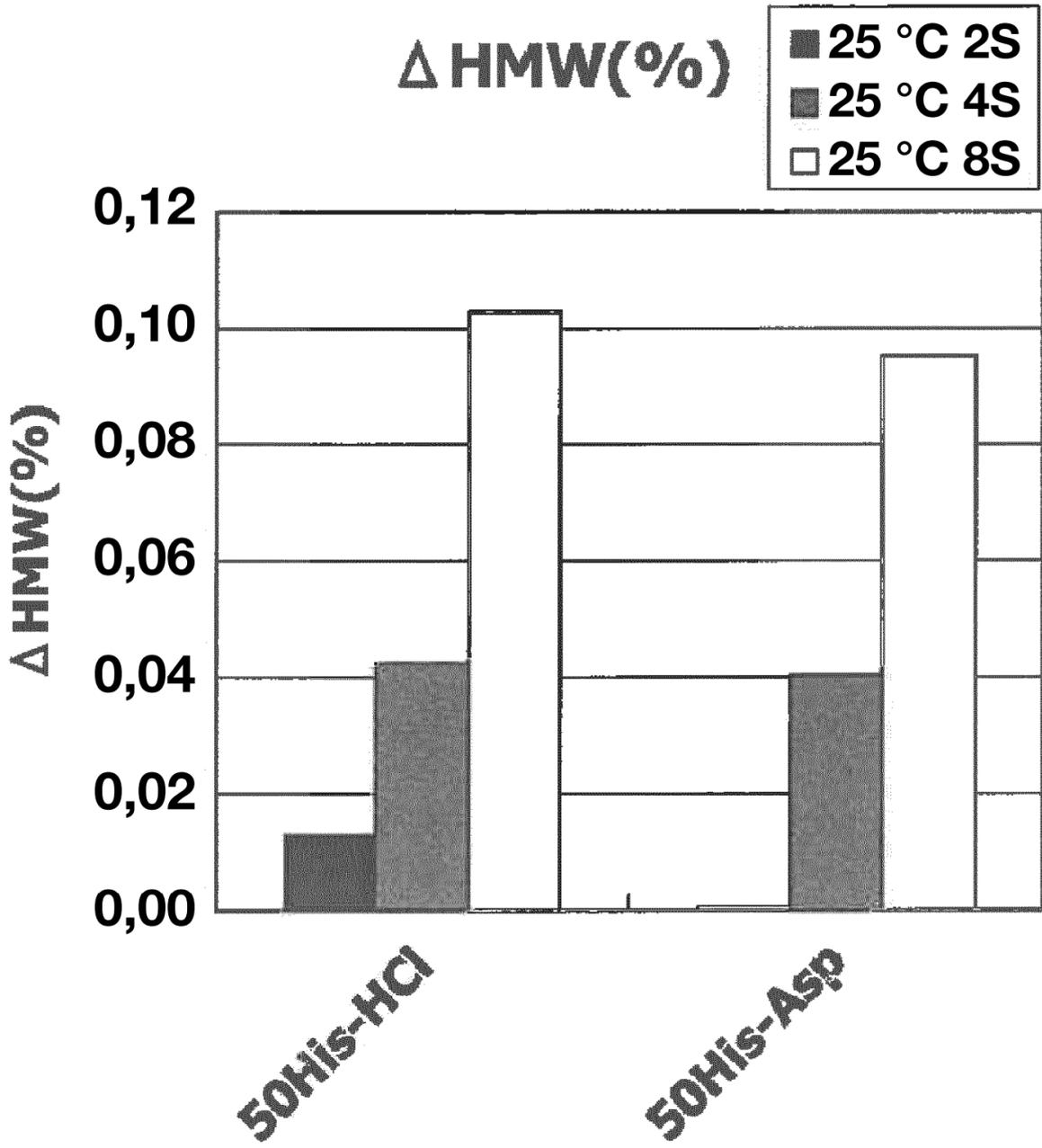


FIG. 13

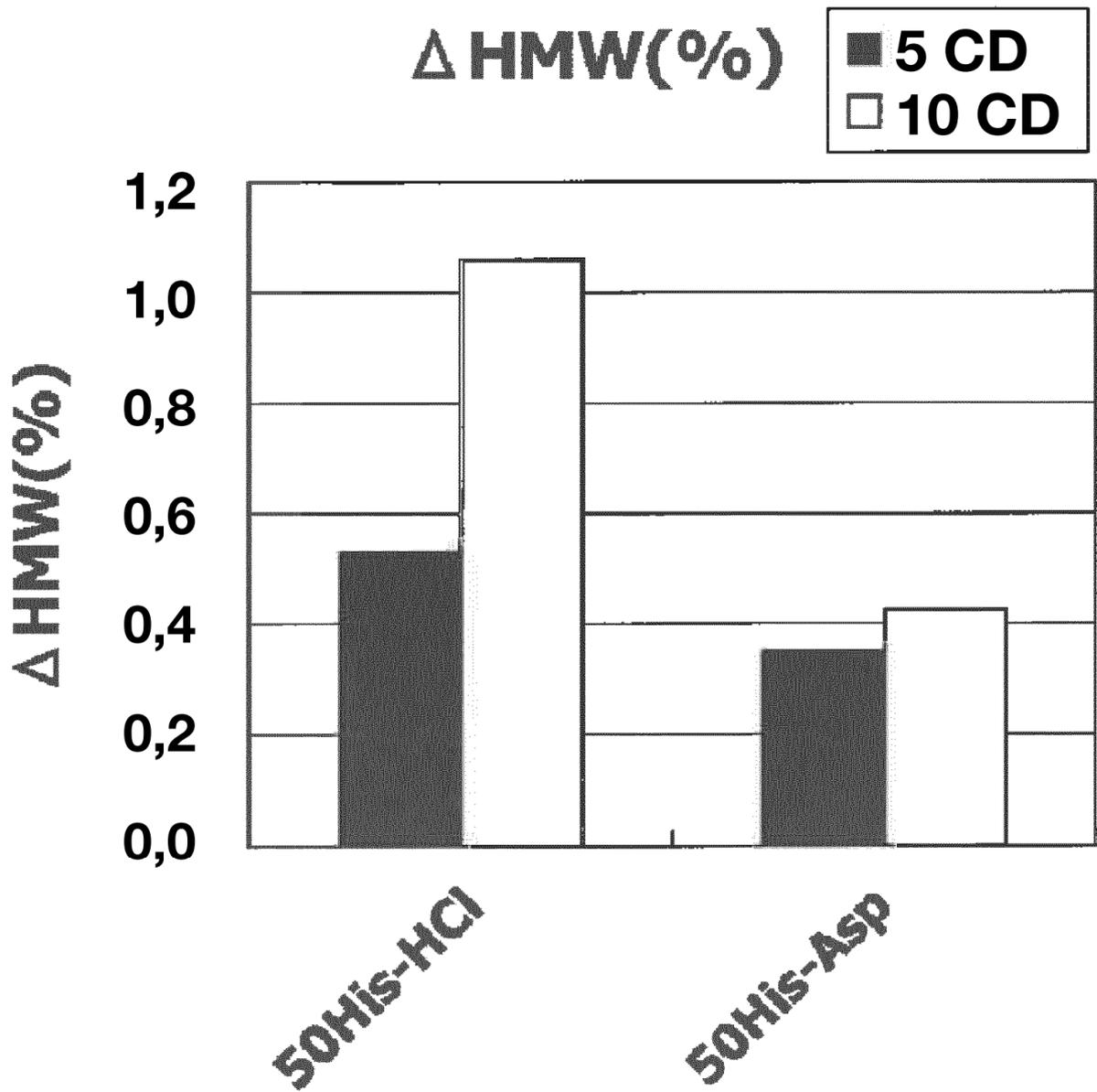


FIG. 14

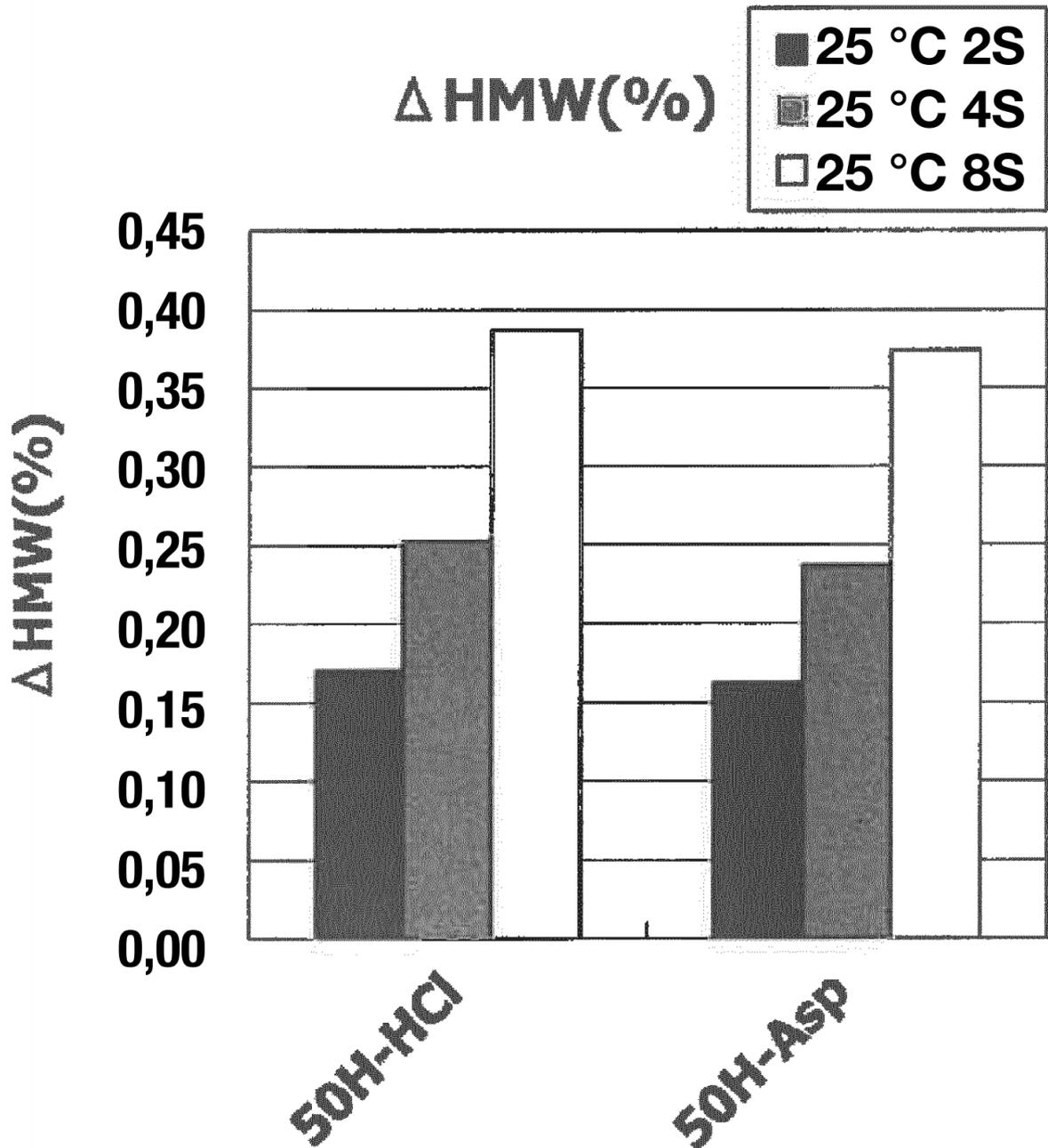


FIG. 15

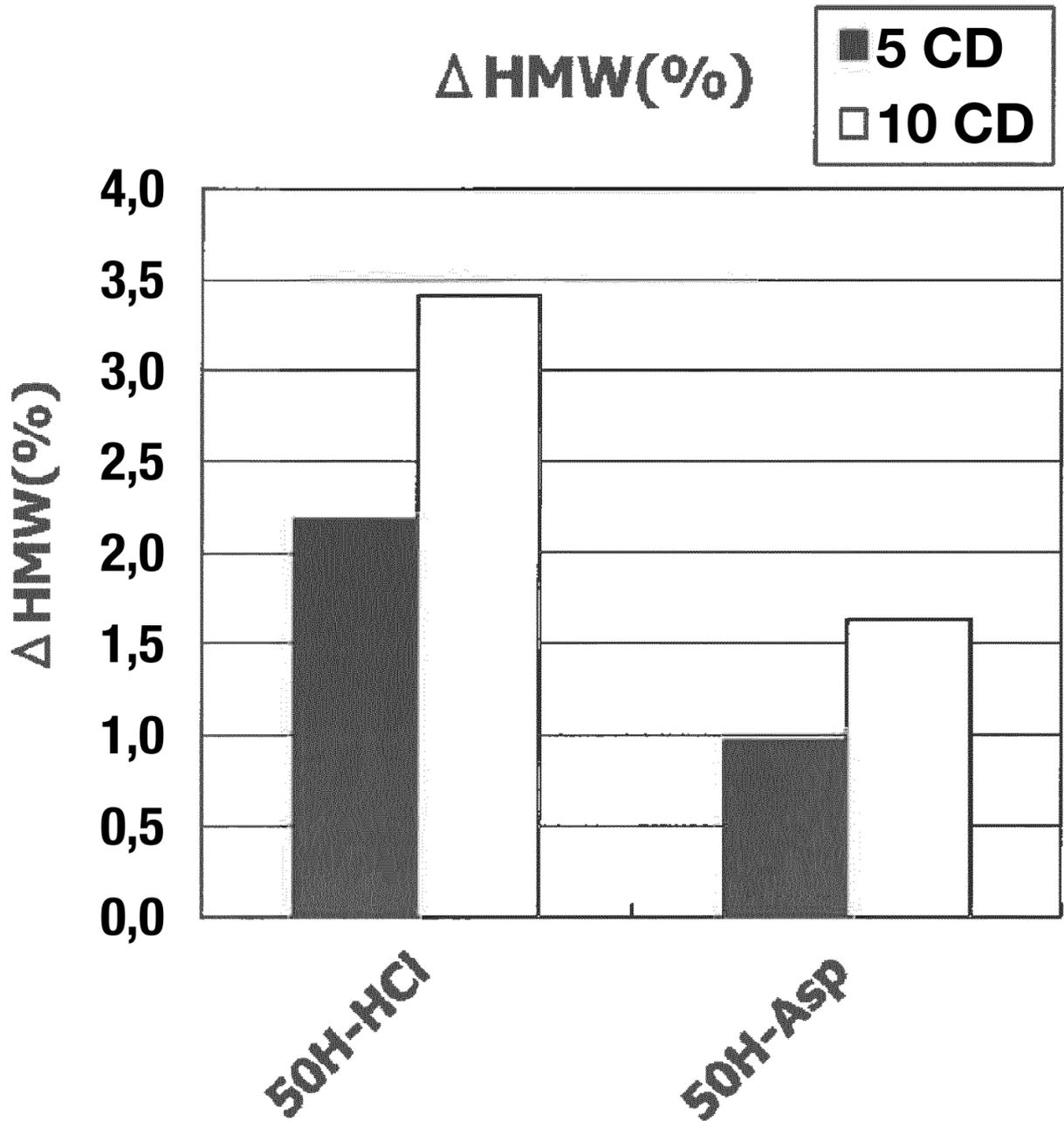


FIG. 16

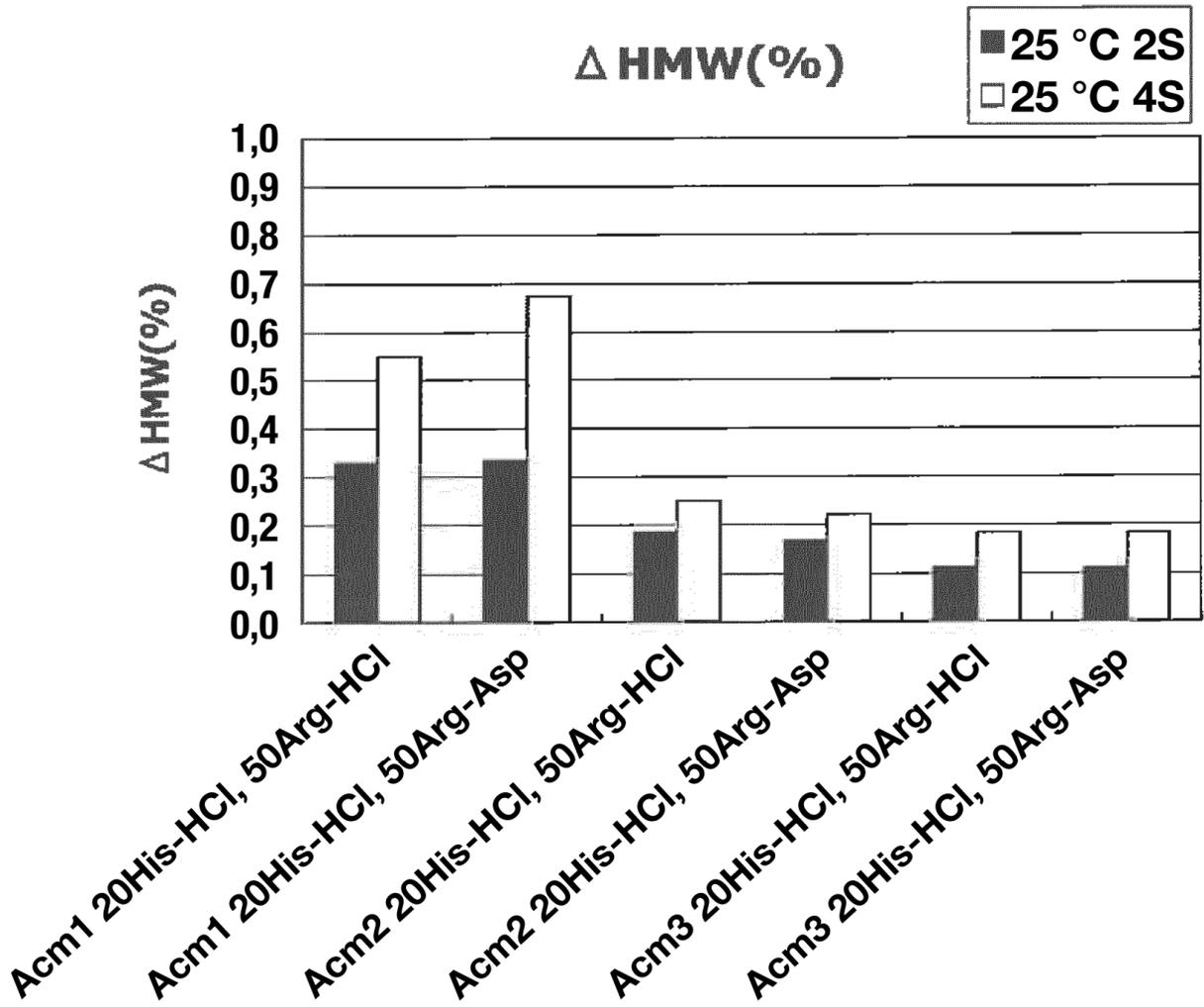


FIG. 17

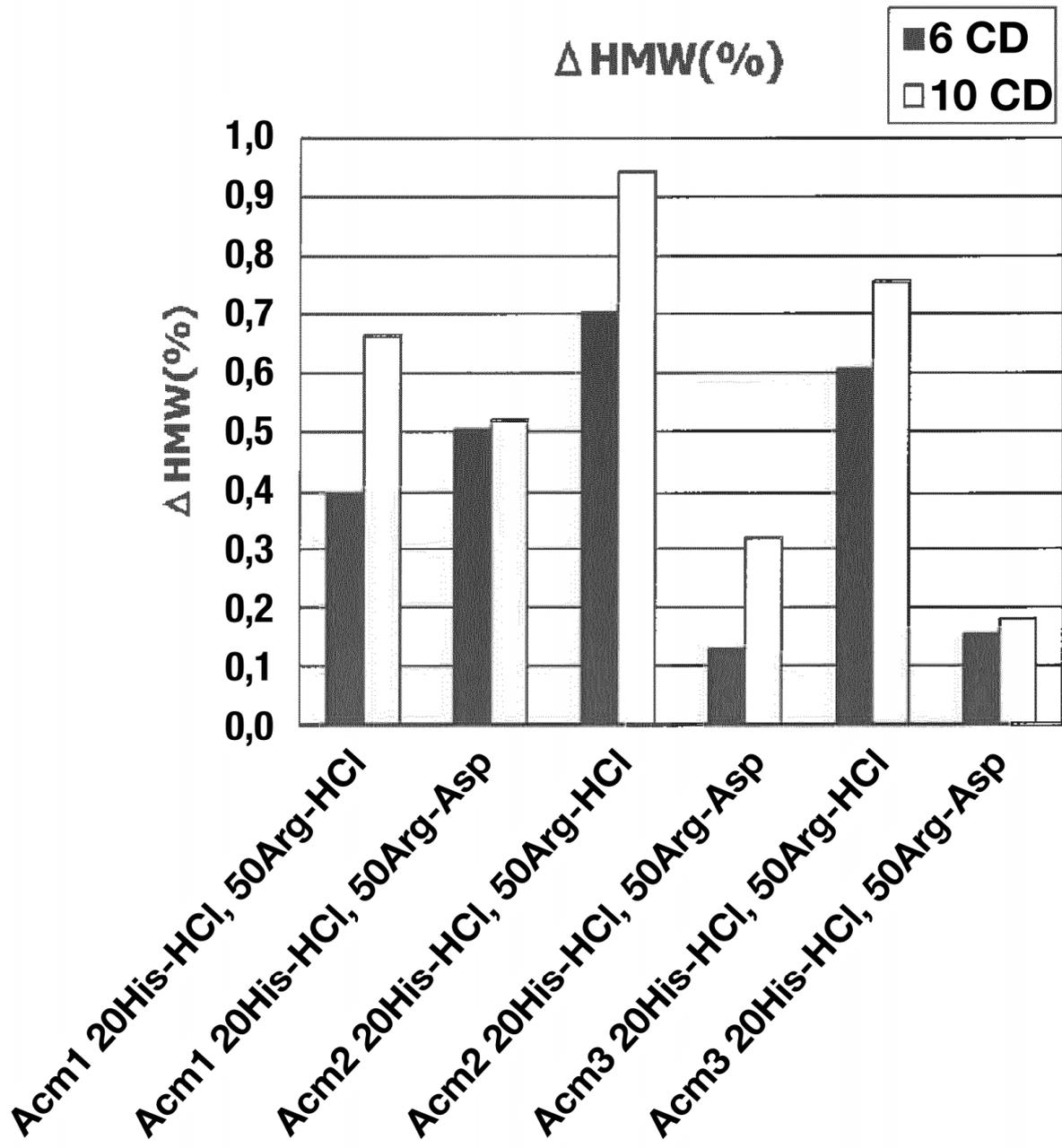


FIG. 18

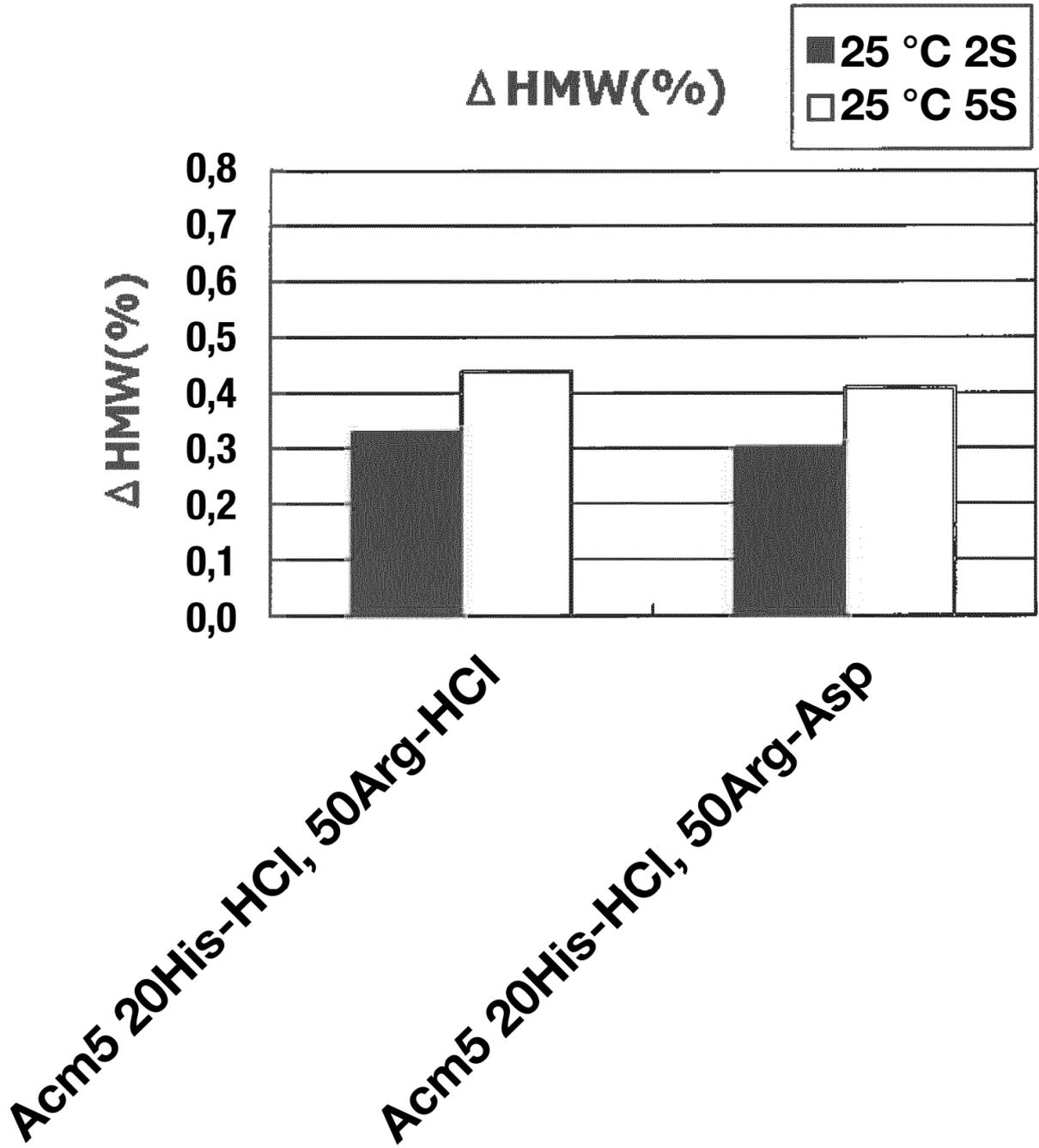


FIG. 19

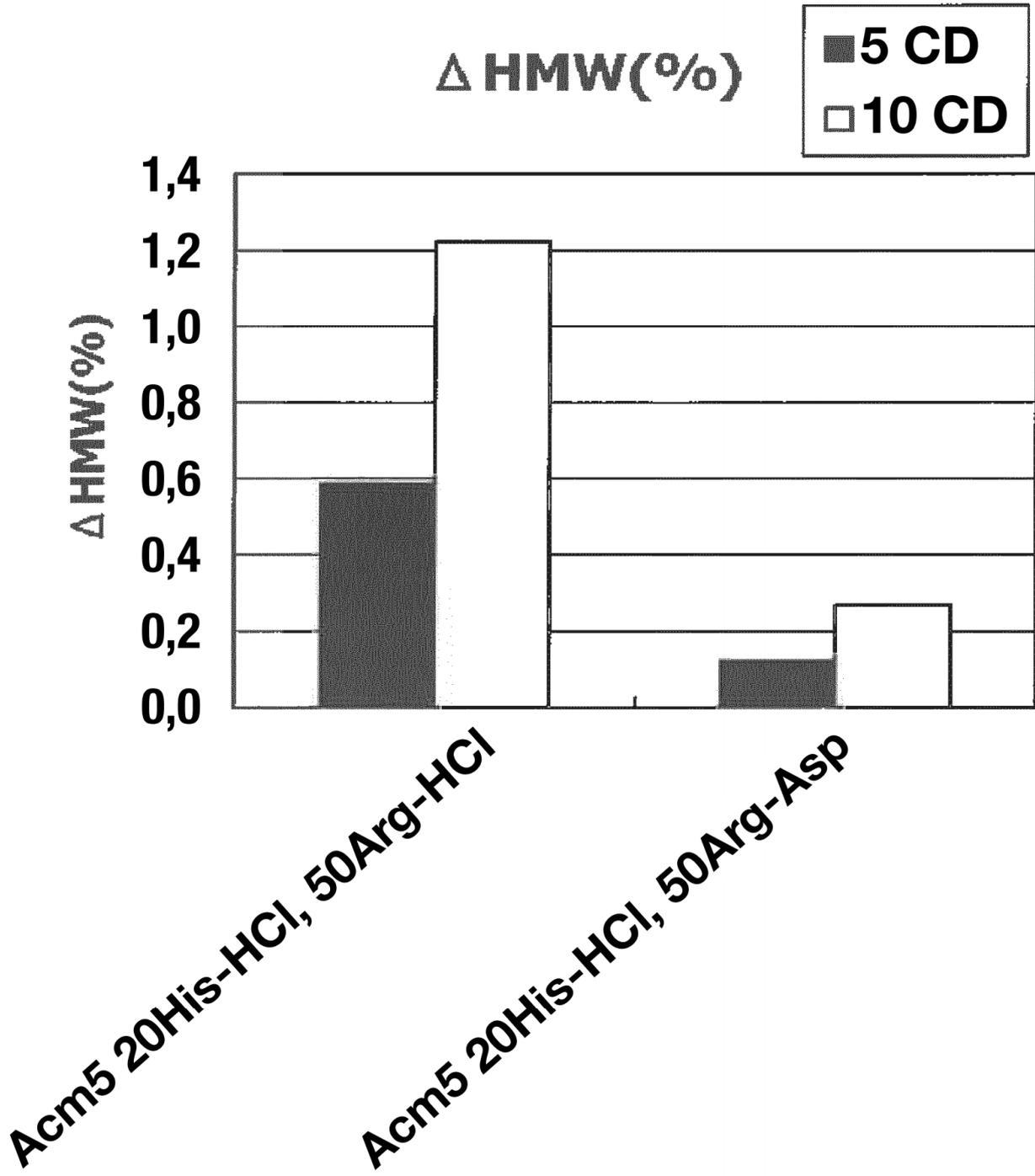


FIG. 20

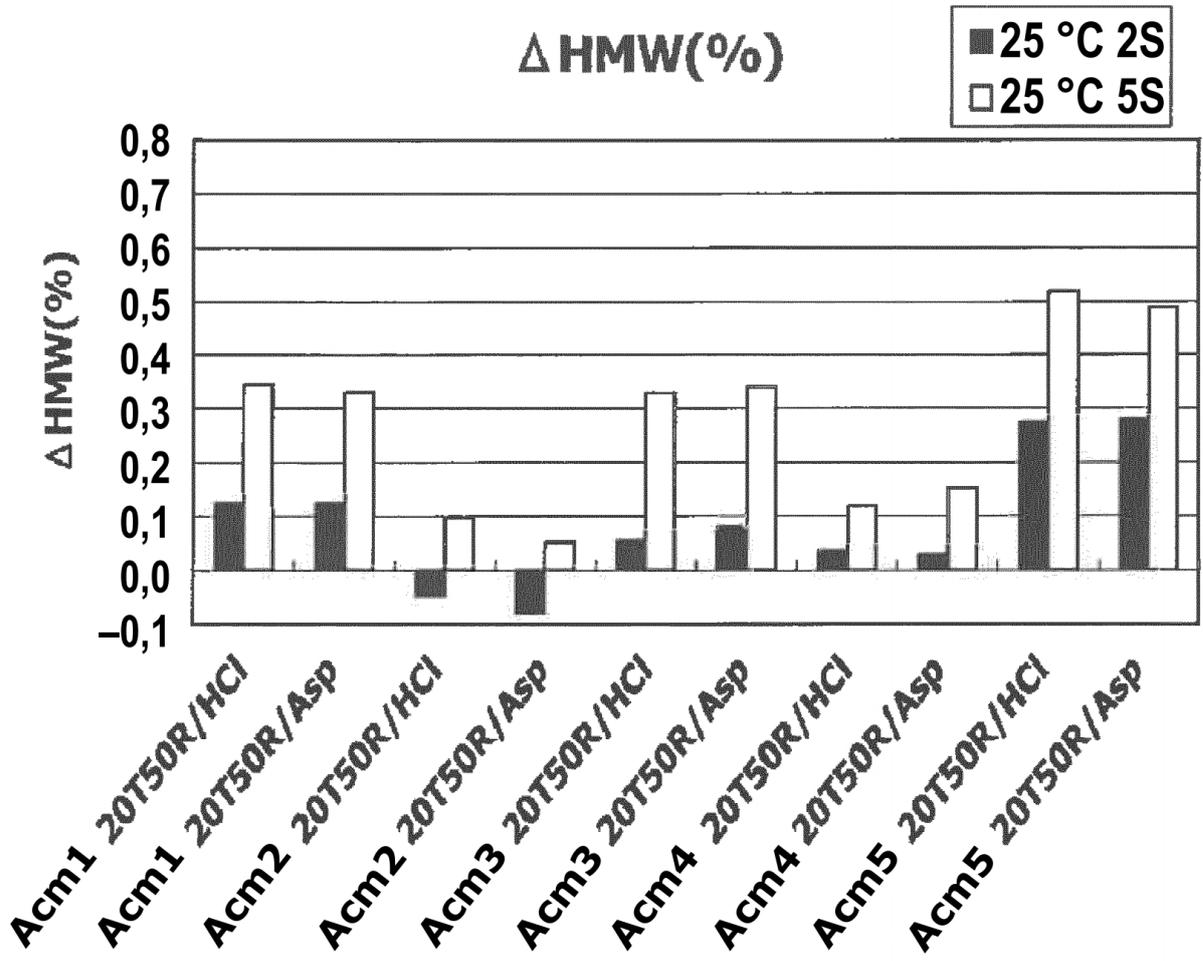


FIG. 21

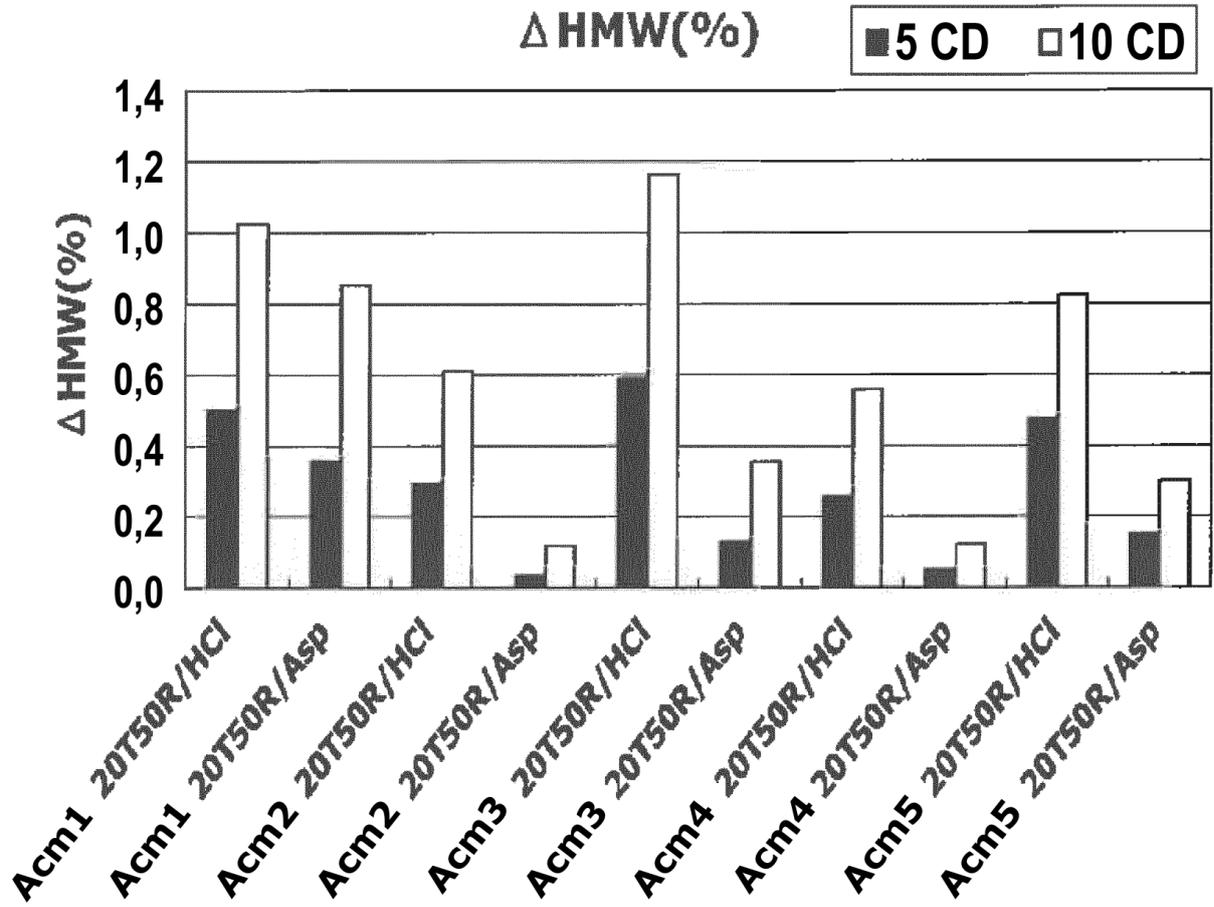


FIG. 22

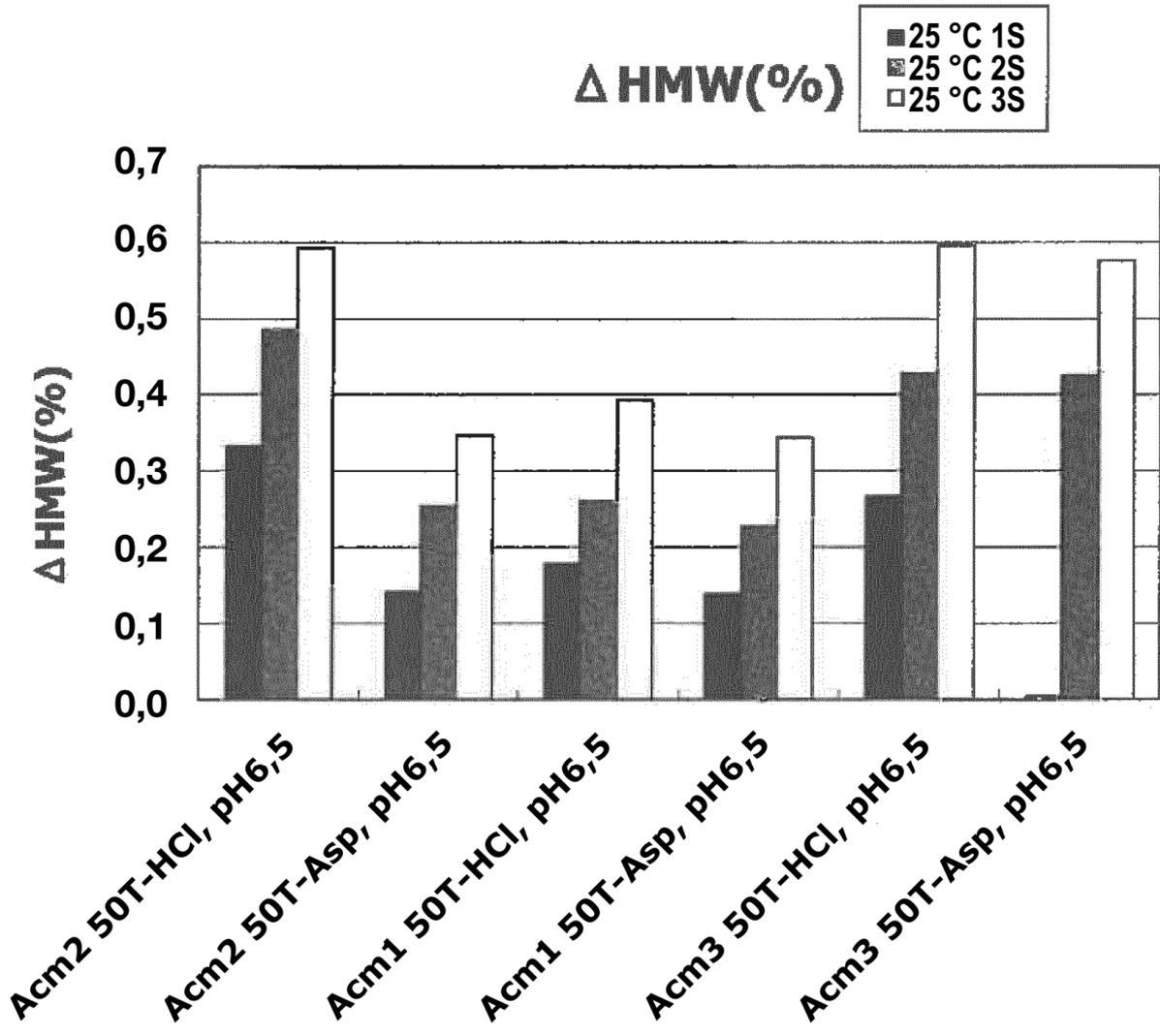


FIG. 23

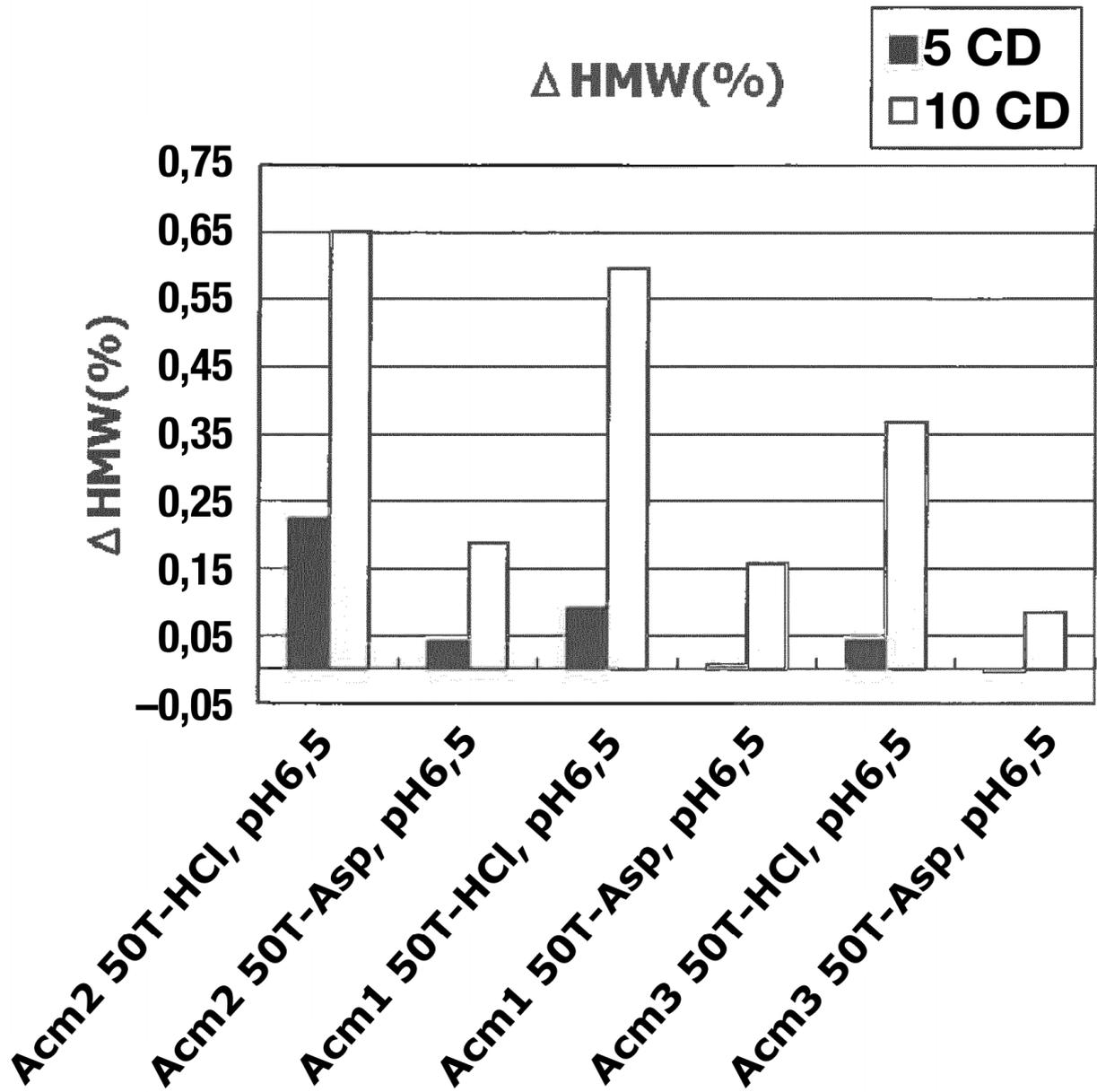


FIG. 24