(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 676 544**

(51) Int. Cl.:

***A61K 39/00*** (2006.01)
***A61K 39/395*** (2006.01)
***C07K 1/00*** (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.02.2004** **E 10005235 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.05.2018** **EP 2236154**

(54) Título: **Formulación de inmunoglobulina y procedimiento de preparación de la misma**

(30) Prioridad:

**10.02.2003 US 445818**

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
**20.07.2018**

(73) Titular/es:

**BIOGEN MA INC. (100.0%)**
**225 Binney Street**
**Cambridge, MA 02142, US**

(72) Inventor/es:

**BURKE, DAVID J.;**
**BUCKLEY, SHAUN E.;**
**LEHRMAN, SHERWOOD, RUSS;**
**O'CONNOR, BARBARA, HORSEY;**
**CALLAWAY, JAMES y**
**PHILLIPS, CHRISTOPHER**

(74) Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones:**

**Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes**

ES 2 676 544 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Formulación de inmunoglobulina y procedimiento de preparación de la misma

### CAMPO DE LA INVENCIÓN

La invención está dirigida a formulaciones concentradas estables de natalizumab, donde se retiene la actividad del anticuerpo y también pueden ser administradas en un volumen pequeño y pueden ser administradas a un sujeto de peso variable que tenga necesidad de las mismas.

### ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las formulaciones de anticuerpos y proteínas son conocidas en la técnica. Sin embargo, la preparación de formulaciones de proteínas, tales como formulaciones de anticuerpos, que sean química y biológicamente estables, está plagada de retos. La preparación de formulaciones que no solo sean estables, sino que puedan mantener un volumen pequeño (es decir, que permitan una inyección de volumen pequeño) incluso con una concentración mayor de proteína, tal como anticuerpo, también es problemática. Existe necesidad de tales formulaciones. Por ejemplo, las cantidades concentradas de proteína en un volumen fijo que también sean estables serían especialmente beneficiosas para pacientes de peso variable. La administración de fluidos a pacientes de pesos variables puede, por ejemplo, tener una reacción adversa. El desarrollo de tales formulaciones se ha visto obstaculizado por las propias proteínas o anticuerpos, que tienen una tendencia alta a agregarse y precipitar.

Gordon, F. *et. al*., Gastroenterology (2001), vol. 121, p. 268-274desvelan natalizumab en tampón de histidina con polisorbato 80 para infusión intravenosa en pacientes.

### RESUMEN DE LA INVENCIÓN

Por lo tanto, sin perjuicio de los informes presentados anteriormente en la bibliografía, existe una necesidad de procedimientos de formulación de proteínas y/o anticuerpos mejorados. También hay una necesidad de formulaciones estables con concentraciones de anticuerpo o proteína grandes en las que se retenga la actividad del anticuerpo o la proteína. También se necesitan formulaciones estables de proteína concentrada que mantengan un volumen fijo. Los solicitantes desvelan en el presente documento composiciones estables que se pueden utilizar además para preparar formulaciones de anticuerpo, especialmente formulaciones con concentraciones altas de anticuerpo que no precipiten y sean estables si se almacenan a las temperaturas recomendadas. Las formulaciones de anticuerpo muy concentradas y estables ayudarán enormemente a los médicos en el tratamiento de sujetos de pesos variables.

En base a la descripción contenida en el presente documento, la presente invención proporciona una formulación acuosa estable que comprende 20 mg/ml de natalizumab, tampón fosfato 10 mM, polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) y cloruro sódico 140 mM, donde la formulación tiene un pH de 6,0 ± 0,5.

Un aspecto de la descripción contempla una formulación farmacéutica acuosa estable que comprende una inmunoglobulina (u otra proteína), un tampón fosfato, un polisorbato y cloruro sódico. Preferiblemente, el polisorbato es polisorbato 80, y preferiblemente en la cantidad de aproximadamente el 0,001 % a aproximadamente el 2,0 % (p/v). Lo más preferiblemente, el polisorbato está presente en la cantidad de aproximadamente el 0,02 % en peso. En otro caso, la inmunoglobulina, u otra proteína, está presente en la formulación en una cantidad de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL. Preferiblemente, la formulación está tamponada a un pH entre aproximadamente 3,0 y aproximadamente 7,0 y lo más preferiblemente es aproximadamente 6,0 ± 0,5. La formulación es preferiblemente isotónica. La formulación puede comprender, además, histidina. Preferiblemente, la histidina es L-histidina.

En otro aspecto de la descripción, la inmunoglobulina de la formulación anterior es un anticuerpo antiintegrina alfa-4, tal como natalizumab u otro anticuerpo humanizado o anticuerpo monoclonal. Este anticuerpo puede estar presente en una cantidad estándar o en una cantidad concentrada, p. ej., aproximadamente 15 mg/mL o más. Preferiblemente, el natalizumab está presente en una cantidad de aproximadamente 20 mg/mL a aproximadamente 150 mg/mL. En casos donde la formulación está presente en una concentración de aproximadamente 15 mg/mL o más, esta formulación se mantiene en un volumen fijo, por ejemplo, de aproximadamente 125 mL.

Un objetivo adicional de la descripción es proporcionar un procedimiento para tratar a un paciente con peso variable por una afección con una cantidad terapéutica de una inmunoglobulina que comprende la administración de una

formulación como se describió anteriormente y en el presente documento, donde la afección se trata mediante administración de la formulación. Un aspecto adicional de la descripción es que la afección es una que está mediada por la integrina alfa-4, y en tales afecciones, la inmunoglobulina es una que reconoce y se une a la integrina alfa-4, tal como natalizumab.

Un aspecto adicional de la descripción contempla una composición que comprende un fosfato sódico, un polisorbato, una proteína y NaCl con un pH de 6,0 ± 0,5, donde la composición es estable cuando se almacena de 5 ºC a 8 ºC durante un periodo de tiempo prolongado.

Otro aspecto de la descripción contempla un procedimiento para preparar una formulación que contiene proteína estable que comprende mezclar fosfato sódico, cloruro sódico, un polisorbato y una proteína y ajustar el pH de la mezcla con ácido fosfórico a aproximadamente pH 6,0 ± 0,5.

La proteína puede estar liofilizada en la formulación de la presente invención. El polisorbato es preferiblemente polisorbato 80k, presente en una cantidad de aproximadamente el 0,02 % (p/v), y la proteína es preferiblemente natalizumab. La formulación puede comprender además histidina.

Preferiblemente, la proteína se liofiliza en una solución que comprende histidina 5 mM, 20 mg/mL de sucrosa y polisorbato 80 al 0,02 % a un pH 6, y la proteína es natalizumab a una concentración de 20 mg/mL.

Un objetivo adicional de la descripción es contemplar un artículo manufacturado que comprende un envase que retiene la formulación estable descrita anteriormente y en el presente documento.

Otro aspecto de la descripción contempla un procedimiento para tratar a un paciente con peso variable por una afección, que comprende administrar simultáneamente o secuencialmente al paciente una combinación terapéuticamente efectiva de una formulación descrita anteriormente y en el presente documento y un compuesto o una terapia efectiva contra la afección.

Un aspecto adicional de la descripción es contemplar un uso de cualquiera de las formulaciones estables descritas en el presente documento para la preparación de un medicamento para el tratamiento de una afección donde el medicamento es efectivo para tratar dicha afección. Este medicamento puede comprender además un segundo compuesto o terapia para tratar la afección.

La presente invención y las formas de realización de la misma se exponen en las reivindicaciones adjuntas.

## DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LAS FORMAS DE REALIZACIÓN PREFERIDAS DE LA INVENCIÓN

### 1. Definiciones

Se entiende que «proteína» incluye, pero no se limita a, inmunoglobulinas, enzimas, receptor y fragmentos de los mismos. Aunque se proporciona un análisis de la formulación principalmente en lo que se refiere a un anticuerpo o una inmunoglobulina, otras proteínas se contemplan como intercambiables en las formulaciones descritas.

Se entiende que «inmunoglobulina» incluye, pero no se limita a, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo (tal como scFv, Fab, Fc, $F(ab')_2$) y otras porciones de anticuerpos diseñadas mediante ingeniería genética. Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, las inmunoglobulinas pueden asignarse a diferentes clases. Hay cinco clases principales de inmunoglobulinas: IgA, IgD, IgE, IgG e IgM. Muchas de estas pueden dividirse además en subclases (isotipos), p. ej., IgG1, IgG2, IgG3, and IgG4; IgA1 e IgA2. Los dominios constantes de cadena pesada que corresponden a las diferentes clases de inmunoglobulinas se denominan alfa (α), delta (δ), épsilon (ε), gamma (γ) y mu (μ), respectivamente. Las estructuras de las subunidades y las configuraciones tridimensionales de diferentes clases de inmunoglobulinas son conocidas. Preferiblemente, la inmunoglobulina reconoce y se une a integrina alfa-4.

El término «anticuerpo» se usa en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales (que incluyen anticuerpos agonistas y antagonistas), las composiciones de anticuerpos con especificidad poliepitópica y los fragmentos de anticuerpo (p. Ej., Fab, $F(ab')_2$, scFv y Fv), siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada. Se entiende que «anticuerpo» incluye anticuerpos policlonales, anticuerpos monoclonales, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos primatizados® y otros anticuerpos producidos mediante ingeniería genética.

El término «anticuerpo monoclonal», como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo obtenido de una población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos que comprenden la población son idénticos excepto por posibles mutaciones presentes de forma natural que pueden estar presentes en cantidades menores. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, se dirigen contra un único sitio antigénico. Asimismo, en contraste con las preparaciones de anticuerpos convencionales (policlonales), que habitualmente incluyen anticuerpos diferentes dirigidos contra determinantes (epítopos) diferentes, cada anticuerpo monoclonal se dirige contra un único determinante del antígeno. Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales resultan ventajosos porque son sintetizados por sistemas de expresión celular de mamíferos o tecnología transgénica, no están contaminados por otras inmunoglobulinas. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan, según la presente invención, pueden ser expresados en cabras, como describieron Behboodi, *et al*. (2002) en Transgenic cloned goats and the production of therapeutic proteins. In Principles of Cloning. Elsevier Science (EE. UU.) y Meade *et al.* (1999). Expression of recombinant proteins in the milk of transgenic animals in Gene expression systems: using nature for the art of expression. J. M. Fernandez y J. P. Hoeffler ed., Academic Press. El modificador «monoclonal» indica el carácter del anticuerpo como obtenido de una población sustancialmente homogénea de anticuerpos, y no se debe interpretar como que requiere la producción del anticuerpo mediante cualquier procedimiento concreto. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales que se usan, según la presente invención, pueden fabricarse mediante los procedimientos descritos por Shepherd *et al*., en Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (Oxford University Press, 2000).

El término «monoclonal» también incluye anticuerpos «quiméricos» (inmunoglobulinas) en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase de anticuerpos concreta, mientras que el resto de la o las cadenas es idéntico u homólogo a las secuencias correspondientes de anticuerpos derivados de otra especie o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de tales anticuerpos, siempre y cuando exhiban la actividad biológica deseada. Por ejemplo, la capacidad para unirse a la integrina alfa-4. Los «anticuerpos monoclonales» también pueden aislarse de bibliotecas de anticuerpos en fago usando las técnicas descritas, por ejemplo, en Clackson *et al.*, 1991 Nature 352: 624-628 y Marks *et al.*, 1991 J. Mol. Biol., 222: 581-597. Las formas «humanizadas» de anticuerpos no humanos (p. ej., murinos, de ratón, bovinos, equinos, porcinos y similares) son inmunoglobulinas quiméricas, cadenas de inmunoglobulina o fragmentos de las mismas (tales como Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ u otras subsecuencias de unión al antígeno de anticuerpos), que contienen una secuencia mínima derivada de inmunoglobulina no humana. Por lo general, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en las que los residuos de una región determinante de la complementariedad (CDR) del receptor están sustituidos por residuos de una CDR de una especie no humana, tal como de ratón, rata o conejo, que tienen la especificidad, afinidad y capacidad deseadas. En algunos casos, los residuos de la región variable Fv de la inmunoglobulina humana están sustituidos por los correspondientes residuos no humanos. Asimismo, el anticuerpo humanizado puede comprender residuos que no se encuentran ni en el anticuerpo receptor ni en la CDR importada o las secuencias variables. Estas modificaciones se hacen para refinar y optimizar adicionalmente las prestaciones del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y habitualmente dos, dominios variables, en los que todas o sustancialmente todas las regiones CDR corresponden a las de una inmunoglobulina no humana y todas o sustancialmente todas las regiones FR son las de una secuencia consenso de inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado óptimamente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), habitualmente la de una inmunoglobulina humana.

La expresión «anticuerpos lineales» también queda incluida por el término general «anticuerpo» y son un par de segmentos Fd en tándem (VH-CH1-VH-CH1), que forman un par de regiones de unión al antígeno. Los anticuerpos lineales pueden ser biespecíficos o monoespecíficos.

Una «variante de anticuerpo» (también incluida por el término genérico «anticuerpo») es una molécula que difiere en la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos «parental» como resultado de la adición, deleción y/o sustitución de uno o más residuos de aminoácido en la secuencia del anticuerpo parental. En el caso preferido, la variante comprende una o más sustituciones de aminoácidos en una o más regiones hipervariables del anticuerpo parental. Por ejemplo, la variante puede comprender al menos una sustitución, p. ej., de aproximadamente una a aproximadamente diez, y preferiblemente de aproximadamente dos a aproximadamente cinco, en una o más regiones hipervariables del anticuerpo parental. Normalmente, la variante tendrá una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 75 % de identidad de secuencia de aminoácidos con las secuencias del dominio variable de la cadena pesada o ligera del anticuerpo parental, más preferiblemente al menos un 80 %, más preferiblemente al menos un 85 %, más preferiblemente al menos un 90 % y lo más preferiblemente al menos un 95 %. La identidad u homología con respecto a esta secuencia se define en el presente documento como el porcentaje de residuos de aminoácido en la secuencia candidata que son idénticos a los residuos del anticuerpo parental, tras alinear las

secuencias e introducir huecos, si fuera necesario, para conseguir el máximo porcentaje de identidad de secuencia. Ninguna de las extensiones, deleciones o inserciones N-terminales, C-terminales o internas en la secuencia del anticuerpo se debe interpretar como que afecta a la identidad u homología de secuencia.

Para analizar tales propiedades, se debe comparar una forma Fab de la variante con una forma Fab del anticuerpo parental o una forma de longitud total de la variante con una forma de longitud total del anticuerpo parental, por ejemplo, ya que se ha encontrado que el formato del anticuerpo afecta a su actividad en los ensayos de actividad biológica descritos en el presente documento. La variante de anticuerpo de interés particular es una que muestra una mejora de la actividad biológica de al menos aproximadamente 10 veces, preferiblemente al menos 20 veces y lo más preferiblemente al menos 50 veces, con respecto al anticuerpo parental. El anticuerpo «parental» es uno que está codificado por una secuencia de aminoácidos usada para la preparación de la variante. Preferiblemente, el anticuerpo parental tiene una región variable humana y tiene una o más regiones constantes de anticuerpo humanas. Por ejemplo, el anticuerpo parental puede ser un anticuerpo humanizado o humano.

Un «anticuerpo aislado» es uno que ha sido identificado, separado, y/o recuperado de un componente de su entorno natural. Los componentes contaminantes de su entorno natural son materiales que interferirían con los usos diagnósticos o terapéuticos del anticuerpo, y pueden incluir enzimas, hormonas y otros solutos proteináceos o no proteináceos. En formas de realización preferidas, el anticuerpo se purificará (1) hasta más del 95 % en peso de anticuerpo como se determina mediante el procedimiento Lowry, y lo más preferiblemente más del 99 % en peso, (2) hasta un grado suficiente para obtener al menos 15 residuos de secuencia de aminoácidos N-terminal o interna mediante el uso de un secuenciador de taza giratoria, o (3) hasta homogeneidad mediante SDS-PAGE en condiciones reductoras o no reductoras usando azul de Coomassie o, preferiblemente, tinción argéntica. El anticuerpo aislado incluye el anticuerpo *in situ* en el interior de células recombinantes, ya que al menos un componente del entorno natural del anticuerpo no estará presente. Normalmente, sin embargo, el anticuerpo aislado se preparará mediante al menos una etapa de purificación.

Los «fragmentos de anticuerpo» comprenden una porción de un anticuerpo intacto, generalmente la región de unión al antígeno o variable del anticuerpo intacto. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen los fragmentos Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de cadena sencilla y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo «Fv de cadena sencilla» o «sFv» comprenden los dominios VH y VL de anticuerpo, donde estos dominios están presentes en una cadena polipeptídica sencilla. Generalmente, el polipéptido Fv comprende además un conector polipeptídico entre los dominios VH y VL que permite que el sFv forme la estructura deseada para la unión al antígeno.

El término «diacuerpos» se refiere a fragmentos de anticuerpo pequeños con dos sitios de unión al antígeno, cuyos fragmentos comprenden un dominio variable de cadena pesada (VH) conectado a un dominio variable de cadena ligera (VL) en la misma cadena polipeptídica (VH-VL). Usando un conector que sea demasiado corto para permitir el emparejamiento entre los dos dominios de la misma cadena, los dominios se ven forzados a emparejarse con los dominios complementarios de otra cadena y crear dos sitios de unión al antígeno. La vía de administración del anticuerpo es conforme a procedimientos conocidos y son bien conocidos, y puede incluir, por ejemplo, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional, o mediante sistemas de liberación sostenida. El anticuerpo puede administrarse continuamente por infusión o por inyección en bolo. Las composiciones de anticuerpo terapéuticas generalmente se colocan en un envase que tiene un puerto de acceso estéril, por ejemplo, una bolsa de solución intravenosa o un vial con un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica. Los excipientes «farmacéuticamente aceptables» (p. ej., vehículos, aditivos) son aquellos que pueden administrarse razonablemente a un sujeto mamífero para proporcionar una dosis efectiva del ingrediente activo empleado. Una formulación «estable» es una en la que la proteína contenida en ella retiene esencialmente su estabilidad física y/o estabilidad química y/o estabilidad biológica tras su almacenamiento. Por «estable» también se entiende una formulación que exhibe pocos o ningún signo de inestabilidad, agregación y/desamidación incluidas. Por ejemplo, las formulaciones proporcionadas por la presente invención pueden permanecer estables durante al menos dos años, cuando se almacenan como se indica a una temperatura de 5-8 ºC.

En la técnica se dispone de diversas técnicas analíticas para medir la estabilidad proteica y se analizan en Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301 (Vincent Lee ed., New York, N.Y., 1991) y Jones, 1993 Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90, por ejemplo. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado, como ilustran los ejemplos proporcionados. El almacenamiento de formulaciones estables es preferiblemente durante al menos 6 meses, más preferiblemente 12 meses, más preferiblemente 12-18 meses y lo más preferiblemente durante 2 o más años.

Una proteína, tal como un anticuerpo o un fragmento del mismo, «retiene su estabilidad física» en una formulación farmacéutica si no muestra signos de agregación, precipitación, desamidación y/o desnaturalización tras examen visual del color y la claridad, o como se mide mediante dispersión de luz UV o mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

Una proteína «retiene su actividad química» en una formulación farmacéutica si la estabilidad química en un momento dado es tal que se considera que la proteína aún retiene su actividad biológica. La estabilidad química se puede evaluar detectando y cuantificando formas químicamente alteradas de la proteína. La alteración química puede implicar modificación de tamaño (p. ej., acortamiento), que puede evaluarse usando cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o espectrometría de masas con desorción/ionización láser asistida por matriz acoplada a un analizador de tiempo de vuelo (MALDI/TOF MS), por ejemplo. Otros tipos de alteración química incluyen alteración de la carga (p. ej., que se produce como resultado de la desamidación), que puede evaluarse mediante cromatografía de intercambio iónico, por ejemplo. Un anticuerpo «retiene su actividad biológica» en una formulación farmacéutica si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado está comprendida en aproximadamente el 10 % (comprendida en los errores del ensayo) de la actividad biológica exhibida en el momento en que se preparó la formulación farmacéutica como se determina en un ensayo de unión al antígeno, por ejemplo.

Por «isotónica» se entiende que la formulación de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente tendrán una presión osmótica de aproximadamente 250 a 350 mOsm. La isotonicidad puede medirse usando un osmómetro de presión de vapor o de descenso crioscópico, por ejemplo.

Como se usa en el presente documento, «tampón» se refiere a una solución tamponada que resiste cambio de pH mediante la acción de sus componentes conjugados ácido-base. El tampón de esta descripción tiene un pH en el intervalo de aproximadamente 3,0 a aproximadamente 7,5; preferiblemente de aproximadamente pH 4,0 a aproximadamente 7,0; más preferiblemente de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,5 y lo más preferiblemente tiene un pH de aproximadamente 6,0 ± 0,5. También se contempla un pH de cualquier punto intermedio de los intervalos anteriores.

En un sentido farmacológico, en el contexto de la presente descripción, que incluye la presente invención, una «cantidad terapéuticamente efectiva» de un anticuerpo, se refiere a una cantidad efectiva en la prevención o el tratamiento de un trastorno para cuyo tratamiento es efectivo un anticuerpo. Un «trastorno» es cualquier afección que se beneficiaría de un tratamiento con el anticuerpo o la proteína. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas o agudas, incluyendo aquellos estados patológicos que predisponen al mamífero al transtorno en cuestión.

«Tratamiento» se refiere tanto a tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Aquellos con necesidad de tratamiento incluyen a aquellos que ya padecen el trastorno, así como aquellos en los que se va a evitar el trastorno.

Un «conservante» es un compuesto que se puede incluir en la formulación para reducir esencialmente la acción bacteriana en ella, facilitando así la producción de una formulación multiusos, por ejemplo. Los ejemplos de conservantes potenciales incluyen cloruro de octadecildimetilbencilamonio, cloruro de hexametonio, cloruro de bezalconio (una mezcla de cloruros de alquilbencildimetilamonio en la que los grupos alquilo son compuestos de cadena larga) y cloruro de bencetonio. Otros tipos de conservantes incluyen alcoholes aromáticos tales como fenol, alcohol bencílico y butílico, alquilparabenos tales como metil- o propilparabeno, catecol, resorcinol, ciclohexanol, 3-pentanol y m-cresol.

Se entiende por «paciente» o «sujeto» que incluyen a un mamífero. Un «mamífero», a efectos de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, que incluye, pero no se limita a, humanos, animales domésticos y de granja, y animales de zoológico, para la práctica de deportes y mascotas tales como perros, caballos, gatos, vacas y similares. Preferiblemente, el mamífero es humano.

Por «Antegren®» se entiende que incluye el anticuerpo también conocido como AN100226 (número de código de anticuerpo) o natalizumab (nombre USAN). Natalizumab es un anticuerpo antiintegrina alfa-4 humanizado recombinante. Preferiblemente, la enfermedad o afección que se está tratando en el mamífero es una que se modula cuando se administra una dosis terapéuticamente efectiva de natalizumab.

Por «estable» se entiende una formulación que exhibe pocos o ningún signo de inestabilidad, agregación y/desamidación incluidas. Además, «estable» puede referirse también a una formulación que no exhibe signo alguno de inestabilidad durante dos años o más, cuando se almacena como se indica en

**2. Descripción general**

En la descripción siguiente y los ejemplos que siguen, se describen formulaciones para formulaciones de anticuerpos estables. Algunas formulaciones estables descritas tienen concentraciones de anticuerpo altas, pero mantienen un volumen fijo, donde los anticuerpos de estas formulaciones son estables y el anticuerpo no precipita de la solución ni sufre agregación. También se contemplan proteínas distintas de los anticuerpos para las formulaciones de concentración alta.

Los anticuerpos se administran habitualmente a un sujeto (p. ej., un humano) en una concentración de aproximadamente 0,01 mg/mL a aproximadamente 200 mg/mL. Más habitualmente, la concentración de los anticuerpos varía de aproximadamente 0,1 mg/mL a aproximadamente 150 mg/mL. Sin embargo, existen casos en los que se requiere administrar concentraciones mayores a un paciente, p. ej., de aproximadamente 15 a aproximadamente 200 mg/mL, más preferiblemente de aproximadamente 15 a aproximadamente 150 mg/mL, más preferiblemente de aproximadamente 20 a aproximadamente 50 mg/mL y lo más preferiblemente aproximadamente 20 mg/mL y cualquier valor entero intermedio.

La formulación de anticuerpo puede administrarse a un mamífero con necesidad de tratamiento con la proteína según procedimientos conocidos. Estos procedimientos pueden incluir, pero no se limitan a, administración intravenosa en forma de bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, intraperitoneal, intracerebroespinal, subcutánea, intraarticular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o por inhalación. En casos preferidos, la formulación de anticuerpo se administra al mamífero mediante administración intravenosa.

La dosificación apropiada de la proteína dependerá de, por ejemplo, la afección que se va a tratar, la gravedad y el curso de la afección, si la proteína se administra con fines preventivos o terapéuticos, la terapia previa, el historial clínico del paciente y su respuesta a la proteína, el tipo de proteína usada y el criterio del médico encargado. La proteína se administra adecuadamente al paciente en una vez o durante una serie de tratamientos y puede administrarse al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante. La proteína puede administrarse como tratamiento único o en conjunción con otros fármacos o terapias útiles para tratar la afección en cuestión. Como se usa en el presente documento, se dice que se administran dos (o más) agentes en combinación cuando los dos agentes se administran simultáneamente o se administran independientemente de una forma tal que los agentes actúan contemporáneamente.

En la puesta en práctica de los procedimientos de esta descripción, los compuestos de esta invención pueden usarse solos o en combinación, o en combinación con otros agentes terapéuticos. En ciertos casos preferidos, los compuestos de esta invención pueden administrarse junto con otros compuestos prescritos habitualmente para estas afecciones según la práctica médica generalmente aceptada. Por ejemplo, las formulaciones de esta invención pueden administrarse en combinación con otros agentes terapéuticos u otras terapias físicas para el tratamiento de la artritis reumatoide, la esclerosis múltiple y la enfermedad de Crohn.

**2.1 Procedimiento de fabricación de la formulación de anticuerpo**

El proceso puede alterarse, como sabrá el experto en la materia, pero generalmente, seguirá un procedimiento tal como el siguiente. Obtener una ampolla de un banco de células de trabajo que contenga células que hagan que el anticuerpo o la proteína resulten interesantes. Preparar el inóculo. Cultivar o fermentar las células con alimentaciones adicionales, según proceda. Cosechar/clarificar las células mediante centrifugación y/o filtración. Esto puede hacerse, por ejemplo, concentrando las células 10 veces mediante filtración con membrana en espiral. Filtrar mediante una filtración intermedia a 0,2 $\mu$m seguida de purificación mediante proteína A Sepharose Fast Flow® (es decir, cromatografía de afinidad) y elución reversa. A continuación, la composición que contiene anticuerpo recibe un tratamiento a pH 3,6-3,7. A continuación, la mezcla recibe una filtración viral seguida de una etapa de concentración/diafiltración. A continuación, la composición puede purificarse mediante DEAE Sepharose Fast Flow® (intercambio aniónico). Esta etapa puede realizarse múltiples veces. A partir de este punto, la composición se concentra adicionalmente y después se somete a una etapa de purificación usando el sistema Sephacryl S300HR® (es decir, cromatografía de filtración en gel), donde el tampón de migración usado es fosfato/NaCl. La composición que contiene anticuerpo puede concentrarse adicionalmente para las formulaciones de concentración alta (p. ej., 20 mg/mL o más) si así se desea. A continuación, la composición que contiene anticuerpo se tampona adicionalmente y se ajusta la concentración añadiendo polisorbato 80 al 0,02 % (p/v). A continuación, esta composición recibe una filtración final usando un filtro de 0,2 $\mu$m y, en este punto, puede repartirse en botellas de polipropileno de 100 mL a 10 L. El anticuerpo o inmunoglobulina así obtenido puede someterse a continuación a pruebas de control de calidad y ser liberado con garantía de calidad.

Lo anterior puede hacerse, por ejemplo, para natalizumab, como se diagrama a continuación:

| **200 L Material (5,0 mg/mL)** | **2000 L Material (5,0; 20 mg/mL)** |
|---|---|
| Ampolla del banco de células de trabajo | Ampolla del banco de células de trabajo |
| ↓ | ↓ |
| Preparación del inóculo | Preparación del inóculo |
| ↓ | ↓ |
| Fermentación | Fermentación (alimentación con medio adicional) |
| ↓ | ↓ |
| Cosecha/Clarificación mediante filtración: Concentración 10x mediante filtración con membrana en espiral | Cosecha/Clarificación mediante centrifugación y filtración: Concentración 10x mediante filtración con |
| | membrana en espiral |
| ↓ | ↓ |
| Filtración intermedia a 0,2 µm | Filtración intermedia a 0,2 µm |
| ↓ | ↓ |
| Purificación mediante proteína A Sepharose Fast Flow® (Cromatografía de afinidad) (Elución directa) | Purificación mediante proteína A Sepharose Fast Flow® (Cromatografía de afinidad) (Elución reversa) |
| ↓ | ↓ |
| Tratamiento a pH 3,7-3,8 | Tratamiento a pH 3,6-3,7 |
| ↓ | ↓ |
| -- | Filtración viral |
| ↓ | ↓ |
| Concentración/Diafiltración | Concentración/Diafiltración |
| ↓ | ↓ |
| Purificación mediante DEAE Sepharose Fast Flow® (Cromatografía de intercambio aniónico) (Ciclo único) | Purificación mediante DEAE Sepharose Fast Flow® (Cromatografía de intercambio aniónico) (Ciclos múltiples) |
| ↓ | ↓ |
| Concentración | Concentración |
| ↓ | ↓ |
| Purificación mediante Sephacryl S300HR® (Cromatografía de filtración en gel) (Tampón de migración: histidina/NaCl) | Purificación mediante Sephacryl S300HR® (Cromatografía de filtración en gel) (Tampón de migración: fosfato/NaCl) |
| ↓ | ↓ |
| -- | (Concentración adicional para 20 mg/mL) |
| ↓ | ↓ |
| Tampón y ajuste de concentración Fosfato/NaCl, polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) | Tampón y ajuste de concentración (añadir polisorbato 80 al 0,02 % (p/v)) |
| ↓ | ↓ |
| Filtración final a 0,2 µm y reparto (botellas de polipropileno de 100 mL-1 L) | Filtración final a 0,2 µm y reparto (botellas de polipropileno de 100 mL-10 L) |
| ↓ | ↓ |
| Pruebas de control de calidad y liberación con garantía de calidad de AN100226 purificado a granel | Pruebas de control de calidad y liberación con garantía de calidad de AN100226 purificado a granel |

**2.2 <u>La formulación de anticuerpo</u>**

En un aspecto de la descripción, se formula una inmunoglobulina en concentraciones de aproximadamente 1,7; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0; 25,0; 30,0; 40,0 o 50,0 mg/mL en fosfato sódico 10 mM, NaCl 140 mM (pH 6,0 ± 0,5) y polisorbato 80 al 0,02 %. Si fuera necesario, se ajusta el pH a 6,0 ± 0,5 con ácido fosfórico.

A continuación, se muestra un ejemplo de las diferentes formulaciones.

**COMPOSICIÓN CUANTITATIVA: FORMULACIÓN DEL TAMPÓN FOSFATO**

| Componente | Función | Fórmula unitaria (por mL) 1,7 mg/mL | Fórmula unitaria (por mL) 5,0 mg/mL | Fórmula unitaria (por mL) 20 mg/mL |
|---|---|---|---|---|
| Ingrediente activo: | | | | |
| Anticuerpo monoclonal humanizado antiintegrina α4 | Activo | 1,7 mg | 5,0 mg | 20 mg |
| Otros ingredientes: | | | | |
| Fosfato sódico, USP | Tampón y tonicidad | 1,4 mg | 1,4 mg | 1,4 mg |
| Cloruro sódico, USP | Tampón y tonicidad | 8,2 mg | 8,2 mg | 8,2 mg |
| Ácido fosfórico, NF | Ajustar el pH a 6,0 ± 0,5 | CS | CS | CS |
| Polisorbato 80, NF | Inhibir la agregación proteica | 0,2 mg | 0,2 mg | 0,2 mg |
| Agua para inyección, USP | Diluyente | CS hasta 1 mL | CS hasta 1 mL | CS hasta 1 mL |

Cualquiera de las formulaciones anteriores se introduce óptimamente en un vial aséptico. Estos viales pueden ser, por ejemplo, viales de vidrio neutros EP tipo I (p. ej., viales llenos con 5,0 o 20 mL) con tapones de caucho butilo gris Helvoet Pharma V9145/FM 157/1 con sellos de aluminio. Sin embargo, también se contemplan otros viales asépticos adecuados. Por ejemplo, las formulaciones pueden embotellarse como sigue:

| |
|---|
| EMBOTELLADO |
| Mezcla del tampón fosfato/cloruro sódico/polisorbato 80, si fuera necesario |
| ↓ |
| Esterilización de viales, tapones y equipos de fabricación |
| ↓ |
| Dilución con tampón fosfato/cloruro sódico/polisorbato 80 del anticuerpo a 1,7 o 50 mg/mL, según sea necesario |
| ↓ |
| Filtración estéril |
| ↓ |
| Llenado aséptico y tapado de los viales |
| Capsulado |
| ↓ |
| Análisis para su liberación |

Más concretamente, el natalizumab obtenido, por ejemplo, mediante los procedimientos comentados anteriormente puede embotellarse como sigue. El medicamento natalizumab en 200 L y 2000 L puede llenarse en una línea de llenado totalmente automatizada equipada con un túnel de lavado, esterilización y despirogenación de viales. Los tapones, los sellos y el equipo de llenado se lavan y esterilizan antes de su uso. Este proceso permite operaciones de llenado a gran escala consistentes con los volúmenes producidos a partir de la fermentación de 2000 L.

Cuando sea necesario, el tampón de la formulación, aproximadamente fosfato 10 mM, aproximadamente NaCl 140 mM, pH 6,0 ± 0,5, aproximadamente polisorbato 80 al 0,02 %, puede mezclarse en una sala limpia clase 10 000 y usarse para diluir el medicamento a granel a la concentración final. Las especificaciones de concentración, pH y densidad durante el proceso se alcanzan preferiblemente antes de la filtración.

El natalizumab u otra inmunoglobulina formulada puede someterse a filtración estéril a través de un filtro Millipak de 0,2 µm a un tanque de compensación de acero inoxidable en el interior del núcleo estéril. El llenado, tapado y capsulado de natalizumab es totalmente automatizado. Se recogen muestras para análisis de esterilidad del granel durante el proceso; se realizan pruebas de peso de llenado y espacio libre durante la operación de llenado. El

medicamento llenado se almacena con refrigeración a aproximadamente 2-8 ºC.

El llenado se produce dentro de un núcleo estéril clase 100 totalmente validado. La línea de llenado se valida para proporcionar volúmenes de llenado comprendidos dentro de las tolerancias esperadas para los volúmenes de llenado de 5,0 mL y 20 mL. Se realiza una monitorización medioambiental integral durante la operación de llenado y se revisa para verificar la conformidad continua con esta norma. Los llenados de medios se realizan trimestralmente para mantener las operaciones de llenado asépticas.

Como alternativa, los 200 L de principio activo producidos pueden embotellarse conforme al ejemplo siguiente. Los viales, las agujas de llenado, el equipo de filtración y los tubos se preparan y esterilizan antes de su uso. Los tapones pueden ser preparados por el proveedor. A continuación, se esterilizan los tapones antes del llenado.

El medicamento natalizumab, u otra proteína, se llena en una línea de llenado semiautomática, con preparación en lotes de los componentes, llenado automatizado, tapado inmediato y una posterior operación de capsulado. Esta operación es apropiada para operaciones a escala de lotes pequeños.

A continuación, la solución a granel final se somete a filtración estéril a través de un filtro Millipak de 0,2 µm a un vaso receptor de vidrio estéril en un ambiente clase 100. La calibración regular y las comprobaciones durante el proceso garantizan que la tolerancia de llenado permanezca comprendida en ± 2 %. Los viales se tapan y capsulan inmediatamente. El medicamento llenado se almacena preferiblemente refrigerado a 2-8 ºC.

El vaso receptor de vidrio puede ser cualquier número de viales, pero puede ser, por ejemplo, un vial de vidrio neutro de 5,0 o 20 mL tipo I (EP) suministrado, por ejemplo, por Epsom Glass o AMILCO o un vial de vidrio de borosilicato tipo I USP de 5,0 mL o 20 mL suministrado, por ejemplo, por Kimble o Wheaton. Estos viales pueden usar cualquier medio de cierre adecuado. Los cierres de vial incluyen, pero no se limitan a, un tapón de caucho butilo gris Helvoet Pharma V9145/FM 157/1 de 13 mm o un tapón de caucho butilo gris Helvoet Pharma V9145/FM 157/1 de 13 mm y 20 mm o un tapón de caucho butilo gris West 4432/50 de 13 mm o 20 mm. A continuación, la botella con tapón de caucho se sella, lo más habitualmente usando un sello de aluminio, tal como el fabricado por West.

Aunque la presente invención se ha descrito en detalle haciendo referencia a los ejemplos que se presentan a continuación, se entiende que se pueden hacer diversas modificaciones y serán fácilmente reconocidas por el experto en la materia.

**EJEMPLOS**

**Ejemplo 1**

**Selección del polisorbato 80**

El procedimiento habitual de administrar natalizumab es el intravenoso. La administración intravenosa requiere que la formulación final sea isotónica. Se eligió inicialmente una formulación de AN100226 (natalizumab), 5 mg/mL en L-histidina 50 mM, NaCl 150 mM, pH 6,0 (Formulación n.º 1). Durante un estudio de fase II, se observó precipitación de proteína del anticuerpo durante la dilución e introducción de natalizumab en el equipo de dosificación clínica. Se introdujo polisorbato 80 en la formulación (Formulación n.º 2) para resolver la precipitación de proteína observada. Preferiblemente, el polisorbato para uso con la presente descripción es bajo en peróxido, es decir, polisorbato de Sigma, número de producto P6479, número de lote 071K7283.

Los dos factores que han mostrado acelerar la precipitación del anticuerpo AN100226 son la presencia de trazas de aceite de silicona y la desnaturalización en la interfaz aire-líquido. El aceite de silicona se introdujo en el producto tras el uso de jeringas de polipropileno lubricadas estándar equipadas con tapones de caucho siliconado. La introducción del aceite de silicona es suficiente para provocar una precipitación de anticuerpo perceptible en la Formulación n.º 1 tras agitación suave y almacenamiento a temperatura ambiente. La agregación, desamidación y precipitación posterior provocadas por la desnaturalización en la interfaz aire-líquido se ha vuelto más perceptiblemente problemática con el envío del fármaco a las instalaciones clínicas. Ambas causas de precipitación de proteína se han resuelto mediante la adición de polisorbato 80 a una concentración del 0,02 % (p/v).

La Formulación n.º 2 muestra una estabilidad comparable a la de la formulación de histidina/NaCl (Formulación n.º 1) en todos los ensayos de caracterización de proteínas, a la vez que proporciona una estabilidad mayor durante el envío del producto y su manipulación en la instalación clínica.

La adición de polisorbato 80 a la formulación también supera el problema de la precipitación o agregación de anticuerpo cuando se preparan formulaciones con mayor contenido de proteína. El trabajo inicial se centró en la agregación inducida por agitación a concentraciones de proteína altas, 50 mg/mL incluida. Sometiendo el material a agitación con un mezclador tipo vórtice, las especies agregadas se detectaban mediante cromatografía de exclusión por tamaño-cromatografía líquida de alta resolución (SEC-HPLC). Este modelo identificó el polisorbato 80 como un inhibidor de la agregación efectivo, mientras que la sucrosa y otros componentes tamponadores tuvieron un efecto beneficioso pequeño.

La efectividad de la adición de polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) en la prevención de la precipitación inducida por agitación a una concentración de proteina de 5 mg/mL se evaluó tras la adición de 10 µL de una solución de polisorbato 80 al 10 % a viales de natalizumab (n.º de lote AN100226-0003). Los viales se agitaron sobre sus lados junto con varios viales de natalizumab de la Formulación n.º 1 a 150 rotaciones por minuto en un plano horizontal. En un plazo de 3 horas de este tratamiento a temperatura ambiente, los viales de la Formulación n.º 1 estaban cargados de partículas y parecían turbios, mientras que los viales con polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) permanecían claros y libres de partículas.

La agregación observada se supone que es provocada por la interfaz aire-superficie, ya que los viales completamente llenos de AN100226 en ausencia de polisorbato 80 se agitaron durante periodos de tiempo prolongados sin que se indujera formación de partículas adicional.

Se realizó una evaluación de la capacidad del polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) de inhibir la precipitación de proteína facilitada por trazas de silicona. Se ajustó un vial de natalizumab (n.º de lote AN100226-0003) a polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) y se extrajo a una jeringa de polipropileno lubricada de 60 mL comercializada. Se dejó que el material asentara durante varias horas a temperatura ambiente. La inspección visual confirmó que no se estaba produciendo precipitación. A continuación, el material se filtró a través de un filtro de 0,2 µm a un vial de 5 mL, se inspeccionó y se encontró que estaba sustancialmente libre de partículas después de varios días, mientras que los viales tratados de la misma forma en ausencia de polisorbato 80 (Formulación n.º 1) estaban cargados de partículas.

**Ejemplo 2**

**Selección del tampón fosfato**

Durante las pruebas de liberación del placebo histidina (que contenía polisorbato 80 al 0,02 %), se detectaron nuevas trazas de impurezas. Estas impurezas surgen de la degradación del polisorbato 80, aparentemente mediante una reacción de oxidación que implica iones metálicos e histidina. Para el medicamento natalizumab activo, estas trazas de impurezas se han detectado únicamente tras su almacenamiento a temperaturas elevadas (p. ej., 25 ºC y 40 ºC). Por tanto, se tomó la decisión de modificar el placebo y usar fosfato para sustituir a la histidina en el tampón. El lote de histidina usado en el producto placebo fue diferente del usado para los lotes AN100226-004 y AN100226-005 del medicamento natalizumab activo. El impacto de la fuente de histidina sobre la degradación del polisorbato 80 se comenta con más detalle más adelante.

Durante las pruebas del placebo, se detectaron trazas de impurezas en el placebo histidina/NaCl/polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) (Formulación n.º 2). Estas impurezas se detectaron mediante su absorbencia en la región ultravioleta de longitud de onda baja. Se determinaron los perfiles de absorbancia de 200 a 400 nm para el placebo almacenado a 5 ºC, 25 ºC y 40 ºC durante un mes. Estos datos indican que las impurezas aumentan en función de la temperatura.

Se modificó el procedimiento de cromatografía de exclusión por tamaño-HPLC usado para monitorizar la agregación de anticuerpo con el fin de aumentar la sensibilidad de detección de las trazas de impurezas aumentando la carga de la columna 5 veces hasta 100 µL, y la muestra es aplicada sin diluir, en lugar de diluida 10 veces. Además, la absorbancia se monitoriza a 260 nm para reflejar el máximo de absorbancia de las impurezas. El procedimiento proporciona una herramienta para evaluar la presencia de estas trazas de impurezas tanto en el placebo como en el producto, ya que el anticuerpo emerge mucho antes en el perfil de elución.

El placebo y el medicamento final natalizumab formulados en las Formulaciones n.º 1 y n.º 2 se analizaron mediante el procedimiento SEC-HPLC descrito anteriormente. El análisis del placebo de la Formulación n.º 1 enriquecido con polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) se realizó justo antes de la cromatografía. Esto muestra la absorbancia UV del polisorbato 80, la histidina y la sal en ausencia de trazas de impurezas. El pico ancho a los 16 minutos está asociado al polisorbato 80, mientras que los picos a aproximadamente 26-27 minutos se atribuyen a la histidina y la sal. El placebo histidina/NaCl/polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) (Formulación n.º 2) almacenado a 5 ºC durante dos meses muestra un marcado aumento de los picos de elución tardía, lo que implica al polisorbato 80 en la producción de

estas impurezas. Además, la elución a los 16 minutos desapareció, lo que indica que el polisorbato 80 se ha degradado.

El AN100226 almacenado como principio activo a granel durante aproximadamente 5 meses a 5 ºC de la Formulación n.º 1 se analizó después de enriquecer con polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) justo antes de la cromatografía. El anticuerpo eluye a 16-18 minutos usando estas condiciones de sobrecarga. El resto del perfil se asemeja al placebo enriquecido con polisorbato 80. También se analizaron mediante este procedimiento las muestras de estabilidad a los dos meses para el lote de natalizumab n.º AN100226-0004. El perfil de elución para la muestra de natalizumab a 5 ºC indica la ausencia de pico adicional alguno y niveles comparables de los picos de histidina/sal a los 26-27 minutos. Las trazas de impurezas se detectan a los dos meses para la muestra a 25 ºC, y hay presencia de niveles elevados para la muestra de dos meses a 40 ºC. Por tanto, estas impurezas no se han detectado en los suministros clínicos, que se almacenan a 5 ºC. La aparición de estas trazas de impurezas se produce mucho más rápidamente en el placebo que en el natalizumab.

Para evitar la formación de estas impurezas en el placebo, se sustituyó la histidina por componentes tamponadores inorgánicos en la formulación del placebo. El producto placebo para los ensayos clínicos es una solución tamponada de fosfato isotónica y estéril con polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) a pH 6,0. Se demostró que la sustitución de la histidina por fosfato reducía significativamente la velocidad de degradación del polisorbato 80. Se analizaron 100 µL del placebo fosfato/NaCl/polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) mediante cromatografía de exclusión por tamaño-HPLC monitorizada a 260 nm tanto a tiempo cero como después de 3 días a 60 °C. Se ve poco cambio en el perfil SEC-HPLC como resultado de esta incubación. El perfil SEC-HPLC para la formulación de histidina/NaCl/polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) después de tan solo dos días a 60 ºC muestra niveles significativos de trazas impurezas relacionadas con la degradación del polisorbato 80. Estos datos demuestran que la degradación del polisorbato 80 se ve significativamente impedida por la sustitución de histidina por fosfato en la formulación del placebo.

**Ejemplo 3**

**Formulación de natalizumab con polisorbato 80 e histidina combinados**

El mecanismo por el que se producen estas trazas de impurezas se piensa que es mediante una oxidación del polisorbato catalizada por metal (*véase,* Donbrow *et al.*, 1978 J. Pharmaceutical Sciences, 67(12): 28). Donbrow describe que se produce autooxidación durante el almacenamiento para diferentes tipos de polisorbato (p. ej., polisorbato 20). La luz, las temperaturas y los iones metálicos también afectan a la autooxidación. Donbrow *et al.* (1978). Se ha confirmado que para que esta reacción avance a una velocidad significativa se necesita tanto histidina como polisorbato 80. Ajinomoto es la única fuente de histidina usada para formulación. Sin embargo, se han observado diferencias significativas en la velocidad de reacción entre lotes suministrados por Ajinomoto.

Un factor adicional que juega un papel importante en la aceleración de la reacción es la presencia de metal. Esto se demostró llevando a cabo una reacción a 60 ºC durante cinco días en un vaso de vidrio con histidina 50 mM (n.º de lote R016A008) y polisorbato 80 al 2 % (p/v). En estas condiciones, se producen niveles mínimos de las trazas de impurezas para este lote de histidina. A continuación, se dividió la reacción en tres vasos: (1) el primer vaso permaneció como control; (2) se añadió un cierre de envase (tapón) de butilo gris al segundo vaso; y (3) se añadió una aguja de acero inoxidable al tercer vaso. A continuación, se llevaron a cabo estas reacciones durante cuatro días a 60 ºC y se analizaron mediante un escáner UV de 200 a 400 nm. La reacción progresó más allá de este periodo de tiempo en presencia de la aguja.

**Ejemplo 4**

**Evaluación de impurezas - Prueba límite de dosis única en ratón**

La toxicidad potencial de estas impurezas se evaluó en una prueba límite de dosis única en ratón. Se usaron el placebo histidina y las muestras de natalizumab de la Formulación n.º 2 almacenadas a 40 ºC durante seis semanas porque estas muestras proporcionaban la mayor cantidad de impurezas. No hubo signos de toxicidad debida a las impurezas. Los datos preliminares se facilitan en la sección no clínica de la presentación.

Se determinaron los perfiles SEC-HPLC para inyecciones de 100 µL de muestras usadas en la prueba límite de dosis única en ratón. La muestra de natalizumab de la Formulación n.º 1 enriquecida con polisorbato 80 antes del análisis tiene poca elución de material con absorbancia a 260 nm tras 20 minutos. El pico de elución de este lote de natalizumab sin adición de polisorbato 80 se encontró a los 34 minutos y, por lo tanto, no indica degradación del polisorbato 80. Por el contrario, el placebo de la Formulación n.º 2 almacenado a 40 ºC durante seis semanas

mostró degradación completa, ya que el área total bajo la cuerva fue de 12,8 millones de µV•segundo. La muestra de natalizumab de la Formulación n.º 2 almacenada a 40 ºC durante seis semanas tuvo menos degradación completa. El análisis confirma que las muestras almacenadas a 40 ºC y ensayadas en la prueba límite de dosis única en ratón están cargadas de polisorbato 80 degradado.

**Ejemplo 5**

**Establecimiento de las especificaciones de impurezas**

Para evaluar si el polisorbato 80 parcialmente degradado todavía puede impedir la agregación de anticuerpo, se calentó la Formulación n.º 2 a 60 ºC durante 3 días en presencia de una aguja para convertir todo el polisorbato 80 en los niveles máximos de impurezas. Se confirmó que la reacción había degradado todo el polisorbato 80, tanto mediante SEC como mediante HPLC de fase reversa. Este material se diluyó uno a uno con una solución de 10 mg/mL de AN100226 de la Formulación n.º 2, lo que dio como resultado una solución que contenía polisorbato 80 al 0,01 % (p/v) y un 50 % del nivel máximo de polisorbato 80 degradado. Estas soluciones de anticuerpo se expusieron tanto a agitación como a agujas siliconadas durante varias horas; se impidió la agregación del anticuerpo. Las muestras de control expuestas a las mismas condiciones, pero sin polisorbato 80, mostraron precipitación significativa.

A partir de este trabajo, se concluye que mientras no se degrade más del cincuenta por ciento del polisorbato 80, este material puede proporcionar el entorno adecuado para impedir la agregación de anticuerpo.

Aunque se produce muy poca degradación del polisorbato en el medicamento activo, se realiza monitorización del patrón de enfoque isoeléctrico (IEF) para confirmar que esta formulación no compromete al anticuerpo. Se determinaron los perfiles IEF para los momentos temporales de estabilidad a las seis semanas para condiciones de almacenamiento de 5 ºC, 25 ºC y 40 ºC. Las muestras tanto a 5 ºC como a 25 ºC son comparables al patrón de referencia, sin indicios de cambio alguno en la carga global de la proteína. La muestra a 40 ºC mostró el desplazamiento a especies más ácidas típicas de este producto en una formulación líquida tanto en presencia como en ausencia de polisorbato 80.

Para establecer una relación entre la magnitud de degradación del polisorbato 80 y el área de pico procedente de SEC-HPLC, se evaluó una serie de dilución para seis concentraciones de polisorbato 80 degradado del 0 al 50 %. La Formulación n.º 2 se calentó a 60 ºC durante 3 días con una aguja y confirmó estar 100 % degradada mediante SEC y HPLC de fase reversa. A continuación, se diluyó la mezcla de reacción con AN100226 purificado a granel de la Formulación n.º 1, se enriqueció nuevamente con polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) y se analizó mediante SEC-HPLC. Los perfiles SEC se monitorizaron a 260 nm.

Los datos de esta serie de dilución se representaron gráficamente mediante el área total de pico integrada (µV•segundo) para el perfil de absorbancia tras aproximadamente 24 minutos en función de la proporción de polisorbato 80 degradado. Esta gráfica indica que un área de menos de 5 millones de µV•segundo representa aproximadamente una pérdida del 50 % de polisorbato 80 convertido en sus productos de degradación. Hay una relación directa entre la cantidad de polisorbato 80 oxidada añadida y el área de pico para los picos de elución tardía del cromatograma.

Se ha establecido un límite preliminar para estas trazas de impurezas en el natalizumab en base a la prueba límite de dosis única en ratón, los datos de solubilidad del anticuerpo con el 50 % de polisorbato 80 degradado y las estimaciones de la magnitud de degradación del polisorbato 80. El procedimiento se ha incluido en el programa de estabilidad en curso y se ha establecido un límite. Si se fabrican lotes adicionales con tampón de histidina, estos límites se aplicarán también en el momento de la liberación.

Límite: el área total bajo los picos tras aproximadamente 24 minutos no debe superar 4 x 106 µV•segundo.

**Ejemplo 6**

**Formulación de natalizumab de 1,7 mg/mL**

1,7 mg de natalizumab
1,4 mg de fosfato sódico, USP
8,2 mg de cloruro sódico, USP
0,2 mg de polisorbato 80, NF

Ajustar el pH a 6,0 ± 0,5 con ácido fosfórico, NF. CS hasta 1 mL. Con almacenamiento preferido a 5-8 ºC.

**Ejemplo 7**

**Formulación de natalizumab de 5,0 mg/mL**

5,0 mg de natalizumab
1,4 mg de fosfato sódico, USP
8,2 mg de cloruro sódico, USP
0,2 mg de polisorbato 80, NF

Ajustar el pH a 6,0 ± 0,5 con ácido fosfórico, NF. CS hasta 1 mL. Con almacenamiento preferido a 5-8 ºC.

**Ejemplo 8**

**Formulación de natalizumab de 20 mg/mL**

20,0 mg de natalizumab
1,4 mg de fosfato sódico, USP
8,2 mg de cloruro sódico, USP
0,2 mg de polisorbato 80, NF

Ajustar el pH a 6,0 ± 0,5 con ácido fosfórico, NF. CS hasta 1 mL. Con almacenamiento preferido a 5-8 ºC.

**Ejemplo 9**

**Formulación de natalizumab de 50,0 mg/mL**

50,0 mg de natalizumab
1,4 mg de fosfato sódico, USP
8,2 mg de cloruro sódico, USP
0,2 mg de polisorbato 80, NF

Ajustar el pH a 6,0 ± 0,5 con ácido fosfórico, NF. CS hasta 1 mL. Con almacenamiento preferido a 5-8 ºC.

**Ejemplo 10**

**Formulación de natalizumab de 5,0 mg/mL**

5,0 mg/mL de natalizumab
NaCl 140 mM
Polisorbato 80 al 0,02 % (p/v)
Fosfato sódico 10 mM

Ajustar el pH a 6,0 ± 0,5 con ácido fosfórico. Óptimamente, almacenar la formulación de aproximadamente 5 ºC a aproximadamente 8 ºC.

**Ejemplo 11**

**Formulación de natalizumab de 10 mg/mL**

10,0 mg de natalizumab
1,4 mg de fosfato sódico, USP
8,2 mg de cloruro sódico, USP
0,2 mg de polisorbato 80, NF

Ajustar el pH a 6,0 ± 0,5 con ácido fosfórico, NF. CS hasta 1 mL. Con almacenamiento preferido a 5-8 ºC.

**Ejemplo 12**

**Formulación de natalizumab de 10 mg/mL**

10,0 mg de natalizumab
1,4 mg de fosfato sódico, USP
8,2 mg de cloruro sódico, USP
0,1 mg de polisorbato 80, NF
Ajustar el pH a 6,0 ± 0,5 con ácido fosfórico, NF. CS hasta 1 mL. Con almacenamiento preferido a 5-8 ºC.

**Ejemplo 13**

**Formulación de natalizumab de 20 mg/mL**

20,0 mg/mL de natalizumab
NaCl 140 mM
Polisorbato 80 al 0,02 % (p/v)
Fosfato sódico 10 mM

Ajustar el pH a 6,0 ± 0,5 con ácido fosfórico y llevar el volumen a 125 mL. Óptimamente, almacenar la formulación de aproximadamente 5 ºC a aproximadamente 8 ºC.

**Ejemplo 15**

**Formulación de natalizumab liofilizada**

Las formulaciones adicionales de anticuerpo a concentración alta, de 20-200 mg/mL, pueden consistir en fostato u otro tampón adecuado (tal como histidina, citrato, acetato o succinato) en el intervalo de concentración de 2 a 50 mM para proporcionar tamponamiento en el intervalo de pH de 3,0 a 7,0. Lo más preferiblemente, el pH es 6,0, +/- 0,5. La adición de polioles (tales como sorbitol y manitol), disacáridos (tales como sucrosa o trehalosa) y aminoácidos (tales como glicina) puede hacerse en cantidades variables con cloruro sódico para mantener la estabilidad y proporcionar una solución isotónica. El uso de tensioactivos tales como, pero no limitados a, polisorbatos añade estabilidad cuando se usan en el intervalo del 0,001 al 2 %. Para preparar una formulación líquida, se concentró natalizumab a 65 mg/mL en fosfato sódico 10 mM, cloruro sódico 140 mM, pH 6, con aproximadamente un 0,06 % de polisorbato 80. La solución resultante era ligeramente opalescente, pero sin partículas. La muestra contenía más del 99 % de monómero sin agregado de alto peso molecular o especies de bajo peso molecular mediante SEC.

Se proporciona una formulación farmacéutica liofilizada estable. Como el tampón fosfato experimenta un cambio de pH durante la congelación, es necesario sustituir el fosfato por un tampón diferente. Este tampón puede consistir en histidina, citrato o succinato, con capacidad para tamponar efectivamente en el intervalo de pH de 3,0 a 7,0, lo más preferiblemente en el intervalo de 6,0 +/- 0,5.

El uso de polioles (tales como manitol) y azúcares (tales como sucrosa) es necesario para proporcionar crio- y lioprotección. Estos polioles pueden usarse solos o en una combinación para proporcionar estabilidad y ajuste de la tonicidad. Además, pueden usarse aminoácidos (tales como glicina), a niveles de 10-1000 mM, para impedir la agregación.

Los tensioactivos, tales como polisorbatos o poloxámeros, pueden usarse a niveles del 0,001 % al 2,0 % para proporcionar estabilidad antes de la liofilización y tras la reconstitución y para proporcionar tiempos de reconstitución más rápidos.

La proteína, después de la etapa de purificación final, puede formularse usando ultrafiltración para su concentración y diafiltración para el intercambio de tampón. La proteína también puede formularse usando cromatografía en columna para el intercambio de tampón. También puede usarse alguna combinación de estas técnicas.

Además, la concentración final de proteína deseada puede obtenerse llenando a una concentración de proteína y excipiente inferior a la deseada y realizando la reconstitución a un volumen más pequeño. Por ejemplo, puede usarse un volumen de llenado de 2,5 mL de una solución de 40 mg/mL, seguido de reconstitución con 1 mL para obtener una solución de 100 mg/mL.

Por ejemplo, se liofilizó natalizumab, a una concentración de 20 mg/mL, en una solución que contenía histidina 5

mM, 20 mg/mL de sucrosa y polisorbato 80 al 0,02 %, pH 6. La solución se llenó hasta 5 mL por vial en viales de vidrio de borosilicato de 10 mL equipados con tapones de liofilización de caucho butilo grises. La liofilización se realizó usando un liofilizador VirTis modelo Genesis. El producto se congeló a una temperatura de estante de -60 ºC durante 10 horas y, a continuación, la temperatura de estante se elevó a -40 ºC. El secado primario se realizó a una temperatura de estante de -10 ºC y una presión de la cámara de 100 mTorr durante 20 horas. El secado secundario se alcanzó a una temperatura de estante de 25 ºC y una presión de la cámara de 100 mTorr durante 10 horas. Los viales se taparon al vacío.

A continuación, se reconstituyeron los viales usando 1 mL de API estéril para dar una formulación que contenía 100 mg/mL de natalizumab. Las muestras se analizaron inmediatamente después de la liofilización y tras 2 semanas de almacenamiento en la forma liofilizada a 40 grados. En ambos casos, los tiempos de reconstitución fueron inmediatos. Las soluciones reconstituidas eran claras e incoloras, con ausencia de material particulado. Las muestras contenían más del 99 % de monómero mediante SEC, sin agregado de alto peso molecular o especies de bajo peso molecular. Tras 2 semanas de almacenamiento a 40 grados, la muestra mostró una potencia del 94 % con respecto a la referencia (especificación 80-125 %).

**REIVINDICACIONES**

1. Una formulación acuosa estable que comprende 20 mg/ml de natalizumab, tampón fosfato 10 mM, polisorbato 80 al 0,02 % (p/v) y cloruro sódico 140 mM, donde la formulación tiene un pH de 6,0 ± 0,5.

2. La formulación de la reivindicación 1, donde la formulación es estable a una temperatura de 5-8 ºC durante al menos 6 meses.

3. La formulación de la reivindicación 1, donde el tampón fosfato es fosfato sódico.

4. Un artículo manufacturado que comprende un envase que retiene la formulación estable de cualquiera de las reivindicaciones 1-3.