

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 703 586**

51 Int. Cl.:

**C07K 16/24** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61K 47/10** (2007.01)  
**A61K 47/18** (2007.01)  
**A61K 47/00** (2006.01)  
**A61K 39/00** (2006.01)  
**A61K 9/00** (2006.01)  
**A61K 47/26** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.10.2015 PCT/EP2015/074986**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2016 WO16066688**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.10.2015 E 15808356 (8)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.09.2018 EP 3212667**

54 Título: **Formulación farmacéutica de anticuerpos anti-TNF alfa**

30 Prioridad:

**28.10.2014 HU P1400510**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**11.03.2019**

73 Titular/es:

**RICHTER GEDEON NYRT. (100.0%)**  
**Gyömroi út 19-21**  
**1103 Budapest, HU**

72 Inventor/es:

**LÁZÁR, JÓZSEF;**  
**OLAJOS, MARCELL y**  
**JÁNOS, VARGA-KUGLER**

74 Agente/Representante:

**SALVÀ FERRER, Joan**

ES 2 703 586 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 farmacéutica de anticuerpos anti-TNF alfa

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere en general al campo de las formulaciones farmacéuticas. Específicamente, la presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas líquidas de anticuerpos estables al almacenamiento mejoradas de Adalimumab basadas en un sistema tampón alternativo para citrato/fosfato y recipientes farmacéuticos como dispositivos de autoinyección que las contienen.

**Antecedentes de la invención**

Muchas proteínas en solución son marginalmente estables, experimentando cambios conformacionales debido a diversas condiciones de estrés durante la purificación, el procesamiento y el almacenamiento. Dichas condiciones de estrés pueden incluir temperatura elevada, deformación por cizallamiento, adsorción superficial y alta concentración de proteína (Arakawa T et al., 2006). Las proteínas estructuralmente alteradas tienen una fuerte tendencia a agregarse, lo que a menudo conduce finalmente a precipitación. La agregación irreversible es un problema importante para la estabilidad de almacenamiento a largo plazo de proteínas terapéuticas y para su transporte y manipulación.

Como proteínas altamente complejas, los anticuerpos son susceptibles a una variedad de vías de degradación física y química. La agregación de anticuerpos se produce fácilmente durante el almacenamiento en estado líquido (Chen B et al., 2003), lo que lleva a una pérdida de actividad biológica y al aumento de la inmunogenicidad que a su vez puede causar reacciones adversas graves como choque anafiláctico y otros problemas de seguridad. Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar formulaciones farmacéuticas de anticuerpos que reduzcan la agregación de anticuerpos. El objetivo principal de la formulación de anticuerpos como agentes terapéuticos es mantener la solubilidad, estabilidad y bioactividad del anticuerpo, particularmente en concentraciones altas de anticuerpos y controlar el índice de degradación de anticuerpos para proporcionar una vida útil aceptable para el transporte y almacenamiento en todo el mundo.

Para prevenir la formación de agregados que pueden causar inmunogenicidad indeseable o vida media alterada, las formulaciones farmacéuticas de anticuerpos contienen normalmente uno o más tampones para mantener un intervalo de pH dado y un agente isotonzante para proporcionar una osmolaridad similar a los líquidos fisiológicos. Se ha demostrado que una variedad de excipientes de formulación estabilizan los anticuerpos en diferentes condiciones de procesamiento y durante el almacenamiento, incluyendo azúcares, polioles, aminoácidos y tensioactivos (Paborji M et al., 1994; Sarno MEC et al 1999). Debido a que la agregación depende en gran medida de la concentración de anticuerpo y del pH de la formulación, la selección de un sistema tampón adecuado es una etapa crucial hacia una formulación estable, especialmente con respecto a formulaciones de anticuerpos monoclonales altamente concentradas adecuadas para administración subcutánea (sc) como en el caso del anticuerpo anti-TNF $\alpha$  Adalimumab (HUMIRA®, AbbVie Inc; 50mg/mL), que se formula en un tampón de citrato y fosfato (documento WO2004/016286). Las desventajas de los sistemas de tampones que comprenden citrato y/o fosfato son bien conocidas en la técnica dirigidas al dolor en el sitio de inyección por tampón de citrato (Kappelgaard A 2004, Frenken et al., 1993) y tampón de fosfato (Fransson et al., 1996) e inestabilidad de pH de los tampones a base de fosfato tras la congelación (Kolhe P et al., 2010). La estabilidad y la seguridad del producto farmacéutico depende, por lo tanto, del tipo y la concentración de un agente tampón.

En cuanto a las enfermedades crónicas, tales como la artritis reumatoide, la psoriasis o la colitis ulcerosa, donde la medicación finalmente tiene que ser administrada a lo largo de la vida y donde la automedicación es deseable con respecto a la conformidad del paciente y la reducción de costes, la administración subcutánea es la vía de administración preferida. Sin embargo, debido a la contrapresión del tejido y el dolor en el sitio de inyección, la administración de fármaco por vía sc se limita a un volumen de inyección de 1 ml hasta 1,5 ml (Gatlin LA y Gatlin CAB 1999). Los productos de anticuerpos monoclonales aprobados para el tratamiento de artritis reumatoide, psoriasis o colitis ulcerosa como HUMIRA® requieren dosis clínicas relativamente altas (5-700 mg por paciente, administradas ya sea como dosis fija o en base al peso corporal (kg) o la superficie corporal (m<sup>2</sup>), (Roskos LK et al., 2004).

Para abordar estos requisitos con particular atención a la adecuabilidad para la autoadministración a lo largo de toda la vida y para la explotación completa de la potencia clínica de un anticuerpo como Adalimumab, existe la necesidad de desarrollar formulaciones farmacéuticas acuosas líquidas de anticuerpos de alta concentración con estabilidad de almacenamiento mejorada. La presente invención se refiere a la necesidad identificada anteriormente proporcionando nuevas formulaciones farmacéuticas muy concentradas de Adalimumab con mayor estabilidad dentro de recipientes farmacéuticos adecuados (dispositivos de autoinyección) que superen los inconvenientes de las formulaciones conocidas de la técnica anterior.

### Descripción resumida de la invención

La presente invención se refiere a las realizaciones caracterizadas en las reivindicaciones y describe una formulación farmacéutica acuosa líquida estable que está libre de un tampón de fosfato y comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de Adalimumab en una solución tamponada que comprende L-Histidina y citrato, en la que la formulación farmacéutica acuosa líquida estable tiene un pH de 5 a 5,5, en la que la concentración de Adalimumab es de 50 mg/l y la formulación comprende además un poliol y un tensioactivo que es un polisorbato.

La base de la presente invención es la observación de que composiciones farmacéuticas acuosas líquidas de Adalimumab que están libres o sustancialmente libres de un tampón fosfato y que se formulan en sistemas tampón basados en L-histidina muestran una mayor estabilidad a largo plazo en cuanto a la formación de agregados y la generación de especies ácidas.

Tal como se muestra mediante un análisis HP-SEC y se demuestra en las Tablas que se refieren en los Ejemplos y las Figuras, las formulaciones farmacéuticas libres de tampón de fosfato de Adalimumab, tal como se describe por la presente invención, son ventajosas sobre la formulación de referencia farmacéutica de Adalimumab basada en tampón de citrato-fosfato compuesta de acuerdo con la formulación del producto comercializado HUMIRA®. En particular, las formulaciones farmacéuticas de Adalimumab de la presente invención que se tamponaron con histidina-citrato fueron más estables que la formulación de referencia de Adalimumab tamponada con citrato y fosfato (#01).

Más realizaciones de la presente invención serán evidentes a partir de la descripción y ejemplos a continuación. En este contexto, se utilizan formulaciones farmacéuticas de Adalimumab tamponadas con histidina-acetato y se describen únicamente con fines ilustrativos.

### Breve descripción de las figuras

**Figura 1:** Contenido de agregado de las formulaciones alternativas de Adalimumab con relación a la formulación o formulaciones de referencia (ID de muestra NO: #01 - #03, para un resumen detallado de los componentes del tampón ver las Tablas 11 y 13). La estabilidad de las formulaciones de Adalimumab ensayadas con respecto a la formación de agregados medida por HP-SEC durante el almacenamiento a 5°C (A-C) y 25°C (D-E) durante un período de 6 meses se muestra como porcentaje relativo de áreas de picos agregados. Los ID de muestra NO: #01, #04, #07 y #10 representan datos de formulaciones sin aditivos (A, D), ID de muestra NO: #02, #05, #08 y #11 representan datos de formulaciones que contienen EDTA (B, E) y los ID de muestra NO: #03, #06, #09 y #12 representan datos de formulaciones que contienen L-Arginina (L-Arg) (C, F; sólo datos de estabilidad de 3 meses disponibles para las formulaciones que contienen L-Arg). Las formulaciones de Adalimumab tamponadas con histidina-citrato (ID de muestra NO: #07) e histidina-acetato (ID de muestra NO: #10) aparentemente tienen una menor velocidad de agregación en comparación con las formulaciones de referencia basadas en citrato-fosfato. De todas las formulaciones de Adalimumab probadas aquellas basadas en tampón de citrato solo son las más propensas a la agregación. Ni la adición de EDTA (ID de muestra NO: #02, #05, #08 y #11) ni de L-Arginina (ID de muestra NO: #06, #09, #12, L-Arg determinada después de 3 meses) tiene un efecto preventivo o estabilizador sobre la formación de agregados en las formulaciones alternativas. En conclusión, la formulación farmacéutica de Adalimumab tamponada con histidina-acetato (seguido por histidina-citrato de la presente invención) es una alternativa más estable a la formulación de Adalimumab disponible en el mercado.

**Figura 2:** Contenido de agregados de formulaciones alternativas de Adalimumab en condiciones de estrés (55°C) con relación a la formulación de referencia. La formación de agregados al calentar a 55°C se evaluó en formulaciones sin aditivos (B, ID de muestra NO: #01, #04, #07 y #10) y con EDTA (C, ID de muestra NO: #02, #05, #08 y #11) utilizando HP-SEC. (A). El contenido de agregados se muestra como porcentajes de área (columnas de la izquierda). Las columnas de la derecha (designadas con Δ) representan las diferencias de la muestra en el tampón de la formulación o formulaciones de referencia (#01 y #02) para los resultados iniciales y la diferencia con respecto al resultado inicial (cambio debido al estrés) para las muestras estresadas, respectivamente (A, B). Entre todas las formulaciones de Adalimumab probadas, la formulación farmacéutica #10 tamponada con histidina-acetato sin un estabilizante adicional mostró la estabilidad más alta, es decir, el índice de agregación más baja a 55°C (A, C). La adición de EDTA a esta combinación de tampones aumenta aparentemente la formación de agregados en la formulación respectiva mientras se calienta a 55°C (#11). La formulación farmacéutica de Adalimumab tamponada con histidina-citrato y que comprende EDTA (#08) muestra una estabilidad similar a 55°C.

**Figura 3:** Contenido de impurezas/especies ácidas de formulaciones alternativas de Adalimumab en relación con la formulación o formulaciones de referencia (ID NO: #01-#03), para un resumen detallado de los componentes del tampón, ver Tablas 15 y 17). La estabilidad de las formulaciones de Adalimumab probadas con respecto a la formación de especies ácidas medidas por SCX-HPLC durante el almacenamiento a 5°C (A-C) y 25°C (D-F) durante un período de 6 meses se muestra cómo el % relativo de áreas de los picos de impurezas ácidas. Los ID de muestra NO: #01, #04, #07 y #10

representan datos de formulaciones sin aditivos (A, D), los ID de muestra NO: #02, #05, #08 y #11 representan datos de formulaciones que contienen EDTA (B, E) y los ID de muestra NO: #03, #06, #09 y #12 representan datos de formulaciones que contienen L-Arginina (L-Arg) (C, F; sólo datos de estabilidad de 3 meses disponibles para formulaciones que contienen L-Arg). Todas las formulaciones farmacéuticas alternativas de Adalimumab probadas almacenadas a 5°C tienen niveles aparentemente ligeramente más bajos de impurezas ácidas que las formulaciones de referencia que comprenden tampón de citrato-fosfato, sin embargo, las diferencias no son significativas. Los estudios de estabilidad a 25°C revelaron que las formulaciones basadas en histidina-acetato e histidina-citrato muestran niveles significativamente más bajos de impurezas ácidas tras el almacenamiento durante 6 meses en comparación con las formulaciones basadas en el tampón de referencia (al menos durante 3 meses en el caso de las formulaciones que contienen L-Arg, respectivamente). La formulación farmacéutica de Adalimumab probada tamponada con histidina-acetato (#10) tiene la mayor pureza relativa (nivel 3,1% menor de impurezas/especie ácidas en comparación con la formulación de referencia, mientras que las formulaciones de Adalimumab basadas en tampón de citrato solo (#04) mostraron la cantidad más alta de especies ácidas. Ni la adición de EDTA (ID de muestra NO: #02, #05, #08 y #11) ni de L-Arginina (ID de muestra NO: #03, #06, #09, #12; L-Arg determinada después de 3 meses) tienen un efecto preventivo o estabilizador sobre la formación de impurezas ácidas en las formulaciones alternativas.

**Figura 4:** Contenido de especies ácidas de formulaciones alternativas de Adalimumab en condiciones de estrés (55°C) con relación a la formulación de referencia. La generación de impurezas ácidas es la principal vía de degradación por desamidación. El contenido de impurezas ácidas tras el calentamiento a 55°C se evaluó en formulaciones de Adalimumab sin aditivos (B, ID de muestra NO: #01, #04, #07 y #10) y con EDTA (C, ID de muestra NO: #02, #05, #08 y #11) utilizando SCX-HPLC (A). El contenido de impurezas ácidas se muestra como porcentajes de área (columnas de la izquierda). Las columnas de la derecha (designadas con  $\Delta$ ) representan las diferencias de la muestra en el tampón del producto de referencia (#01, #02) para los resultados iniciales y la diferencia con respecto al resultado inicial (cambio debido al estrés) para las muestras estresadas, respectivamente (A, B). Entre todas las formulaciones farmacéuticas de Adalimumab probadas, la formulación tamponada con histidina-acetato sin un estabilizador adicional (ID de muestra NO: #10) mostró la mayor estabilidad, es decir, el índice de formación de especies ácidas más bajo a 55°C (A-C). Todas las formulaciones restantes de Adalimumab muestran índices de degradación similares al factor de estrés investigado.

**Figura 5:** Actividad biológica de formulaciones alternativas de Adalimumab en condiciones de estrés relativas al tiempo y la formulación de referencia, respectivamente. Se comparó el efecto de la inhibición de la muerte celular por la solución de referencia y los ID de muestra de ensayo NO: #01, #07, #09, #10 y #12 en células L929 tratadas con TNF $\alpha$  y Actinomicina-D bajo diferentes condiciones de estrés, es decir, después de 3 meses a 5°C y 25°C, después de 6 meses a 5°C y 25°C, después de un ciclo de congelación-descongelación, después de un estrés mecánico, así como después de un estrés térmico a 55°C (A, B). En comparación con el punto en el tiempo 0, la formulación tamponada con histidina-acetato sin un estabilizador adicional (ID de muestra NO: #10) mostró la mayor capacidad para neutralizar TNF $\alpha$  después de 6 meses a 5°C y 25°C, seguido de la formulación tamponada con histidina-acetato con L-Arg (ID de muestra NO: #12). Además, la formulación tamponada con histidina-acetato con L-Arg (ID de muestra NO: 12) mostró el mejor rendimiento después de 3 meses a 5°C y 25°C, después de un ciclo de congelación-descongelación, así como de estrés mecánico. La formulación tamponada con histidina-citrato sin estabilizador adicional (ID de muestra NO: #07) mostró la mayor neutralización de TNF $\alpha$  después de 6 meses a 5°C, así como después de un estrés térmico a 55°C. Todas las formulaciones restantes de Adalimumab muestran índices similares de degradación al factor de estrés investigado (A, C). En comparación con la formulación de referencia, la formulación tamponada con histidina-acetato sin estabilizante adicional (ID de muestra NO: #10) mostró la mayor capacidad para neutralizar el TNF $\alpha$  después de 6 meses a 5°C y 25°C, seguido de histidina-citrato (ID de muestra NO: #07) después de 6 meses a 5°C. La formulación de tampón de histidina-acetato con L-Arg (ID de muestra NO: #12) mostró el mejor rendimiento general a todos los factores de estrés investigados. Los experimentos resumidos en la figura 5 se realizaron con un segundo lote de formulaciones alternativas de Adalimumab.

#### Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere generalmente a formulaciones farmacéuticas estables a largo plazo de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , en particular Adalimumab, basadas en sistemas de tampón de histidina, tal como se caracteriza en las reivindicaciones. Más particularmente, de acuerdo con la presente invención, se proporcionan formulaciones farmacéuticas de Adalimumab libres de tampón de fosfato, que se tamponan con tampón de histidina-citrato y muestran una estabilidad mejorada tras el almacenamiento a 25°C durante un período de al menos tres a seis meses en comparación con una formulación farmacéutica de Adalimumab de referencia basada en tampón de citrato-fosfato, compuesta de acuerdo con la formulación del producto comercializado HUMIRA®.

La presente invención se basa en la observación de que las formulaciones farmacéuticas acuosas líquidas de Adalimumab que están libres o sustancialmente libres de un tampón de fosfato y que están formuladas en sistemas de tampón basados en L-histidina proporcionan formulaciones farmacéuticas de Adalimumab adecuadas alternativas con una estabilidad a largo plazo incrementada en cuanto a la formación de agregados y generación de especies ácidas; ver los Ejemplos 5 a 9

5 y las figuras 1 a 5. Anteriormente, se han sugerido sistemas de tampón alternativos para formulaciones de Adalimumab que comprenden, entre otros, histidina sola o en combinación con otros componentes de tampón tales como acetato, citrato y fosfato; ver Bender "Alternative buffers for pharmaceutical anti-TNFalpha monoclonal antibody formulations" (www.technik2day.net, publicado el 06 de febrero de 2013, número de publicación PAPDEOTT002384). Sin embargo, no hay datos ni indicaciones sobre la estabilidad de ninguna formulación de Adalimumab tamponada con histidina, que pudiera constituir el punto de partida para el desarrollo de formulaciones farmacéuticas estables a largo plazo de Adalimumab, es decir, una formulación concreta a partir de la cual se pudieran extrapolar formulaciones tamponadas con histidina más genéricas.

10 De hecho, hasta ahora, las soluciones tampón acuosas combinadas que incluyen histidina y por ejemplo, acetato o citrato, han sido descartadas como no adecuadas o inferiores en comparación con la histidina como único componente tampón o en combinación con otras. Por ejemplo, en la solicitud internacional WO2014/039903 en la página 88 y 89 en la Tabla H y H1, entre varias otras dos formulaciones, la formulación 6 y 10 de un Adalimumab patentado biosimilar con histidina-acetato e histidina-citrato se describen en un ensayo de estabilidad a corto plazo durante sólo una y dos semanas y no se tiene en cuenta para una investigación adicional de una formulación farmacéutica. En cambio, el documento  
15 WO2014/039903 enseña evitar, por ejemplo, citrato, pero para usar histidina solamente o en combinación con un tampón de succinato. Sin embargo, en una realización, la formulación farmacéutica de la presente invención no consiste en una formulación de acuerdo con la formulación 6 o 10 en la Tabla H y H1 en la página 88 y 89 de la WO2014/039903. De forma similar, en la solicitud internacional más reciente WO 2014/114651 se enseña la histidina como el único componente  
20 tampón para formular Adalimumab en una composición farmacéutica, evitando al mismo tiempo el acetato y el citrato.

Por lo tanto, sólo gracias al trabajo diligente y a los experimentos realizados de acuerdo con la presente invención se pudieron determinar los parámetros suficientes y necesarios para obtener una formulación de anticuerpo estable a largo  
25 plazo con base en un tampón de histidina combinado, es decir, la interacción de histidina con un segundo componente tampón, en particular citrato, el valor de pH y la cantidad/concentración del anticuerpo, en particular Adalimumab en la formulación.

Por consiguiente, la presente invención se refiere a una formulación farmacéutica acuosa líquida estable que está libre de un tampón de fosfato y comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de Adalimumab en una solución tamponada que  
30 comprende L-Histidina y citrato que tiene un pH de aproximadamente 5 a 5,5 que se selecciona del grupo que consiste en:

(a) una formulación farmacéutica acuosa líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de Adalimumab en una solución tamponada que comprende L-Histidina y citrato, teniendo dicha formulación un pH de 5 a 5,5 y un contenido de especies agregadas de Adalimumab después del almacenamiento a 5°C durante 3 a 6 meses de menos  
35 de 5%, ver el Ejemplo 5 y las figuras 1A-C;

(b) una formulación farmacéutica acuosa líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de Adalimumab en una solución tamponada que comprende L-Histidina y citrato, teniendo dicha formulación un pH de 5 a 5,5 y un contenido de especies agregadas de Adalimumab después del almacenamiento a 25°C durante 3 a 6 meses de menos de 5%, ver el Ejemplo 5 y las figuras 1D-F;

(c) una formulación farmacéutica acuosa líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de Adalimumab en una solución tamponada que comprende L-Histidina y citrato, teniendo dicha formulación un pH de 5 a 5,5 y un contenido de especies ácidas de Adalimumab después del almacenamiento a 25°C durante 3 a 6 meses de menos de 40%, ver el Ejemplo 7 y las figuras 3D-F;

(d) una formulación farmacéutica acuosa líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de Adalimumab en una solución tamponada que comprende L-Histidina y citrato, teniendo dicha formulación un pH de 5 a 5,5 y un contenido de especies agregadas de Adalimumab en condiciones de estrés térmico a 55°C de menos de 5%, ver el  
45 Ejemplo 6 y la figura 2;

(e) una formulación farmacéutica acuosa líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de Adalimumab en una solución tamponada que comprende L-histidina y citrato, teniendo dicha formulación un pH de 5 a 5,5 y un contenido de especies ácidas de Adalimumab en condiciones de estrés térmico a 55°C de menos de 40%, preferiblemente menos de 35%, ver el Ejemplo 8 y la figura 4;

(f) una formulación farmacéutica acuosa líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de Adalimumab en una solución tampón que comprende L-Histidina y citrato, teniendo dicha formulación un pH de 5 a 5,5 y reteniendo una actividad en términos de neutralización de TNF $\alpha$  de al menos el 80%, preferiblemente el 85%, más preferiblemente el 90%, lo más preferiblemente el 95% después de almacenamiento de 6 meses a una temperatura de  
50 aproximadamente 5°C y/o 25°C, y/o después de ser sometida a condiciones de estrés térmico a 55°C, condiciones de congelación-descongelación de -20°C a 5°C y/o tensión mecánica; ver el Ejemplo 9, así como la figura 5, en la que la concentración de Adalimumab es 50 mg/ml.

60 Las características antes mencionadas de la formulación de tener un cierto nivel de especies agregadas y/o ácidas del anticuerpo y/o tener una estabilidad mejorada durante aproximadamente 3 a 6 meses se determinará de acuerdo con los

Ejemplos y, a menos que se indique lo contrario, en comparación con la formulación de referencia de Adalimumab mostrada en la Tabla 6. Con respecto al periodo de tiempo, la característica se puede cumplir si el nivel de especies agregadas y/o ácidas del anticuerpo y/o estabilidad mejorada de la formulación en valores absolutos y/o en comparación con la formulación de referencia se proporciona durante 3, 4, 5 y/o 6 meses. Preferiblemente, la característica se cumple para el término de 3 meses, lo más preferiblemente en adición o alternativamente para el término de 6 meses. Además, la formulación farmacéutica de la presente invención puede cumplir una, dos, tres, cuatro, cinco o seis de cualquiera de las características (a) a (e) y opcionalmente (f) en cualquier combinación o todas. Adicional o alternativamente, la formulación farmacéutica de la presente invención, en particular con respecto a la característica (f), puede presentar un perfil de estabilidad que es prácticamente idéntico o muy similar a los perfiles indicados en cualquiera o en todas las figuras 1 a 5 para formulaciones con ID NO (#0...): 7, 8, 9, 10, 11 o 12. El término "altamente similar" significa que los valores de estabilidad de una formulación farmacéutica de un anticuerpo anti-TNF $\alpha$ , preferiblemente Adalimumab, basada en un sistema tampón de dos componentes que comprende histidina, cuando se analiza para cualquiera de las características mencionadas anteriormente (a) a (e) y opcionalmente (f), especialmente con respecto a la formulación de referencia de acuerdo con los ejemplos adjuntos no difieren de los valores (relativos) para las formulaciones con ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 o 12 en más de 50%, preferiblemente no más de 40%, más preferiblemente no más de 30%, todavía más preferiblemente no más de 20% y lo más preferiblemente no más de 10% o 5%. No hace falta decir que típicamente se comparan los valores de una formulación farmacéutica de anticuerpos candidata con los de una formulación farmacéutica de ID NO: 7, 8, 9, 10, 11 o 12 que tiene la mayoría de los ingredientes en común con la formulación farmacéutica candidata.

En una realización, la formulación farmacéutica de la presente invención comprende además un poliol, preferiblemente manitol; un tensioactivo, preferiblemente Polisorbato 80; y/o una sal alcalina, preferiblemente cloruro de sodio.

Tal como se usa en el presente documento, "formulación farmacéutica" se refiere a una formulación de un ingrediente farmacéuticamente activo, tal como una proteína biológicamente activa (por ejemplo, anticuerpo anti-TNF $\alpha$  Adalimumab) que es útil para tratar una enfermedad o trastorno y que es adecuada para administración parenteral, (que incluye, pero no se limita a la administración intravenosa, intramuscular o subcutánea) y/o inyección en un paciente humano que lo necesite.

La "formulación farmacéutica" tal como se menciona en la presente invención se prepara para que permita que el ingrediente activo sea eficaz e incluya sólo excipientes, diluyentes y otros aditivos farmacéuticamente aceptables considerados seguros por las autoridades reguladoras y que no contengan componentes adicionales que sean tóxicos para los sujetos a los que se administraría la formulación.

Tal como se utiliza en la presente descripción, la frase "formulación farmacéutica acuosa líquida" se refiere a una formulación farmacéutica como se ha definido anteriormente en estado líquido usando agua como disolvente y que comprende un fármaco farmacéuticamente activo en combinación con uno o más excipientes. En una realización adicional, la formulación farmacéutica acuosa líquida de la presente invención es una formulación farmacéutica como la definida anteriormente que mantiene la estabilidad tras el almacenamiento (por ejemplo, estabilidad química y/o física y/o actividad biológica) sin necesidad de liofilización, secado por pulverización y/o congelación.

Las frases "libre" o "sustancialmente libre" tal como se utiliza a lo largo de la descripción de la presente invención indican la exclusión de cualesquiera de los elementos o grupo de elementos citados y la inclusión opcional de otros elementos, de naturaleza similar o diferente a los elementos citados, que no cambian materialmente las propiedades básicas o novedosas del régimen de dosificación, método o composición especificados.

En un sentido farmacológico, en el contexto de la presente invención, una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" de un anticuerpo se refiere a una cantidad eficaz en la prevención o tratamiento de un trastorno para el tratamiento del cual el anticuerpo es eficaz.

Tal como se utiliza en la presente descripción, el término Adalimumab se refiere al anticuerpo monoclonal IgG1 recombinante totalmente humano que se une al TNF-alfa humano (hTNF $\alpha$ ) y que está registrado en el Servicio de Chemical Abstracts (CAS) bajo el número de registro 331731-18-1. Adalimumab consiste en 1330 aminoácidos y tiene un peso molecular de 148 kDa que puede variar dependiendo de la glicosilación de la molécula. Se produce mediante tecnología de ADN recombinante en células de ovario de hámster chino (CHO). Se derivó del anticuerpo monoclonal murino MAK195 utilizando la expresión en fagos de selección guiada. El clon madurado por afinidad completamente humano (clon ID: D2E7) comprende regiones variables de cadena pesada y ligera derivadas de humanos, cuyas secuencias de aminoácidos se describen en la patente de EE.UU. No. 6,090,382 correspondiente a la solicitud internacional WO97/29131 y una región constante kappa de IgG1 humana. Cada molécula de anticuerpo IgG1 comprende dos cadenas ligeras kappa y dos cadenas pesadas de IgG1 humana. Cada cadena ligera consiste en 214 residuos de aminoácidos y cada cadena pesada consiste en 451 residuos de aminoácidos. El Adalimumab se une específicamente a TNF $\alpha$  y neutraliza la función biológica del TNF mediante el bloqueo de su interacción con los receptores de TNF de la superficie celular p55 y p75. Adalimumab

es comercializado por Abbott Laboratories US (ahora AbbVie Inc US) como una formulación farmacéutica líquida para administración subcutánea bajo el nombre comercial HUMIRA®; ver también la solicitud internacional WO2004/016286. Adalimumab fue aprobado por la Administración de Alimentos y Medicamentos de los Estados Unidos (FDA) en 2002 y por la Agencia Europea del Medicamento (EMA) en 2003 para el tratamiento de la artritis reumatoide. Desde entonces recibió la aprobación adicional para el tratamiento de otras enfermedades inflamatorias crónicas mediadas por TNF, incluyendo artritis psoriásica, artritis idiopática poliarticular juvenil, psoriasis, psoriasis en placa, espondilitis anquilosante (AS), espondiloartritis axial, espondiloartritis axial sin evidencia radiográfica de AS, enfermedad de Crohn, enfermedad de Crohn pediátrica y colitis ulcerosa. Adalimumab se puede usar solo o en combinación con metotrexato (MTX) u otros fármacos antirreumáticos modificadores de la enfermedad no biológicos (DMARD). Para el tratamiento de enfermedades reumatoides, Adalimumab se administra típicamente por inyección subcutánea a 40 mg cada una o dos semanas. Se suministra en viales de vidrio, jeringas de vidrio precargadas y como dispositivo de autoinyección (pluma HUMIRA®), como una solución estéril, sin conservantes, para administración subcutánea. La solución de HUMIRA® es transparente e incolora con un pH de aproximadamente 5,2. Las jeringas precargadas y el autoinyector (pluma) comprenden 40 mg de Adalimumab en 0,8 ml de una solución tamponada de manitol, ácido cítrico monohidratado, citrato de sodio, fosfato disódico dihidratado, fosfato monosódico dihidratado, cloruro de sodio y Polisorbato 80.

Además, el término "Adalimumab", tal como se usa en la presente invención, también incluye proteínas que son "biosimilares" a Adalimumab de acuerdo con la definición de trabajo declarada en las directrices publicadas por la FDA y la EMA que definen un producto biosimilar como uno que es "altamente similar" a un producto de referencia a pesar de las diferencias menores en los componentes clínicamente inactivos ("Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revisión 1)", EMA/CHMP/BWP/247713/2012) a partir del 22.05.2014, "Guidance for Industry – Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a reference Product" (DRAFT GUIDANCE), Departamento de Salud y Servicios Humanos de los Estados Unidos, Administración de Alimentos y Medicamentos a partir de febrero de 2012). En la práctica, no puede haber diferencias clínicamente significativas entre el producto de referencia y el producto biosimilar en términos de seguridad, pureza y potencia (Ley de Servicio de Salud Pública (PHS) §262). En otras palabras, una forma/proteína biosimilar de Adalimumab es un anticuerpo que una autoridad reguladora considera "altamente similar" al producto de referencia HUMIRA® basada en una presentación reglamentaria abreviada.

En una realización, la proteína biosimilar de Adalimumab de la presente invención y el producto de referencia HUMIRA® utilizan el mismo mecanismo o mecanismos de acción para la condición o condiciones de uso prescritas, recomendadas o sugeridas en el etiquetado propuesto, pero sólo en la medida en que el mecanismo o mecanismos de acción son conocidos para el ingrediente farmacéutico activo de HUMIRA®.

En otra realización, la condición o las condiciones de uso prescritas, recomendadas o sugeridas para la proteína biosimilar de Adalimumab de la presente invención son las mismas que se proporcionan en la información del Resumen de Características de Producto (SMPC) e información de la etiqueta para HUMIRA® según lo aprobado por la EMA y la FDA, respectivamente. En una realización, la ruta de administración, la forma de dosificación y/o la resistencia de la proteína biosimilar de Adalimumab de la presente invención son las mismas que se recomiendan en la información del Resumen de Características de Producto (SMPC) e información de la etiqueta para HUMIRA®, aprobadas por la EMA y la FDA, respectivamente.

Tal como se utiliza en la descripción de la presente invención, el término "producto de referencia" se refiere al anticuerpo anti-TNF $\alpha$  Adalimumab aprobado por FDA/EMA comercialmente disponible de Abbott/AbbVie que se comercializa como "formulación de alta concentración" para administración subcutánea bajo el nombre comercial HUMIRA®. La formulación farmacéutica líquida comprende 50 mg/ml de Adalimumab tamponado con citrato-fosfato (dihidrogenofosfato de sodio dihidratado, fosfato disódico dihidratado, citrato de sodio, ácido cítrico monohidratado) a aproximadamente pH 5,2 y contiene además cloruro de sodio, manitol, polisorbato 80 y agua inyectable; ver la solicitud internacional WO2004/016286.

Los términos "formulación farmacéutica de referencia" o "formulación de referencia" tal como se usan en la descripción de la presente invención se refieren a una formulación farmacéutica que comprende anticuerpo anti-TNF $\alpha$  Adalimumab formulado con un sistema tampón citrato-fosfato como se describe en el Ejemplo 1 (Tabla 6, ID NO: #01, #02, #03) de la presente invención. Por consiguiente, el término "tampón de referencia" tal como se utiliza en toda la presente invención, se refiere al sistema tampón que comprende citrato y fosfato dentro de la composición y concentraciones de la formulación de referencia como se ha definido anteriormente.

El término "anticuerpo anti-TNF alfa" o "anticuerpo anti-TNF $\alpha$ " tal como se utiliza en la presente invención se refiere a anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos (fragmentos Fab y/o (Fab)<sub>2</sub>, fragmentos Fv, fragmentos Fv de cadena sencilla (scFv) y similares), así como a las proteínas de fusión Fc dirigidas contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$  humano, hTNF $\alpha$ , hTNF $\alpha$ , TNF $\alpha$ ), una citoquina humana que existe como una forma secretada de 17 kDa y una forma asociada a la membrana de 26 kDa, cuya forma biológicamente activa está compuesta por un trímero de moléculas

de 17 kDa no unidas covalentemente (Pennica D et al., 1984). En una realización particular, el término "anticuerpo anti-TNF alfa" o "anticuerpo anti-TNF $\alpha$ " tal como se utiliza en la presente invención se refiere a Adalimumab (CAS No. 331731-18-1) como se define por las regiones variables de la cadena pesada y ligera de la secuencia de aminoácidos como las descritas en la patente de EE.UU. No. 6,090,382 y en la solicitud internacional WO97/29131, respectivamente, y formas/proteínas biosimilares de Adalimumab. Por ejemplo, se describen en la solicitud internacional WO 2014/114651 variantes de anticuerpos anti-TNF, tales como Adalimumab, que se dice que muestran un aumento de la unión al receptor FcRn o una vida media aumentada en comparación con el anticuerpo original. El factor de necrosis tumoral alfa está implicado en procesos de inflamación sistémica, responsable de muchas de las manifestaciones clínicas asociadas con trastornos autoinmunes, tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, hidradenitis supurativa, colitis ulcerosa y asma refractaria.

Los experimentos realizados de acuerdo con la presente invención mostraron que una formulación farmacéutica acuosa líquida que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de Adalimumab en una solución tampón que comprende L-Histidina y citrato con un pH de 5 a 5,5 es capaz de neutralizar la actividad biológica de TNF $\alpha$  de aproximadamente 80%, preferiblemente de aproximadamente 85%, más preferiblemente de aproximadamente 90%, lo más preferiblemente de aproximadamente 95% después de almacenamiento de 6 meses a una temperatura de aproximadamente 5°C y/o 25°C, y/o después de haber sido sometida a estrés térmico a 55°C, condiciones de congelación-descongelación de -20°C a 5°C y/o tensión mecánica. En otras palabras, el Adalimumab formulado en una formulación farmacéutica acuosa líquida de la presente invención, incluso después de varias condiciones de almacenamiento y de estrés, conserva sustancialmente su actividad de reducción de la actividad biológica de TNF $\alpha$ , tal como se describe en el Ejemplo 9, hasta al menos 80% o más en comparación con un control no sometido a dichas condiciones o es aún capaz de anular completamente la actividad biológica de TNF $\alpha$ . Por ejemplo, la formulación tampón de histidina-citrato sin estabilizantes adicionales (ID de muestra NO: #07) se puede almacenar durante 6 meses a 5°C o 25°C y todavía es capaz de neutralizar más de 90% de TNF $\alpha$ , mientras que la adición de L-Arg (ID de muestra NO: #09) a la formulación de tampón de histidina-citrato mejora adicionalmente su estabilidad a congelación-descongelación y estabilidad de estrés mecánico. De hecho, como se puede deducir del Ejemplo 9 y de la figura 5C, cada formulación de Adalimumab de la presente invención es superior sobre la formulación de referencia de Adalimumab en al menos una de las condiciones de almacenamiento y de estrés ensayadas.

Las condiciones de almacenamiento y de estrés, incluidas las condiciones de congelación-descongelación, las condiciones de estrés térmico y estrés mecánico, es decir, los estudios de agitación, se describen en los Ejemplos. Por ejemplo, el estrés térmico se puede aplicar sometiendo la muestra a una temperatura de aproximadamente 5°C y/o 25°C y/o después de haber sido sometida a un estrés térmico a 55°C durante 10 minutos, las muestras se congelan de 5°C a -20°C en 30 minutos y se mantiene a -20°C durante 1 hora, después se descongela de -20°C a 5°C en 2 horas, repitiéndose el ciclo de congelación y descongelación 5 y 10 veces y el estrés mecánico puede aplicarse agitando las muestras durante 24 horas a 25°C en un agitador plano con una velocidad de agitación de 400 RPM. La concentración de Adalimumab en la formulación de ensayo es sustancialmente la misma que se usó en los Ejemplos, es decir, 50 mg/ml. La actividad neutralizante de TNF $\alpha$  de una formulación farmacéutica acuosa líquida de la presente invención se determina preferiblemente como se ilustra en los Ejemplos, es decir, mediante el efecto de inhibir la muerte celular de células L929 tratadas con TNF $\alpha$  y Actinomicina-D en el tiempo y/o en comparación con la formulación de referencia de Adalimumab mostrada en la Tabla 6, mientras que varias diluciones de una formulación farmacéutica acuosa líquida de la presente invención se preparan como se describe en el Ejemplo 9.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "excipiente" incluye ingredientes terapéuticamente inactivos de la formulación farmacéutica de la presente invención. Dependiendo de sus propiedades individuales, los excipientes se pueden incluir en una formulación farmacéutica para una amplia variedad de propósitos, por ejemplo, agentes tampóns para controlar el pH, carbohidratos como agentes de carga para la liofilización, polímeros para aumentar la viscosidad de la solución, sales o azúcares para estabilizar proteínas y actúan como agentes de tonicidad para obtener tonicidad y osmolaridad fisiológicas, tensioactivos para inhibir la adsorción de proteínas a las interfases, conservantes para prevenir el crecimiento microbiano, antioxidantes, crioprotectores o diluyentes. Se ha demostrado que una variedad de excipientes de formulación estabilizan anticuerpos, en diferentes condiciones de procesamiento y durante el almacenamiento, incluyendo azúcares, tales como sacarosa, lactosa o dextrosa, polioles (también conocidos como alcoholes de azúcar), tales como manitol o sorbitol, sales, tales como cloruro de sodio, aminoácidos, tales como arginina, histidina, lisina, ácido aspártico o ácido glutámico, tensioactivos y agua como disolvente (Paborji M et al., 1994), Samo MEC et al., 1999).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tampón" o "solución tamponada" se refieren a una solución acuosa que consiste en una mezcla de un ácido débil y su base conjugada o una base débil y su ácido conjugado que resiste los cambios en el pH. Es bien sabido que tanto el tipo como la concentración de un agente tampón pueden tener un impacto sobre la estabilidad de las proteínas (Wang W 1999). Por lo tanto, la selección del agente tampón es crucial para conseguir el control del pH y la estabilización deseada de las formulaciones de anticuerpos. En cuanto a la agregación de anticuerpos, la elección de un sistema tampón adecuado y el pH juegan un papel crítico, ya que determina la carga neta de la estructura de la proteína/anticuerpo y las interacciones electrostáticas posteriores (Chi EY et al., 2003) con

relación a la acidez o basicidad crecientes de la solución. La repulsión de carga creciente entre los grupos cargados dentro del anticuerpo en solución puede desestabilizar su estado plegado o nativo (Vermeer AWP y Norde W 2000). En general, las condiciones débilmente ácidas (pH 4,5-5,5) parecen ser las óptimas para la mayoría de los anticuerpos, ya que la agregación aumenta cerca del pH neutro o cerca del punto isoeléctrico (pI) (Moore JM et al. 1999, Szenczi A et al. 2006, Wan HZ et al., 2001). En general es aconsejable distinguir el valor de pH de la formulación en más de una unidad del punto isoeléctrico de la proteína. Los anticuerpos IgG de mamíferos tienen típicamente pI relativamente altos en el intervalo de pH 6-9. Por lo tanto, la mayoría de los valores de pH de la formulación se eligen en un intervalo ácido (pH 4-6), con el fin de mantener el anticuerpo en un estado catiónico más soluble.

La "formulación de concentración alta" líquida (50 mg/ml) para la administración subcutánea del fármaco anti-inflamatorio Adalimumab actualmente en el mercado (HUMIRA®, AbbVie Inc, WO2004/016286) se tamponó con citrato y fosfato a pH 5,2. Los inconvenientes de las formulaciones farmacéuticas basadas en sistemas tampón que comprenden citrato y/o fosfato son bien conocidos en la técnica con vista al dolor del sitio de inyección inducido por el tampón de citrato (Kappelgaard A 2004, Frenken et al., 1993) y tampón de fosfato (Fransson et al., 1996). En algunos casos, se ha demostrado que el tampón de fosfato es perjudicial. Por ejemplo, el tampón de fosfato aceleró la desamidación de una IgG1 relativa a tampón de citrato tanto a pH 6,5 como a 7,0 durante el almacenamiento a 25°C (Zheng JY y Janis LJ 2005). Como se pudo demostrar por Son y Kwon, 1995, aproximadamente 38% de hEGF a 0,5 mg/l se desamidan en Tris-HCl a pH 7,0 durante la incubación a 60°C durante 2 días y las cantidades de hEGF desamidada aumentan a 83, 63, 52, 51 y 49%, respectivamente, en tampones de PBS, fosfato de sodio, borato de sodio, citrato de sodio y acetato de sodio (Son K y Kwon C 1995). Además, los tampones a base de fosfato parecen ser una mala elección en cuanto a su inestabilidad del pH al congelarse (Kolhe P et al., 2010), ya que el fosfato muestra el mayor cambio en el pH al pasar de 25-30°C. Mientras que otros tampones como el clorhidrato de histidina, acetato de sodio, histidina-acetato, citrato y succinato mostraron menos de 1 cambio de unidad de pH (aumento) en el intervalo de temperatura de 25-30°C. La inestabilidad por congelación-descongelación del fosfato depende de la concentración, como se muestra, por ejemplo, en un estudio en el cual la agregación inducida por congelación-descongelación de un anticuerpo quimérico (L6) era mayor con el aumento de la concentración de tampón de fosfato (0.01 frente a 0.05) (Paborji Metal, 1994).

Por lo tanto, la formulación farmacéutica acuosa líquida de Adalimumab de la presente invención está libre de un tampón de fosfato.

El sistema tampón de la presente invención amortigua el pH de la formulación farmacéutica acuosa líquida en un intervalo de aproximadamente 5 a aproximadamente 5,5. Preferiblemente, el pH es de aproximadamente 5,1 a 5,4, más preferiblemente de 5,15 a 5,3 y lo más preferiblemente de aproximadamente 5,2 como se ilustra para las formulaciones en los Ejemplos adjuntos. Por lo tanto, en una realización preferida, la formulación farmacéutica acuosa líquida de Adalimumab de la presente invención tiene un pH de 5,2.

La formulación farmacéutica acuosa líquida de Adalimumab de la presente invención está libre de un tampón de fosfato y está tamponada con L-Histidina en combinación con citrato.

En otra realización preferida, la formulación farmacéutica acuosa líquida de Adalimumab de la presente invención comprende además un poliol, un tensioactivo y cloruro de sodio.

Un "poliol" de acuerdo con la definición descrita en la presente invención es una sustancia con múltiples grupos hidroxilo, e incluye azúcares (azúcares reductores y no reductores), alcoholes de azúcar y ácidos de azúcar. Cuando se trata del desarrollo de formulaciones farmacéuticas de anticuerpos con una estabilidad mejorada de congelación-descongelación, los polioles preferidos no cristalizan a temperaturas de congelación (por ejemplo, -20°C), de manera que desestabilizan el anticuerpo en la formulación. El poliol también puede actuar como un agente de tonicidad. Los polioles preferidos de la presente invención son alcoholes de azúcar, tales como manitol, xilitol, eritritol, treitol, sorbitol y glicerol. Un poliol preferido de la presente invención es un alcohol de azúcar y particularmente manitol. En una realización de la presente invención, la concentración de manitol en la formulación farmacéutica es de 5 a 20 mg/mL. En una realización preferida de la presente invención, la concentración de manitol en la formulación farmacéutica es de 10 a 14 mg/ml, más preferiblemente la concentración de manitol en la formulación farmacéutica es de 12 mg/ml.

Tal como se utiliza en el presente documento, los términos "agente de tonicidad" o "agente de isotonización" o "modificador de tonicidad" o "tonificante" o "agente de tonificación" se refieren a un agente que funciona para hacer una formulación farmacéutica acuosa líquida similar en características osmóticas a fluidos fisiológicos, en otras palabras, la formulación farmacéutica isotónica de interés tiene esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Los agentes de tonicidad que se utilizan típicamente incluyen dextrosa, manitol, cloruro de sodio, cloruro de potasio y glicerina. Las formulaciones isotónicas o fisiológicas tendrán generalmente una presión osmótica de aproximadamente 275-325 mOsm. Un agente isotonizante preferido comprendido en la formulación farmacéutica acuosa líquida de Adalimumab de la presente invención es cloruro de sodio. En una realización, la concentración de cloruro de sodio en la formulación

farmacéutica de la presente invención es de 5 a 7,5 mg/ml, preferiblemente de 5,5 a 6,5 mg/ml de cloruro de sodio. En una realización más preferida, la concentración de cloruro de sodio en la formulación farmacéutica de la presente invención es de aproximadamente 6,2 mg/ml de cloruro de sodio y preferiblemente 6,16 mg/ml de cloruro de sodio.

5 En otra realización preferida de la presente invención, la formulación farmacéutica de Adalimumab comprende además un tensioactivo. Existen básicamente dos tipos de tensioactivos, no iónicos e iónicos. Estos tensioactivos disminuyen la tensión superficial de las soluciones proteicas y disminuyen la fuerza motriz para la adsorción y/o agregación de proteínas en las superficies hidrófobas. Los tensioactivos no iónicos son generalmente preferidos en la estabilización de proteínas. Bajas concentraciones de tensioactivos no iónicos son a menudo suficientes para prevenir o reducir la adsorción y/o agregación de la superficie de la proteína debido a sus "concentraciones de micelas críticas" (CMC) relativamente bajas (Bam et al., 1995). El término "tensioactivo", tal como se usa en la presente invención, se refiere particularmente a tensioactivos no iónicos que se utilizan ampliamente para estabilizar proteínas, suprimir la agregación y ayudar en el plegado de las proteínas (Chi EY et al., 2003). Dicho tensioactivo es, preferiblemente, un polisorbato, que es un emulsionante derivado de sorbitán PEGilado (un derivado de sorbitol) esterificado con ácidos grasos. El polisorbato 80 y el polisorbato 20, también conocidos como Tween 80 y Tween 20, respectivamente, se han incorporado ampliamente en productos farmacéuticos de proteínas comercializados a un intervalo de 0,0003-0,3%. Un tensioactivo preferido comprendido en la formulación farmacéutica de Adalimumab de la presente invención es polisorbato 80 (monooleato de sorbitán con polioxietileno(20)). El intervalo de concentración preferido de polisorbato 80 dentro de la formulación farmacéutica de Adalimumab de la presente invención es de aproximadamente 0,1-10 mg/ml. Más preferiblemente, la formulación farmacéutica de Adalimumab de la presente invención comprende Polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,5 a 1,5 mg/ml, más preferentemente a aproximadamente 1 mg/ml de polisorbato 80.

Como se ha mencionado anteriormente e ilustrado en los Ejemplos, las formulaciones farmacéuticas acuosas líquidas de Adalimumab que están libres de un tampón de fosfato y que están formuladas en sistemas tampón basados en L-Histidina proporcionan formulaciones farmacéuticas de Adalimumab alternativas adecuadas con estabilidad a largo plazo incrementada en términos de formación de agregados y generación de especies ácidas. Más específicamente, las formulaciones farmacéuticas de Adalimumab libres de tampón de fosfato que se tamponaron con tampón de histidina-citrato de la presente invención muestran una estabilidad mejorada tras el almacenamiento a 25°C durante un período de al menos tres a seis meses en comparación con una formulación farmacéutica de Adalimumab de referencia basada en tampón de fosfato formulada de acuerdo con la formulación del producto comercializado HUMIRA®. En particular, las formulaciones de Adalimumab tamponadas con histidina-citrato de la presente invención muestran menos formación de agregados como se determinó por cromatografía de exclusión de tamaño incluso cuando la formulación se ha almacenado durante hasta seis meses a 25°C±3°C como se demostró en el Ejemplo 5 y las figuras 1D-1F, así como tras un estrés térmico de 55°C como se muestra en el Ejemplo 6 y la figura 2 en comparación con la formulación farmacéutica de referencia tamponada con citrato-fosfato.

Además, las formulaciones de Adalimumab tamponadas con histidina-citrato de la presente invención mostraron una disminución de la desamidación con vistas a una menor formación de especies ácidas como se determinó por cromatografía de intercambio catiónico fuerte incluso cuando la formulación se ha almacenado durante hasta seis meses a 25°C ± 3°C como se ha demostrado en el Ejemplo 7 y las figuras 3D-3F, así como tras un estrés térmico de 55°C como se muestra en el Ejemplo 8 y la figura 4 en comparación con la formulación farmacéutica de referencia tamponada con citrato-fosfato.

La frase "formulación farmacéutica estable" de acuerdo con la presente invención es una formulación farmacéutica en la cual el anticuerpo de interés, por ejemplo, Adalimumab, retiene su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica tras almacenar a la temperatura de almacenamiento prevista (por ejemplo, 5°C y/o 25°C) según lo requiera una agencia reguladora para su aprobación. Por ejemplo, una composición farmacéutica estable es una formulación que entre el tiempo que se produce y el tiempo que se utiliza (o alcanza el final de su vida útil prevista), no experimenta cambio alguno en sus propiedades físicas, químicas o biológicas que la hagan insegura o ineficaz para su uso farmacéutico de acuerdo con las normas establecidas en la ICH Q5C, "Calidad de los Productos Biotecnológicos: Pruebas de Estabilidad de Productos Biotecnológicos/Biológicos"/ por la Conferencia Internacional sobre la Armonización de los Requisitos Técnicos de los Productos Farmacéuticos para Uso Humano. La estabilidad de una proteína, por ejemplo, Adalimumab se puede determinar detectando y cuantificando formas químicamente alteradas de la proteína. La cantidad de anticuerpos monoméricos en la formulación farmacéutica es una característica cualitativa principal para la determinación de una formulación farmacéutica adecuada. Dado que los agregados son una causa principal de efectos secundarios (graves), el contenido de monómeros muestra la cantidad farmacéuticamente activa real del fármaco, es decir, el anticuerpo. Como se ha descrito anteriormente, esto es particularmente cierto para las formulaciones farmacéuticas para la autoadministración que están en el riesgo de condiciones de almacenamiento inadecuadas, tales como a altas temperaturas.

La formulación o formulaciones farmacéuticas acuosas líquidas o tampón o tampones con "estabilidad mejorada" o que

son "más estables" en comparación con una formulación farmacéutica de referencia se refiere a una formulación o formulaciones farmacéuticas acuosas líquidas o tampón o tampones en los cuales la proteína, es decir, el anticuerpo indica las diferencias cuantitativas entre dos estados (por ejemplo, estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica de la proteína, por ejemplo, el anticuerpo), haciendo referencia al menos a diferencias estadísticamente significativas entre los dos estados.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "agregación" incorpora los términos "agregación de proteínas" y "agregación de anticuerpos" y se refiere a la formación de especies proteicas de mayor peso molecular, tales como oligómeros o multímeros, en lugar de las especies definidas deseadas del producto biofarmacéutico (por ejemplo, un monómero). Por lo tanto, la agregación de proteínas es un término universal para la formación de todo tipo de especies multiméricas no definidas más detalladamente (especies agregadas) que se forman por enlaces covalentes o interacciones no covalentes. La agregación de proteínas es una de las tres vías de degradación de proteínas más comunes, además de la desamidación y la oxidación (Cleland JL et al., 1993). La agregación de proteínas en solución es causada principalmente por el medio del disolvente (pH, sal, codisolventes, etc.), la temperatura o las interacciones superficiales. Los problemas de agregación han sido implicados en reacciones adversas y otros problemas de seguridad desde el inicio de las aplicaciones clínicas de los productos farmacéuticos proteicos. Se sabe que los agregados de inmunoglobulina causan reacciones anafilácticas (Cleland JL et al., 1993, Carpenter JF et al., 1999). Para minimizar tales riesgos de las proteínas terapéuticas en aplicaciones clínicas, existe la necesidad de optimizar las formulaciones farmacéuticas para reducir la agregación durante el almacenamiento, la manipulación y el transporte (Remmele RL et al., 2006).

El término "desamidación" tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la desamidación de residuos de asparagina del anticuerpo anti-TNF $\alpha$  Adalimumab de la presente invención. La desamidación es una vía de degradación de proteínas prevalente y normalmente, las preparaciones de anticuerpos purificados contienen muchas formas ácidas. El almacenamiento puede generar fácilmente grandes cantidades de productos ácidos. La desamidación de residuos de asparagina es una de las modificaciones postraduccionales más comunes que se producen en proteínas terapéuticas producidas usando tecnología de ADN recombinante. La desamidación de la proteína da lugar a la conversión principalmente de un residuo de asparagina a una mezcla de isoaspartato y aspartato. La desamidación de los residuos de glutamina se produce también, pero en menor medida (Chelius D et al., 2005).

Tal como se usa en el presente documento, los términos "especies ácidas", "impurezas ácidas (impurezas)" y "variante(s) ácidas" se refieren a una variante o variantes de una proteína diana que es más ácida (por ejemplo, determinada por cromatografía de intercambio catiónico fuerte (SCX-HPLC)) que la proteína diana. Un ejemplo de una especie/impureza/variante ácida es una especie/impureza/variante desamidada.

En otra realización preferida, la formulación farmacéutica de la presente invención es adecuada para inyección subcutánea de un solo uso y contenida en un recipiente farmacéutico. La administración subcutánea es la vía de administración preferida en regímenes terapéuticos que requieren tratamiento repetido, como ocurre en muchas enfermedades crónicas, tales como enfermedades autoinmunes (por ejemplo, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad inflamatoria intestinal, psoriasis, hidradenitis supurativa, colitis ulcerosa y asma refractario), donde la medicación tiene que ser administrada a lo largo de toda la vida y donde la (auto)medicación es deseable con respecto a la complacencia del paciente y la reducción de costes. En una realización de la presente invención, el recipiente farmacéutico precargado es una jeringa precargada, una pluma de inyección, una ampolla, una botella, un autoinyector o una bolsa de infusión que comprende la formulación farmacéutica acuosa líquida de la invención. Preferiblemente, el recipiente se cierra bajo atmósfera protectora de nitrógeno.

Tal como se utiliza en el presente documento, el término "atmósfera protectora" se refiere a una atmósfera protectora tal con un contenido aumentado de nitrógeno. Las atmósferas de gas de protección (también conocidas como atmósfera de protección/modificada o gas protector/modificado) se usan comúnmente para extender la vida útil de los productos, tales como alimentos o medicamentos/productos farmacéuticos en un envase hermético al gas, para retardar o incluso detener los procesos físicos microbiológicos, enzimáticos y bioquímicos adversos que conducen a la rápida destrucción de los bienes durante el almacenamiento. Típicamente se utilizan como gas protector las mezclas de gas de dióxido de carbono y nitrógeno en las cuales el dióxido de carbono presenta un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de microorganismos, tales como bacterias y hongos, mientras que el gas nitrógeno sirve principalmente como soporte para evitar la rotura del envase. Además, en la mayor parte de las atmósferas de gas protector, la concentración de oxígeno se reduce en comparación con el aire, para evitar el crecimiento de microorganismos.

En una realización preferida adicional de la invención, la concentración de dosis de Adalimumab tal como se proporciona dentro de la formulación farmacéutica es preferiblemente 40 mg.

Hasta ahora, la dosis total actual de Adalimumab era de 40 mg para el tratamiento de pacientes adultos que padecían artritis reumatoide (RA), espondilitis anquilosante (AS) o artritis psoriásica (PSA). Sin embargo, para los pacientes

pediátricos (2 a <4 años) que sufren de artritis idiopática juvenil (JIA) se recomienda una dosis total de 20 mg, que se puede aumentar hasta un máximo de 40 mg. La dosis de inducción recomendada para pacientes pediátricos (<40 kg de peso corporal) que sufren de enfermedad de Crohn (CD) incluye 40 mg de Adalimumab seguido de una dosis de mantenimiento de 20 mg del anticuerpo. Por el contrario, la dosis recomendada para pacientes pediátricos (≥ 40 kg de peso corporal) que sufren de CD grave es de 80 mg de Adalimumab, seguido de 40 mg de Adalimumab. Con el fin de lograr una respuesta más rápida a la terapia de CD grave, se puede seleccionar una dosis de inducción de 160 mg seguido de una dosis de mantenimiento de 80 mg de Adalimumab. Por consiguiente, en una realización, la concentración de dosis de Adalimumab en las jeringas precargadas es preferiblemente 20 mg o una multiplicación integral de la misma en el recipiente que acompaña, preferiblemente 2 x 20 mg, 4 x 20 mg o 8 x 20 mg.

El régimen de dosis recomendada de Adalimumab para pacientes adultos con colitis ulcerosa es 160 mg inicialmente en el día 1, seguido de 80 mg el día 15. El día 29 se administra una dosis de mantenimiento de 40 mg cada dos semanas. La dosis recomendada de Adalimumab para pacientes adultos con psoriasis en placa (Ps) es una dosis inicial de 80 mg, seguida de 40 mg cada semana comenzando una semana después de la dosis inicial. Por consiguiente, en otra realización, la concentración de dosis de Adalimumab en las jeringas precargadas es preferiblemente 40 mg o una multiplicación integral de la misma en el recipiente que lo acompaña, preferiblemente 2 x 40 mg, 4 x 40 mg.

El término "trastorno", tal como se usa en la presente invención, es cualquier afección que se beneficiaría del tratamiento con el anticuerpo, es decir, Adalimumab, respectivamente. Esto incluye trastornos o enfermedades crónicas y agudas incluyendo aquellas afecciones patológicas que predisponen al sujeto al trastorno en cuestión. De acuerdo con una realización, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica acuosa líquida, por ejemplo, en un recipiente o conjunto de recipientes tal como se ha definido anteriormente para uso como medicamento para usar en "el tratamiento de un trastorno en el cual la actividad de TNF $\alpha$  es perjudicial". Los trastornos incluyen pero no se limitan a sepsis, enfermedades infecciosas, enfermedades autoinmunes, rechazo de trasplantes, tumores, trastornos pulmonares, trastornos cardiacos, trastornos intestinales, enfermedad de injerto contra huésped, enfermedades del sistema nervioso y similares.

Las enfermedades autoinmunes que son adecuadas para el tratamiento con la formulación farmacéutica de Adalimumab líquida acuosa de la presente invención, por ejemplo, en un recipiente o conjunto de contenedores como se ha definido anteriormente, incluyen pero no se limitan a enfermedades artríticas y reumáticas, como artritis reumatoide (RA), artritis psoriásica (PsA), artritis poliarticular idiopática juvenil, psoriasis, psoriasis en placa (Ps), espondilitis anquilosante (AS), espondiloartritis axial, espondiloartritis axial sin evidencia radiográfica de AS, enfermedad de Crohn (CD), enfermedad de Crohn pediátrica y colitis ulcerosa.

Las enfermedades inflamatorias que son adecuadas para el tratamiento con la formulación farmacéutica acuosa líquida de Adalimumab de la presente invención, por ejemplo, en un recipiente o conjunto de recipientes como se ha definido anteriormente, incluyen, pero no se limitan a, trastornos inflamatorios óseos y enfermedades de resorción ósea, hepatitis, incluyendo hepatitis alcohólica y hepatitis viral, trastornos de la coagulación, lesión por reperfusión, formación de queloides, formación de tejido cicatricial, pirexia, enfermedad periodontal, obesidad y toxicidad por radiación.

Las enfermedades infecciosas adecuadas son infecciones virales y/o bacterianas. Las enfermedades adecuadas del sistema nervioso son, entre otros, trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica.

En una realización más preferible, la formulación farmacéutica acuosa líquida (y el recipiente o conjunto de recipientes para uso de acuerdo con la presente invención) está diseñada para ser administrada subcutáneamente al sujeto humano que lo necesite en un régimen de dosificación quincenal de cada 13-15 días.

En una realización preferible, la formulación farmacéutica acuosa líquida de la presente invención está destinada a la administración en combinación con un agente terapéutico adicional que inhibe la producción o actividad de TNF $\alpha$ , preferiblemente, pero sin limitarse a metotrexato. Los Ejemplos 1 a 9 que siguen y las figuras 1 a 5 correspondientes ilustran la invención. Las descripciones detalladas de los métodos convencionales, tales como las utilizadas en el presente documento, se pueden encontrar en la bibliografía citada.

## EJEMPLOS

Existen varias formulaciones que comprenden sistemas tampón alternativos para la formulación comercial tamponado con citrato-fosfato de Adalimumab, que comprende ácidos monocarboxílicos o dicarboxílicos o sales de los mismos junto con un estabilizador de aminoácidos o polioles (ver, por ejemplo, la solicitud internacional WO2012/089778), tampones seleccionados de tampones de histidina, tampones de arginina, tampones de succinato, tampones de citrato o tampones de acetato y estabilizadores seleccionados de aminoácidos y ciclodextrinas (ver, por ejemplo, las solicitudes

internacionales WO2013/164837 y WO2014/039903) o formulaciones de Adalimumab que están tamponadas a un pH diferente (al menos 5,5, preferiblemente de 6,25 +/- 0,5) como en la solicitud internacional WO2013/186230. Sin embargo, a la luz de los requisitos de una formulación farmacéutica líquida estable, con particular atención a la adecuabilidad para la autoadministración a lo largo de toda la vida y para la plena explotación de la potencia clínica de un anticuerpo como en el caso del Adalimumab, aún existe una necesidad de desarrollar otras formulaciones farmacéuticas líquidas acuosas de Adalimumab con estabilidad de almacenamiento mejorada.

Para la selección de sistemas tampón adecuados como alternativas superiores a los de la formulación de Adalimumab tamponada con citrato-fosfato disponible en el mercado, se prepararon otras formulaciones farmacéuticas de Adalimumab en cuatro sistemas tampón diferentes: a) citrato (sistema de un solo tampón), b) histidina-citrato, c) histidina-acetato y en d) citrato-fosfato (tampón de referencia). Para la evaluación del efecto de estabilizantes adicionales, las cuatro formulaciones alternativas de Adalimumab adicionalmente incluyeron uno de los estabilizantes L-Arginina o EDTA. Todos los demás ingredientes (cloruro de sodio, manitol, Polisorbato 80) se mantuvieron cualitativa y cuantitativamente de acuerdo con la formulación de Adalimumab del producto comercializado HUMIRA®. La estabilidad de las diferentes formulaciones de Adalimumab se ensayó durante el almacenamiento a largo plazo a 5°C y 25°C durante un período de 6 meses y bajo condiciones de estrés como calentamiento a 55°C. Se proporciona un resumen de todas las formulaciones ensayadas en la Tabla 1.

**Tabla 1.** Formulaciones farmacéuticas alternativas de Adalimumab ensayadas y sus números de lote (ID de muestra No. 1 a 12)

ID	Adalimumab	Fosfato	Citrato	Acetato	L-histidina	EDTA	L-arginina	Manitol	Cloruro de sodio	Polisorbato 80
01	+	+	+					+	+	+
02	+	+	+			+		+	+	+
03	+	+	+				+	+	+	+
04	+		+					+	+	+
05	+		+			+		+	+	+
06	+		+				+	+	+	+
07	+		+		+			+	+	+
08	+		+		+	+		+	+	+
09	+		+		+		+	+	+	+
10	+			+	+			+	+	+
11	+			+	+	+		+	+	+
12	+			+	+		+	+	+	+

Los experimentos que comprenden el material utilizado y los métodos realizados de acuerdo con la presente invención y sus resultados se resumen en los siguientes.

**Tabla 2.** Equipo

Equipo	Fabricante	Modelo	Número de serie
UHPLC	Shimadzu Corp.	Nexera	L20234975345
Medidor de pH	Radiometer	PHM220	657R012N015
HPLC	Agilent Biosystems Inc.	1200	DE63059747

**Tabla 3.** Columnas HPLC

Columna	Fabricante	Número de parte	Número de lote
Acquity UPLC BEH300 C18 1.7 $\mu$ m 2.1x100 mm	Waters Corp.	186003686	0124332941
Yarra 3u SEC-3000 300x4.6 cm	Phenomenex	00H-4513-E0	5623-17
YMC-BioPro SP-F 100x4.6mm I.D. S-5 $\mu$ m	YMC	SF00S05-1046WP	10183

**Tabla 4.** Lista de materiales/reactivos

Material/reactivos	Fabricante	Número de parte	Número de lote
Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico monohidratado BioUltra	Fluka	69889	BCBK9895V
Sal de ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico de sodio BioPerformance	Sigma	M3058	SLBB6703V
Cloruro de sodio BioXtra	Sigma-Aldrich	S7653	SLBC3215V
Fosfato de potasio dibásico para HPLC $\geq 99.0\%$	Fluka	17835	AM0419904327
Fosfato de potasio monobásico para HPLC $\geq 99.5\%$	Fluka	60221	B0691108221
Cloruro de potasio, BioXtra, $\geq 99.0\%$	Sigma-Aldrich	P9333	BCBK9830V
Solución salina tamponada con fosfato	Signa	P4417	SLBJ2117V

Tabla 5. Lista de productos químicos

Nombre	Fabricante/ Proveedor	Pureza	Número de lote
L-arginina (base libre)	Merck K GaA	99,8%	k42667842150
Ácido acético (100%) (IN)	Celanese Gmbh	100%	R46162199
Ácido cítrico monohidratado	Jungbunzlauer	100,2%	1135667
Fosfato de hidrógeno disódico dodecahidratado	Merck K GaA	100,4%	K93244173
EDTA disódico (anhidro)	Merck K GaA	99,3%	D00104170
Ácido clorhídrico			
L-histidina base	Ajinomoto	98,5%	R016E013
HCl de L-histidina	Merck K GaA	100,1%	K43128954
Manitol	Roquette Freres	98,9%	E636Y
Polisorbato 80	Croda Chocques SAS	-	1702NP3483
Acetato de sodio trihidratado de alto grado	Merck K GaA	99,5%	A0337312
Cloruro de sodio	Salinen Austria AG	99,97%	CRS171212
Fosfato dihidrógeno de sodio dihidratado	Honeywell Speciality Chemicals Seelze Gmbh	100,0%	C0130
Citrato trisódico dihidratado	Honeywell Speciality Chemicals Seelze Gmbh	100,4%	A3330

30 Producción/purificación de Adalimumab

El ingrediente farmacéutico activo utilizado en el presente documento fue Adalimumab que se produjo en un clon derivado de células CHO (DG44) y se purificó mediante cromatografía de afinidad de proteína A, cromatografía de intercambio catiónico (CEX) y cromatografía de intercambio aniónico (AEX). Después de la última etapa de purificación, el anticuerpo se concentró hasta una concentración final de aproximadamente 50 mg/ml en el tampón deseado y se almacenó a una temperatura por debajo de -60°C.

35 Preparación de las formulaciones farmacéuticas de Adalimumab

40 El Adalimumab se purificó mediante cromatografía de afinidad con anticuerpo de proteína A y después se utilizó cromatografía de intercambio catiónico y aniónico durante el proceso aguas abajo. Después de estas etapas de purificación, se prepararon diferentes formulaciones por diafiltración. Las diferentes soluciones diafiltradas se prepararon usando tampones que contenían manitol y cloruro de sodio, mientras que se añadieron los excipientes estabilizadores de arginina, EDTA y Tween 80 en etapas posteriores. Después de la diafiltración, la solución de proteína se concentró hasta 45 aproximadamente 65 mg/ml. Tween 80 se agregó a partir de una solución concentrada (10 veces concentrada) que contenía las mismas soluciones tampón con manitol y el cloruro de sodio. La concentración de proteína y el pH se midieron en las muestras de formulación obtenidas. La concentración objetivo de las muestras fue de  $55 \pm 2,5$  mg/ml. Se determinaron la concentración de proteína y el pH de las muestras y después se filtraron las soluciones a través de un filtro estéril de tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m en tubos de policarbonato estéril de un solo uso.

50 Se agregaron excipientes de arginina o EDTA a las soluciones tampón que contenían manitol y cloruro de sodio. Las diferentes formulaciones farmacéuticas se prepararon diluyendo la solución de proteína a 50 mg/ml. La solución de proteína se diluyó con las diferentes disoluciones tampón sola o junto con las soluciones tampón que contienen EDTA o L-Arginina. Si la concentración de las muestras estaba fuera del intervalo deseado, se ajustó diluyendo a la concentración 55 objetivo.

60 Las muestras preparadas se filtraron a través de un filtro estéril de tamaño de poro de 0,22  $\mu$ m. Las alícuotas de las muestras se transfirieron a tubos de centrifugación estériles usando equipo estéril bajo flujo de aire laminar y los tubos se cerraron bajo flujo de gas nitrógeno. Las muestras de formulación de Adalimumab estaban listas para los experimentos de estabilidad.

Estudios de estabilidad a largo plazo

Las diferentes muestras de formulación de Adalimumab se almacenaron durante 6 meses a  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  y a  $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Las muestras se analizaron después de 1, 2, 3 y 6 meses.

5

Condiciones de congelación-descongelación

Las muestras de congelación-descongelación se prepararon el día del análisis para hacer coincidir con  $t = 0$ . El estrés de congelación-descongelación de las muestras se aplicó en un instrumento de liofilización Telstar Liobeta 15. Las muestras se congelaron de  $5^{\circ}\text{C}$  a  $-20^{\circ}\text{C}$  en 30 minutos y se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante 1 hora. Las muestras se descongelaron de  $-20^{\circ}\text{C}$  a  $5^{\circ}\text{C}$  en 2 horas. El ciclo de congelación y descongelación se repitió 5 y 10 veces, respectivamente, para cada muestra.

10

Condiciones de estrés por calor

El estrés por calor se aplicó por incubación de las muestras durante 10 min a  $55^{\circ}\text{C}$ , una temperatura cercana al punto de fusión de la proteína.

15

Estudios de agitación

El estrés mecánico se aplicó agitando las muestras durante 24 horas a  $25^{\circ}\text{C}$  en un agitador plano con una velocidad de agitación de 400 RPM.

20

Un mes de almacenamiento a temperatura elevada

Las muestras se almacenaron a  $40 \pm 2^{\circ}\text{C}$  durante 1 mes con una humedad relativa de  $75 \pm 5\%$ . Las muestras estresadas mecánicamente, congeladas y descongeladas a alta temperatura se almacenaron durante un mes adicional a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  y se analizaron nuevamente.

25

Contenido proteico por RP-UHPLC-UV<sub>280</sub>

Para medir la concentración de Adalimumab en las diferentes muestras de formulación se utilizó cromatografía líquida de alto rendimiento con detección UV (RP UHPLC-UV), utilizando absorbancia a 280 nm.

30

Mediciones de pH

El pH de cada muestra se midió usando una sonda de micro-pH. Antes del inicio del análisis, la sonda de pH se calibró con tres patrones de pH. Los valores de pH de las muestras de estabilidad se midieron transfiriendo 500  $\mu\text{l}$  de cada muestra de estabilidad a un tubo PCR de 1000  $\mu\text{l}$ . La sonda de micro-pH posteriormente se sumergió en la muestra y después se registró el valor estabilizado.

35

40

Cromatografía de exclusión de tamaño (HP-SEC)

La estabilidad de las formulaciones alternativas de Adalimumab con respecto a la pureza/agregación y fragmentación se midió usando cromatografía líquida de alto rendimiento de exclusión de tamaño (HP-SEC) que separa las moléculas en función del tamaño. El pico de elución temprano corresponde a especies de alto peso molecular o % de agregados. El pico principal (proteína intacta) corresponde al % de monómero. El pico de elución tardío corresponde a especies de bajo peso molecular o % de fragmentos. Los parámetros del método SEC se resumen brevemente a continuación:

45

- 50 ○ Preparación de la muestra: dilución 50x con agua
- Información de la columna: Yarra 3u SEC-3000 300x4.6mm
- Tampón de análisis: tampón de fosfato de potasio 200 mM (pH:  $\approx 7,0$ ) que incluye cloruro de potasio 100 mM
- Caudal: 0,35 ml/min
- Temperatura de la columna:  $30^{\circ}\text{C}$
- 55 ○ Detección: UV,  $\lambda = 215 \text{ nm}$
- Volumen de inyección: 2  $\mu\text{l}$
- Temperatura de la muestra:  $5^{\circ}\text{C}$

Los datos SEC se analizaron utilizando el software "Empower2" basado en % de áreas relativa de picos principales, agregados y fragmentados.

60

Cromatografía de intercambio fuerte de catión (SCX-HPLC)

Las heterogeneidades de carga y las modificaciones postraduccionales de muestras de formulación de Adalimumab digeridas intactas se analizaron mediante Cromatografía Líquida de Alto Rendimiento de intercambio iónico fuerte (SCX) (SCX-HPLC).

Los parámetros del método de cromatografía SCX se resumen brevemente a continuación:

Medición intacta:

- Preparación de la muestra: dilución 50x con agua
- Información sobre la columna: YMC-BioPro SP-F 100x4,6mm I.D. S-5  $\mu$ m
- Fase móvil A: tampón MES 10 mM (pH  $\approx$  6,0)
- Fase móvil B: cloruro de sodio 200 mM en fase móvil A
- Caudal: 0,85 ml/min
- Temperatura de la columna: 25°C
- Detección: Fluorescencia,  $\lambda_{EX} = 280$  nm,  $\lambda_{EM} = 350$  nm
- Volumen de inyección: 5  $\mu$ l
- Temperatura de la muestra: 5°C
- Programa de gradiente:

Tiempo [min]	Fase móvil A [%]	Fase móvil B [%]
0	56,6	43,4
18	33,6	66,4
19	33,6	66,4
19,5	56,6	43,4
25	56,6	43,4

Los siguientes ejemplos no limitantes representan varias formulaciones alternativas de Adalimumab que ejemplifican la presente invención.

### Ejemplo 1: Formulación farmacéutica de Adalimumab que comprende tampón de citrato-fosfato (fórmula de referencia)

El Adalimumab se purificó de acuerdo con las técnicas bien conocidas en la técnica. En este Ejemplo, el Adalimumab purificado se formuló en presencia de tampón citrato-fosfato junto con manitol, cloruro de sodio y Polisorbato 80 con o sin (#01) uno de los estabilizadores adicionales EDTA (#02) y L-Arginina (#03) a concentraciones tal como se muestra en la Tabla 6. El pH de la formulación se ajustó a aproximadamente pH 5,2. Se agregaron excipientes a la solución de proteína a partir de soluciones madre respectivas para ajustar la concentración final y se llenó el volumen hasta el nivel deseado con agua estéril o agua inyectable. El volumen formulado se distribuyó en un recipiente adecuado (como viales, jeringas, etc.) para su almacenamiento en condiciones normales y de estrés. La estabilidad con respecto a la formación de agregados y la desamidación/formación de impurezas (especies) ácidas de las formulaciones respectivas se midió en diferentes puntos de tiempo por cromatografía de exclusión tamaño HP y tras exposición al calor mediante HP-SCX, respectivamente. Los resultados se muestran en las figuras 1 a 4.

**Tabla 6:** #01 Tampón de citrato-fosfato (formulación de referencia)\*.

Componentes	Concentración	
	mg/ml	mmol/l
Adalimumab	50,00	
Cloruro de sodio	6,16	105,45
Fosfato dihidrógeno de sodio dihidratado	0,86	5,53
Fosfato de hidrógeno disódico dodecahidratado	3,07	8,57
Citrato trisódico dihidratado	0,30	1,02
Ácido cítrico monohidratado	1,30	6,19
Manitol	12,00	65,87
Polisorbato 80	1,00	
* $\pm$ 10,00 mg/mL de EDTA disódico (#02) o $\pm$ 4,36 mg/mL de base libre de L-arginina (#03)		

### Ejemplo 2: Formulación de Adalimumab que comprende tampón de citrato (monotampón)

El Adalimumab se purificó de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica. En este ejemplo, el Adalimumab purificado se formuló en presencia de tampón de citrato como sistema monotampón, junto con manitol, cloruro de sodio y polisorbato 80 con o sin (#04) uno de los estabilizadores adicionales EDTA (#05) y L-arginina (#06) a concentraciones como se muestra en la Tabla 7. El pH de la formulación se ajustó a aproximadamente pH 5,2. Se agregaron excipientes a la solución de proteína a partir de soluciones madre respectivas para ajustar la concentración final y el volumen se llevó hasta el nivel deseado con agua estéril o agua inyectable. El volumen formulado se distribuyó en un recipiente adecuado (como viales, jeringas, etc.) para su almacenamiento en condiciones normales y de estrés. La estabilidad con respecto a la formación de agregados y la desamidación/formación de impurezas (especies) ácidas de las formulaciones respectivas se inspeccionó en diferentes puntos de tiempo por cromatografía de exclusión tamaño HP y tras exposición al calor por HP-SCX, respectivamente. Los resultados se muestran en las figuras 1 a 4.

**Tabla 7: #04 Tampón de citrato\*.**

Componentes	Concentración	
	mg/ml	mmol/l
Adalimumab	50,00	
Cloruro de sodio	6,16	105,45
Citrato trisódico dihidratado	3,17	10,77
Ácido cítrico monohidratado	0,83	3,97
Manitol	12,00	65,87
Polisorbato 80	1,00	
*± 10,00 mg/mL de EDTA disódico (#05) o ± 4,36 mg/mL de base libre de L-arginina (#06)		

### Ejemplo 3: Formulación farmacéutica de Adalimumab que comprende tampón de histidina-citrato

El Adalimumab se purificó de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica. En este ejemplo, el Adalimumab purificado se formuló en presencia de tampón de histidina-citrato junto con manitol, cloruro de sodio y polisorbato 80 con o sin (#07) uno de los estabilizadores adicionales EDTA (#08) y L-arginina (#09) a concentraciones como se muestra en la Tabla 8. El pH de la formulación se ajustó a aproximadamente pH 5,2. Se agregaron excipientes a la solución de proteína a partir de soluciones madre respectivas para ajustar la concentración final y se llenó el volumen hasta el nivel deseado con agua estéril o agua inyectable. El volumen formulado se distribuyó en un recipiente adecuado (como viales, jeringas, etc.) para su almacenamiento en condiciones normales y de estrés. La estabilidad con respecto a la formación de agregados y la desamidación/formación de impurezas (especies) ácidas de las formulaciones respectivas se inspeccionó en diferentes puntos de tiempo por cromatografía de exclusión tamaño HP y tras exposición al calor por HP-SCX, respectivamente. Los resultados se muestran en las figuras 1 a 4.

**Tabla 8: #07 Tampón de histidina-citrato\***

Componentes	Concentración	
	mg/ml	mmol/l
Adalimumab	50,00	
Cloruro de sodio	6,16	105,45
L-histidina base	0,02	1,22
HCL de L-histidina	0,24	11,20
Citrato trisódico dihidratado	1,58	5,38
Ácido cítrico monohidratado	0,42	1,98
Manitol	12,00	65,87
Polisorbato 80	1,00	
*± 10,00 mg/mL de EDTA disódico (#08) o ± 4,36 mg/mL de base libre de L-arginina (#09)		

### Ejemplo 4: Formulación farmacéutica de Adalimumab que comprende tampón de histidina-acetato

El Adalimumab se purificó de acuerdo con técnicas bien conocidas en la técnica. En este ejemplo, el Adalimumab purificado se formuló en presencia de tampón de histidina-acetato junto con manitol, cloruro de sodio y polisorbato 80 con o sin (#10) uno de los estabilizadores adicionales de EDTA (#11) y L-arginina (#12) a concentraciones como se muestra en la Tabla 9. El pH de la formulación se ajustó a aproximadamente pH 5,2. Se agregaron excipientes a la solución de proteína a partir

de soluciones madre respectivas para ajustar la concentración final y el volumen se llevó hasta el nivel deseado con agua estéril o agua inyectable. El volumen formulado se distribuyó en un recipiente adecuado (como viales, jeringas, etc.) para su almacenamiento en condiciones normales y de estrés. La estabilidad con respecto a la formación de agregados y la desamidación/formación de impurezas (especies) ácidas de las respectivas formulaciones se inspeccionó en diferentes puntos de tiempo por cromatografía de exclusión tamaño HP y tras exposición al calor por HP-SCX, respectivamente. Los resultados se muestran en las figuras 1 a 4.

**Tabla 9: #10 Tampón de histidina-acetato\*.**

Componentes	Concentración	
	mg/ml	mmol/l
Adalimumab	50,00	
Cloruro de sodio	6,16	105,45
L-histidina base	0,02	1,11
HCL de L-histidina	0,24	11,20
Citrato trisódico dihidratad (alto grado)	0,28	20,76
Ácido acético (100 %) (IN)	0,03	5,52
Manitol	12,00	65,87
Polisorbato 80	1,00	
* ± 10,00 mg/mL de EDTA disódico (#11) o ± 4,36 mg/mL de base libre de L-arginina (#012)		

**Ejemplo 5: Contenido de agregado de las formulaciones alternativas de Adalimumab con relación a la formulación de referencia**

La estabilidad de las formulaciones de Adalimumab ensayadas con respecto a la formación de agregados se midió mediante HP-SEC durante el almacenamiento a 5°C (Tablas 10 y 11) y a 25°C (Tablas 12 y 13) durante un período de 6 meses. Los valores representan las diferencias en los porcentajes de área de los picos agregados [ $\Delta$  % de área] de las formulaciones de Adalimumab ensayadas en comparación con los picos agregados medidos en las respectivas formulaciones de referencia de Adalimumab tamponadas con citrato-fosfato. Con respecto a las formulaciones que contienen L-Arginina, sólo se dispone de datos de estabilidad de 3 meses. Después de 6 meses de almacenamiento a 25°C, las formulaciones farmacéuticas de Adalimumab tamponadas con histidina-citrato e histidina-acetato tienen aparentemente una menor velocidad de agregación en comparación con las formulaciones de referencia basadas en citrato-fosfato. Las formulaciones de Adalimumab basadas en tampón de citrato solo parecen ser más propensas a la agregación. Ni la adición de EDTA ni de L-arginina (L-Arg determinada después de 3 meses) tienen un efecto preventivo o estabilizador sobre la formación de agregados en las formulaciones alternativas. En conclusión, la formulación farmacéutica de Adalimumab, tamponada con histidina-acetato, seguido por tampón de histidina-citrato de la presente invención es una alternativa más estable a la formulación de Adalimumab tamponada con citrato-fosfato en el mercado.

**Tabla 10:** Contenido de agregado de las formulaciones de Adalimumab alternativas en números absolutos a 5°C.

ID	Formulación		Agregados [% de área] a 5°C				
	Tampón	Estabilizador	Inicial	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses
01	Citrato-fosfato	-	4,10	3,89	3,94	3,90	4,76
04	Citrato	-	3,65	3,95	3,78	3,98	4,68
07	Histidina-Citrato	-	3,63	3,68	3,49	3,68	4,35
10	Histidina-Acetato	-	4,02	3,67	3,64	3,65	4,28
02	Citrato-Fosfato	EDTA	4,10	3,80	3,81	3,78	4,56
05	Citrato	EDTA	3,82	3,82	3,83	3,87	4,62
08	Histidina-Citrato	EDTA	3,77	3,63	3,60	3,72	4,29
11	Histidina-Acetato	EDTA	3,94	3,66	3,66	3,62	4,30
03	Citrato-Fosfato	L-Arg	3,84	3,93	3,97	4,51	-
06	Citrato	L-Arg	3,90	3,94	4,02	4,54	-
09	Histidina-Citrato	L-Arg	3,67	3,86	3,78	4,37	-
12	Histidina-Acetato	L-Arg	3,65	3,75	3,83	4,33	-

**Tabla 11:** Contenido de agregado de las formulaciones de Adalimumab alternativas con relación a la formulación de referencia a 5°C

ID	Formulación		Agregados [ $\Delta$ % de área] a 5°C				
	Tampón	Estabilizador	Inicial	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses
04	Citrato	-	-0,45	0,06	-0,16	0,08	-0,08
07	Histidina-Citrato	-	-0,47	-0,21	-0,45	-0,22	-0,41
10	Histidina-Acetato	-	-0,08	-0,22	-0,30	-0,25	-0,48
05	Citrato	EDTA	-0,28	0,02	0,02	0,09	0,06
08	Histidina-Citrato	EDTA	-0,33	-0,17	-0,21	-0,06	-0,27
11	Histidina-Acetato	EDTA	-0,16	-0,14	-0,15	-0,16	-0,26
06	Citrato	L-Arg	0,06	0,01	0,05	0,03	-
09	Histidina-Citrato	L-Arg	-0,17	-0,07	-0,19	-0,14	-
12	Histidina-Acetato	L-Arg	-0,19	-0,18	-0,14	-0,18	-

**Tabla 12:** Contenido de agregados de formulaciones de Adalimumab alternativas en números absolutos a 25°C

ID	Formulación		Agregados [% de área] a 25°C				
	Tampón	Estabilizador	Inicial	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses
01	Citrato-Fosfato	-	4,10	4,15	4,37	4,34	5,87
04	Citrato	-	3,65	3,88	4,40	4,53	5,92
07	Histidina-Citrato	-	3,63	3,73	3,90	3,90	4,87
10	Histidina-Acetato	-	4,02	3,74	3,86	3,86	4,83
02	Citrato-Fosfato	EDTA	4,10	3,93	4,15	4,06	5,39
05	Citrato	EDTA	3,82	3,95	3,95	4,10	5,57
08	Histidina-Citrato	EDTA	3,77	3,73	3,81	3,71	4,74
11	Histidina-Acetato	EDTA	3,94	3,71	3,79	3,64	4,75
03	Citrato-Fosfato	L-Arg	3,84	4,09	4,36	5,17	-
06	Citrato	L-Arg	3,90	3,99	4,27	5,53	-
09	Histidina-Citrato	L-Arg	3,67	3,82	3,93	4,50	-
12	Histidina-Acetato	L-Arg	3,65	3,87	4,08	4,51	-

**Tabla 13:** Contenido de agregados de formulaciones alternativas de Adalimumab con relación a la formulación de referencia a 25°C

ID	Formulación		Agregados [ $\Delta$ de % de área] a 25°C				
	Tampón	Estabilizador	Inicial	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses
04	Citrato	-	-0,45	-0,27	0,03	0,19	0,05
07	Histidina-Citrato	-	-0,47	-0,42	-0,47	-0,44	-1,00
10	Histidina-Acetato	-	-0,08	-0,41	-0,51	-0,48	-1,04
05	Citrato	EDTA	-0,28	0,02	-0,20	0,04	0,18
08	Histidina-Citrato	EDTA	-0,33	-0,20	-0,34	-0,35	-0,65
11	Histidina-Acetato	EDTA	-0,16	-0,22	-0,36	-0,42	-0,64
06	Citrato	L-Arg	0,06	-0,10	-0,09	0,36	-
09	Histidina-Citrato	L-Arg	-0,17	-0,27	-0,43	-0,67	-
12	Histidina-Acetato	L-Arg	-0,19	-0,22	-0,28	-0,66	-

**Ejemplo 6:** Contenido de agregados de formulaciones alternativas de Adalimumab en condiciones de estrés (55°C) con relación a la formulación de referencia

La formación de agregados tras calentar las diferentes muestras de la formulación de Adalimumab a 55°C se evaluó

5 utilizando HP-SEC. En la figura 2A, el contenido de agregados se muestra como porcentajes de área (columnas de la izquierda). Las columnas de la derecha (designadas con  $\Delta$ ) representan las diferencias de las respectivas formulaciones de referencia tamponadas con citrato-fosfato para los resultados iniciales y la diferencia con respecto a los resultados  
10 de Adalimumab analizadas, la formulación tamponada con histidina-acetato sin un estabilizador adicional mostró la estabilidad más alta, es decir, la tasa de agregación más baja a 55°C; ver también la figura 2B, cabe indicar que la línea de referencia de formulación tamponada con citrato-fosfato para 55°C está en  $\Delta$  0.34, es decir por encima del ID #10 (histidina-acetato) e ID #08 (histidina-citrato + EDTA). La adición de EDTA a la combinación de tampón de histidina-acetato mejora aparentemente la formación de agregados en la formulación farmacéutica respectiva (#11) mientras se calienta a 55°C. La formulación farmacéutica de Adalimumab tamponada con histidina-citrato y que comprende EDTA muestra una estabilidad similar a 55°C.

#### 15 **Ejemplo 7: Contenido de especies ácidas de formulaciones alternativas de Adalimumab con respecto a las formulaciones de referencia**

15 La estabilidad de las formulaciones de Adalimumab ensayadas con respecto a la formación de especies ácidas se midió mediante HPLC SCX durante el almacenamiento a 5°C (Tablas 14 y 15) y a 25°C (Tablas 16 y 17) durante un período de 6 meses (figura 3). Los valores representan las diferencias en los porcentajes de área [ $\Delta$  de % de área] de los picos de impurezas ácidas (suma de primera y segunda regiones ácidas) de las formulaciones de Adalimumab ensayadas en  
20 comparación con los picos de impurezas ácidas medidos en las respectivas formulaciones de referencia de Adalimumab tamponadas con citrato-fosfato. En cuanto a las formulaciones que contienen L-arginina, sólo se dispone de datos de estabilidad de 3 meses. Todas las formulaciones farmacéuticas de Adalimumab alternativas ensayadas almacenadas a 5°C tienen aparentemente niveles ligeramente inferiores de impurezas ácidas que las formulaciones de referencia que comprenden tampón de citrato-fosfato, sin embargo, las diferencias no son significativas (figuras 3A-C). Los estudios de  
25 estabilidad a 25°C revelaron que las formulaciones farmacéuticas de Adalimumab tamponadas con histidina-acetato e histidina-citrato muestran niveles significativamente más bajos de especies ácidas tras el almacenamiento durante 6 meses en comparación con las formulaciones de referencia basadas en tampón de citrato-fosfato (figuras 3D-F, esto también es cierto para los datos de 3 meses en el caso de formulaciones que contienen L-arginina, respectivamente). La formulación de Adalimumab tamponada con histidina-acetato sin un estabilizador adicional (#10) tiene la pureza relativa más alta (nivel de 3,1% menor de impurezas ácidas comparado con la formulación de referencia tamponada con citrato-fosfato), mientras que las formulaciones de Adalimumab basadas en tampón de citrato solo mostraron la mayor cantidad de impurezas ácidas. Ni la adición de EDTA ni de L-Arginina (L-Arg determinada después de 3 meses) tiene un efecto preventivo o  
30 estabilizador sobre la formación de especies ácidas en las formulaciones alternativas de Adalimumab.

**Tabla 14:** Impurezas ácidas (es decir, contenido de especies ácidas) de formulaciones de Adalimumab alternativas en números absolutos a 5°C

ID	Formulación		Impurezas ácidas [% de área] a 5°C				
	Tampón	Estabilizador	Inicial	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses
01	Citrato-Fosfato	-	32,25	32,32	-	32,98	33,17
04	Citrato	-	32,34	32,55	-	32,84	32,97
07	Histidina-Citrato	-	32,34	32,43	-	33,32	33,03
10	Histidina-Acetato	-	32,26	32,35	-	32,54	32,79
02	Citrato-Fosfato	EDTA	32,30	32,39	-	32,89	33,03
05	Citrato	EDTA	32,38	32,38	-	33,01	32,68
08	Histidina-Citrato	EDTA	32,31	32,37	-	33,75	32,94
11	Histidina-Acetato	EDTA	32,30	32,25	-	32,55	32,80
03	Citrato-Fosfato	L-Arg	32,64	32,99	32,47	33,01	-
06	Citrato	L-Arg	33,04	33,03	32,55	32,92	-
09	Histidina-Citrato	L-Arg	32,96	32,99	32,36	32,86	-
12	Histidina-Acetato	L-Arg	32,87	32,90	32,30	32,77	-

**Tabla 15:** Impurezas ácidas (es decir, contenido de especies ácidas) de formulaciones alternativas de Adalimumab con relación a la formulación de referencia a 5°C

ID	Formulación		Impurezas ácidas [ $\Delta$ % de área] a 5°C				
	Tampón	Estabilizador	Inicial	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses
04	Citrato	-	0,09	0,23	-	-0,14	-0,20
07	Histidina-Citrato	-	0,09	0,11	-	0,34	-0,14
10	Histidina-Acetato	-	0,01	0,03	-	-0,44	-0,38
05	Citrato	EDTA	0,08	-0,01	-	0,12	-0,35
08	Histidina-Citrato	EDTA	0,01	-0,02	-	0,86	-0,09
11	Histidina-Acetato	EDTA	0,00	-0,14	-	-0,34	-0,23
06	Citrato	L-Arg	0,40	0,04	0,08	-0,09	-
09	Histidina-Citrato	L-Arg	0,32	0,00	-0,11	-0,15	-
12	Histidina-Acetato	L-Arg	0,23	-0,09	-0,17	-0,24	-

**Tabla 16:** Impurezas ácidas (es decir, contenido de especies ácidas) de las formulaciones alternativas de Adalimumab en números absolutos a 25°C

ID	Formulación		Impurezas ácidas [% de área] a 25°C				
	Tampón	Estabilizador	Inicial	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses
01	Citrato-Fosfato	-	32,25	33,92	-	38,29	44,82
04	Citrato	-	32,34	33,84	-	38,02	46,68
07	Histidina-Citrato	-	32,34	33,55	-	36,93	42,84
10	Histidina-Acetato	-	32,26	33,44	-	36,69	41,71
02	Citrato-Fosfato	EDTA	32,3	33,59	-	37,96	44,15
05	Citrato	EDTA	32,38	33,79	-	38,22	45,68
08	Histidina-Citrato	EDTA	32,31	33,44	-	36,97	42,92
11	Histidina-Acetato	EDTA	32,3	33,18	-	36,94	41,43
03	Citrato-Fosfato	L-Arg	32,64	34,76	36,00	38,21	-
06	Citrato	L-Arg	33,04	35,02	36,85	39,40	-
09	Histidina-Citrato	L-Arg	32,96	34,57	35,48	37,80	-
12	Histidina-Acetato	L-Arg	32,87	34,33	35,14	37,28	-

**Tabla 16:** Impurezas ácidas (es decir, contenido de especies ácidas) de las formulaciones alternativas de Adalimumab con relación a la formulación de referencia a 25°C

ID	Formulación		Impurezas ácidas [ $\Delta$ % de área] a 25°C				
	Tampón	Estabilizador	Inicial	1 mes	2 meses	3 meses	6 meses
04	Citrato	-	0,09	-0,08	-	-0,27	1,86
07	Histidina-Citrato	-	0,09	-0,37	-	-1,36	-1,98
10	Histidina-Acetato	-	0,01	-0,48	-	-1,60	-3,11
05	Citrato	EDTA	0,08	0,20	-	0,26	1,53
08	Histidina-Citrato	EDTA	0,01	-0,15	-	-0,99	-1,23
11	Histidina-Acetato	EDTA	0,00	-0,41	-	-1,02	-2,72
06	Citrato	L-Arg	0,40	0,26	0,85	1,19	-
09	Histidina-Citrato	L-Arg	0,32	-0,19	-0,52	-0,41	-
12	Histidina-Acetato	L-Arg	0,23	-0,43	-0,86	-0,93	-

**Ejemplo 8:** Contenido de especies ácidas de formulaciones alternativas de Adalimumab en condiciones de estrés (55°C) con relación a las formulaciones de referencia

La formación de impurezas ácidas tras calentar las diferentes muestras de formulación de Adalimumab a 55°C se evaluó usando HP-SCX (figura 4A). El nivel de formación de especies ácidas se muestra como porcentajes de área (columnas de la izquierda). Las columnas de la derecha (designadas con  $\Delta$ ) representan las diferencias de las respectivas formulaciones de referencia tamponadas con citrato-fosfato para los resultados iniciales y la diferencia con respecto a los resultados iniciales (cambio debido al estrés) para las muestras sometidas a estrés, respectivamente. Entre todas las formulaciones de Adalimumab ensayadas, la formulación tamponada con histidina-acetato sin un estabilizador adicional (#10) mostró la estabilidad más alta, es decir, el índice de formación de impurezas ácidas más baja a 55°C. La adición de EDTA a esta combinación de tampones parece aumentar ligeramente la formación de impurezas ácidas en la formulación respectiva mientras se calienta a 55°C.

### **Ejemplo 9: Actividad biológica de formulaciones alternativas de Adalimumab en condiciones de estrés con relación a la formulación de referencia**

#### Principio del método

La actividad biológica de la muestra de ensayo se determina con el tiempo bajo diferentes condiciones de estrés en comparación con la actividad biológica de la solución de referencia HUMIRA®. El efecto de inhibir la muerte celular por la solución de referencia y la muestra de ensayo se compara en células L929 tratadas con TNF $\alpha$  y Actinomicina-D, que se detecta con reactivo AlamarBlue®. Durante el tratamiento, se agrega un medio que contiene células L929 en la misma concentración en los pocillos apropiados de una placa de microtitulación de 96 pocillos y se incuba durante 48 horas. Después de la incubación, se preparan series de dilución de 9 puntos en tres repeticiones tanto de la solución de referencia como de la muestra de ensayo, en la misma concentración en una placa de dilución, a continuación se agrega la solución de TNF $\alpha$  y las mezclas se incuban durante 15 minutos a temperatura ambiente. Durante el período de incubación se agrega la solución de Actinomicina-D en los pocillos de la placa de microtitulación que contienen las células, posteriormente se agrega a las células la solución de TNF $\alpha$  y la solución de referencia o la muestra de ensayo. Después de 24 horas, el reactivo AlamarBlue® se agrega a las células, a continuación después de otra incubación de 24 horas se detectan las señales fluorescentes, que son proporcionales al número de células viables. La evaluación de la actividad biológica de la muestra de ensayo con respecto a la solución de referencia se basa en la comparación de las curvas sigmoideas de 5 parámetros obtenidas de los puntos de la serie de dilución. Después de analizar las características del ajuste (regresión, linealidad y paralelismo), la actividad biológica relativa de la muestra se calcula a partir de las distancias de las curvas; el valor óptimo es 100%.

#### Equipo y materiales necesarios

##### *Materiales*

- Actinomicina-D (Sigma A9415)
- AlamarBlue® (Invitrogen DAL 1025)
- DMEM, glucosa alta, GlutaMAX, HEPES (Gibco 32430)
- Etanol (Merck 1.00983.1000)
- FBS, suero bovino fetal (inactivado por calor) (Gibco 10500-056)
- Solución madre de referencia HUMIRA® (Abbott, 50 mg/ml)
- Sulfato de canamicina, *Streptomyces kanamyceticus*, cultivo celular ensayado (Calbiochem, 420411)
- PBS pH 7,4
- TNF $\alpha$  humano recombinante (R&D Systems, 210TA/CF)
- TrypLETM Express (1x), rojo de fenol (Gibco, 12605-010)
- Solución de azul de tripano (Sigma T8154)
- Solución madre de la muestra de ensayo
- Agua, purificada, grado HPLC

##### *Equipo*

- Frasco de cultivo de tejidos (TPP 711090076)
- Placa de microtitulación de 96 pocillos (BD Falcon 3072)
- Tubo de centrifuga de 50 ml (BD Falcon 352070)
- Pipetas Eppendorf Research®
- Cat. No.: 3111 000.130 (intervalo de volumen: 2-20  $\mu$ l, inexactitud:  $\pm$  1,2%, imprecisión:  $\leq$ 0,6%)
- Cat. No.: 3111 000.157 (intervalo de volumen: 20-200  $\mu$ l, inexactitud:  $\pm$  1,0%, imprecisión:  $\leq$ 0,3%)
- Cat. No.: 3111 000.165 (intervalo de volumen: 100-1000  $\mu$ l, inexactitud:  $\pm$  0,6%, imprecisión:  $\leq$ 0,2%)
- Pipeta de múltiples canales Eppendorf
- Cat. No.: 3114 000.131 (intervalo de volumen: 10-100  $\mu$ l, inexactitud:  $\pm$  0,8%, imprecisión:  $\leq$ 0,3%)

## ES 2 703 586 T3

- Tubos Eppendorf (Eppendorf 0030 108.116 Tubos Protein LoBind, 1,5 mL, limpios PCR)
- Unidad de filtro Millex-GV, 0,22 µm, PVDF, 33 mm, (Millipore SLGV033RB)
- Caja para flujo laminar de Bioseguridad II
- Incubadora de CO<sub>2</sub>
- 5 - Lector de placas Biotek Synergy 2, software Gen5 Secure
- Centrífuga de mesa con rotor intercambiable Beckman Coulter Allegra X-22R
- Pipeta Sigma Pasteur (Sigma-Aldrich, S6018-250EA)
- Pipeta serológica de 10 ml (TPP 94010)
- Pipeta serológica, 25 ml (TPP 94024)
- 10 - Cámara Bürker (0,0025 mm<sup>2</sup>, Hirschmann)
- Contador de células automático Nucleocounter
- Robot de manipulación de líquidos Agilent Bravo
- Purificador de agua (Sartorius Arium 611VF)
- Balanza analítica (Mettler Toledo AX205)
- 15 - Agitador magnético (IKA Ret basic)
- Se pueden utilizar también materiales y equipos de la misma calidad.

### Preparación de soluciones

- 20 Medio completo
  - 90 ml de medio DMEM
  - 10 ml de FBS
  - 200 µl de solución de canamicina (50 mg/ml, solución acuosa de agua purificada)
- 25 El medio se puede utilizar durante no más de una semana después de la preparación, los componentes no son esterilizados por el proveedor; el medio tiene que ser esterilizado por filtración.
  - 10x de PBS
  - 40 g de NaCl
  - 5,8 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>
  - 30 - 1 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
  - 1 g de KCldisuelto en 500 ml de agua purificada, pH 7,0

(No es necesario ajustar el valor de pH del 1x PBS, estará a aproximadamente pH 7,4-7,5).

### 35 Preparación de la solución madre de TNFα

Preparar una solución madre de 1 mg/ml de concentración de TNFα. Agregar 50 µl de PBS estéril filtrado a 50 µg de TNFα liofilizado almacenado a -20°C, y después disolver agitando suavemente.

- 40 La solución madre de TNFα almacenada a -70°C se puede utilizar durante 3 meses después de la preparación.

### Preparación de la solución madre de Actinomicina-D

- 45 Preparar una solución madre de 1 mg/ml de concentración de Actinomicina-D. Agregar 2 ml de etanol a 2 mg de Actinomicina-L liofilizada, y después disolver con un vórtice.

La solución madre de Actinomicina-D almacenada a -20°C se puede utilizar durante 3 meses después de la preparación.

### 50 Dilución de TNFα

Preparar una solución de 112 pg/ml de concentración de la solución madre de TNFα de 1 mg/mL almacenada a -70°C en cuatro etapas de dilución, que se diluye adicionalmente 4 veces en los pocillos y la concentración final es de 28 pg/ml.

- 55 Etapas de dilución:

1. 100x (198 µl de medio completo + 2 µl de solución madre de TNFα)
2. 100x (990 µl de medio completo + 10 µl de la etapa de dilución anterior)
3. 10x (900 µl de medio completo + 100 µl de la etapa de dilución anterior)
4. 89x (en 3 placas: 19,8 mL de medio completo + 225 µl de la etapa de dilución anterior)

### 60 Dilución de Actinomicina-D

Preparar una solución de 4 µg/ml de concentración a partir de 1 mg/ml de solución madre de Actinomicina-D almacenada a -20°C mediante dilución 250x (20 µl de solución madre + 5 ml de medio completo en cada placa), que se diluye adicionalmente 4 veces en los pocillos y la concentración final es de 1 µg/ml.

5

Preparación de la solución de referencia y solución de ensayo

Diluir la solución madre de referencia HUMIRA® (50 mg/ml) a 7,2 µg/mL en tres etapas. Partiendo del mínimo de 10 µl de solución madre, las siguientes etapas de dilución son: 10x, 100x y 6,94x. Transferir 50 µl de la solución diluida a la concentración de 7,2 µg/ml a los pocillos apropiados de la placa de dilución, donde la concentración final de la solución de referencia resulta en 2,4 µg/ml.

10

Etapas de dilución:

1. 10x (90 µl de medio completo + 10 µl de solución madre de referencia HUMIRA® o solución de ensayo)
2. 100x (90 µl de medio completo + 10 µl de la etapa de dilución anterior)
3. 6,94x (178,2 µl de medio completo + 30 µl de la etapa de dilución anterior)

15

La concentración nominal de la solución madre de referencia HUMIRA® es de 50 mg/ml; a partir de esta preparar una solución de 7,2 µg/ml de concentración de manera que la diferencia entre la concentración real y la concentración nominal se corrige en la última etapa de dilución. De este modo, medir la cantidad a partir de la solución obtenida en la segunda etapa de dilución de manera que la concentración de la tercera solución sea 7,2 µg/ml. (Concentración inicial (µg/ml)/1,000 = concentración después de las dos primeras etapas de dilución (µg/ml); Grado de la tercera etapa de dilución = concentración después de las dos primeras etapas de dilución (µg/ml)/7,2 µg/ml; Pesado: volumen total de la 3ª solución (µl)/grado de la 3ª etapa de dilución = x (µl) de la 2ª dilución). Diluir la solución madre de la muestra de ensayo a 7,2 µg/mL similar a la solución de referencia.

20

25

Realización del ensayo, condiciones de ensayo

Realizar cada etapa bajo condiciones estériles.

30

Colocación en placas de las células - Día 1

Preparación de la suspensión celular

Tres días antes de la colocación en placas de las células, transferir aproximadamente  $2,5 \times 10^6$  células en 25 ml de medio completo en un matraz de cultivo de tejidos. El día de la colocación en placa de las células, después de extraer el medio, desprender las células unidas a la superficie con 3 ml de solución TrypLETM Express, y después suspender en 7 mL de medio completo. Utilizando la cámara Bürker con tinción azul de tripano (BTCH-BIOASSAY-BÜRKER-01), o con Nucleocounter (BTCH-BIOASSAY-SEJTSZ-01), determinar el número de células y la viabilidad. Si la parte de células viables es inferior a 90%, no utilizar el cultivo celular. Fijar el número de células a  $1,6 \times 10^5$  células/ml en el medio necesario para el ensayo. Se necesitan 6 ml de suspensión celular en una placa, 50 µl por cada célula. Utilizar la suspensión celular en 1 hora. Incubar la placa durante 48 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 85% HR.

35

40

Tratamiento de las células – Día 3

Tabla 17: Composición de soluciones y su disposición en la placa

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio
B	Medio	Referencia 1	Referencia	Control cél.	Medio							
C	Medio	Muestra 1	Muestra	Control cél.	Medio							
D	Medio	Referencia 2	Referencia	Control ActD	Medio							
E	Medio	Muestra 2	Muestra	Control ActD	Medio							
F	Medio	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Referencia	Control TNF $\alpha$	Medio
G	Medio	Muestra 3	Muestra	Control TNF $\alpha$	Medio							
H	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio	Medio

Medio: medio completo 200  $\mu$ l/pocillo (pocillos: A 1-12, H 1-12; B-G 1, B-G 12)  
 Control Cél.: suspensión celular 50  $\mu$ l/pocillo + medio completo 150  $\mu$ l/pocillo (11 B-C)  
 Control ActD: suspensión celular 50  $\mu$ l/pocillo + actinomicina D (4  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l/pocillo + medio completo 100  $\mu$ l/pocillo (11 B-C)  
 Control de TNF $\alpha$ : suspensión celular 50  $\mu$ l/pocillo + solución de TNF $\alpha$  (12 pg/ml) 100  $\mu$ l/pocillo + suspensión celular 50  $\mu$ l/pocillo + solución de TNF $\alpha$  (11 F-G)  
 Referencia: Soluciones de la serie de dilución preparada a partir de la solución de referencia 50  $\mu$ l/pocillo + suspensión celular 50  $\mu$ l/pocillo + solución de TNF $\alpha$  (112 pg/ml)  
 50  $\mu$ l/pocillo + actinomicina D (4  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l/pocillo, 1-3: series de dilución preparadas a partir de series de dilución independientes;  
 Muestra: soluciones de las series de dilución preparadas a partir de la solución de ensayo 50  $\mu$ l/pocillo + suspensión celular 50  $\mu$ l/pocillo + solución de TNF $\alpha$  (112 pg/ml) 50  $\mu$ l/pocillo + actinomicina D (4  $\mu$ g/ml) 50  $\mu$ l/pocillo, 1-3: series de dilución preparadas a partir de series de dilución independientes.

Procedimiento de tratamiento

Preparar series de dilución independientes de la solución de referencia HUMIRA® y la solución de ensayo, tres repeticiones de cada solución. En la placa de microtitulación, medir 100 µl de medio completo de la 2ª a la 9ª columnas, y a continuación agregar 50 µl de las soluciones de 7,2 µg/ml previamente diluidas en la segunda columna de manera alterna, para que en los pocillos B, D y F haya HUMIRA® de concentración de 2,4 µg/mL y en los pocillos C, E y G habrá una solución de ensayo de 2,4 µg/ml de concentración. Transferir las soluciones concentradas por pares en los pocillos, una solución de referencia y después una solución de ensayo, etc. A partir de estas soluciones, preparar series de dilución de 9 puntos para la preparación de diluciones triples. Para ello, transferir 50 µl de solución del punto de dilución siguiente, un grado más concentrado, a continuación suspender, y descartar el exceso de 50 µl del último pocillo. Transferir 100 µl de solución de TNFα (112 pg/mL) a cada punto de 100 µL de la serie de dilución preparada y después incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Durante el período de incubación, transferir 50 µl de solución de Actinomicina-D a los pocillos de la placa de microtitulación que contiene las células y después transferir la solución de control también a los pocillos apropiados. Después del tiempo de incubación, pipetear 100 µl de cada punto de la serie de dilución de TNFα en los pocillos apropiados de la placa de microtitulación que contiene las células y, a continuación, incubar la placa durante 24 horas a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> y 85% de HR.

Tinción - Día 4

Transferir 25 µl de reactivo AlamarBlue® a cada cámara de la placa y, a continuación, incubar la placa durante 24 horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>, 85% de HR.

Ensayo - Día 5

Detectar la intensidad de fluorescencia de las muestras en la placa con el lector de placas multimodal establecido en modo de fluorescencia, a valores de longitud de onda de 530 nm de extinción y 590 nm de emisión (sensibilidad: 45 nm).

Evaluación

Realizar la evaluación utilizando el software PLA 2.0 (Stegman System, Alemania), basado en el modelo de "curva logística de 5 parámetros (curva completa)". Utilizar la siguiente configuración en el software:

- Análisis: curva logística de 5 parámetros (curva completa)
- Pruebas de hipótesis: ANOVA basado en la separación de errores puros
- Paralelismo: (95% de confianza)

Configuración: Tipo de detección lineal/Intervalo completo

Con base en los valores de fluorescencia medidos por el software, determinar las curvas de efecto de concentración características de la solución de ensayo y la solución de referencia y ajustar la ecuación logística de 5 parámetros en estas curvas aplicando las condiciones dadas. El programa calcula la actividad biológica relativa de la solución de ensayo en relación con la solución de referencia (HUMIRA®) basada en la distancia de la parte lineal de las curvas ajustadas en el eje x.

Además, el software determina los siguientes criterios de adecuabilidad del sistema en base a la prueba F:

Para mediciones paralelas: CV <15%

En el caso de CV > 15%, si se demuestra por la prueba de valores aleatorios de acuerdo con la Farmacopea, que un punto de los paralelos es un valor atípico, se puede retirar manualmente y a continuación se reevalúa la placa.

Regresión: Fregresión > Fcrítica (95%)

Linealidad: Fno-lineal < Fcrítica (95%)

Paralelismo: Fno-paralelo < F crítica (95%)

Intervalo de confianza relativa: entre 74% y 136%

Otros criterios de adecuabilidad del sistema:

- Media de los valores de control de células/Media de los valores de control de ActD debe estar entre 1-1,5;
- Media de los valores de control de TNFα en cada caso debe ser menor que el valor medio correspondiente a la concentración de tratamiento más baja de la solución de referencia;
- Media de los valores de control de la célula en cada caso debe ser mayor que el valor medio correspondiente a la concentración de tratamiento más alta de la solución de referencia.

La determinación de la actividad biológica de las muestras de ensayo a lo largo del tiempo en diferentes condiciones de estrés en comparación con la actividad biológica de la solución de referencia HUMIRA® mostró que cada formulación de

Adalimumab de la presente invención es superior en relación con el tiempo (figura 5B) o sobre la solución de referencia HUMIRA® (figura 5C) en al menos una de las condiciones de almacenamiento y de estrés ensayadas, es decir, después de 3 meses a 5°C y 25°C, después de 6 meses a 5°C y 25°C, después de un ciclo de congelación-descongelación, después de estrés mecánico así como después del estrés térmico a 55°C (figuras 5A-C). Por ejemplo, la formulación tamponada con histidina-acetato sin un estabilizante adicional (ID de muestra NO. #10) mostró la mayor capacidad para neutralizar el TNF $\alpha$  después de 6 meses a 5°C y 25°C, seguido por la formulación tamponada con histidina-acetato con L-Arg (ID de muestra NO: #12) con respecto al punto en el tiempo 0. Además, la formulación tamponada con histidina-acetato con L-Arg (ID de muestra NO: #12) mostró el mejor comportamiento después de 3 meses a 5°C y 25°C, después de un ciclo de congelación-descongelación así como estrés mecánico con relación al punto en el tiempo 0. La formulación tamponada con histidina-citrato sin un estabilizador adicional (ID de muestra NO: #07) mostró la neutralización de TNF $\alpha$  más alta después de 6 meses a 5°C, así como después del estrés térmico a 55°C con relación al punto en el tiempo 0. Todas las formulaciones restantes de Adalimumab muestran tasas similares de degradación al factor de estrés investigado (figuras 5A, B). Con respecto a la formulación de referencia, la formulación tamponada con histidina-acetato sin un estabilizador adicional (ID de muestra NO #10) mostró la mayor capacidad para neutralizar el TNF $\alpha$  después de 6 meses a 5°C y 25°C, seguido de histidina-citrato (ID de muestra NO. #07) después de 6 meses a 5°C. La formulación de tampón de histidina-acetato con L-Arg (ID de muestra NO: #12) mostró el mejor rendimiento en general a todos los factores de estrés investigados (fig. 5A, 5C). Los experimentos resumidos en el Ejemplo 9 y en la figura 5 se realizaron con un segundo lote de formulaciones alternativas de Adalimumab. Los porcentajes de neutralización de TNF $\alpha$  de la formulación alternativa de Adalimumab de la presente invención se expresan en relación con la propiedad de neutralización de TNF $\alpha$  de la solución de referencia HUMIRA®, es decir, valores > 100% indican que la actividad neutralizante relativa de TNF $\alpha$  retenida por la formulación de Adalimumab de la presente invención es mayor que la retenida por la solución de referencia bajo la condición establecida.

En resumen, cada formulación de Adalimumab de la presente invención representa con respecto a su actividad biológica una formulación farmacéutica de anticuerpo estable a almacenamiento líquida mejorada.

#### Referencias

- Arakawa T, Philo JS, Ejima D, Tsumoto K, and Arisaka F (2006). Aggregation analysis of therapeutic proteins, part I. *Bioprocess International* 4 (10), 42-49.
- Chen B, Bautista R, Yu K, Zapata GA, Chamow SM, et al. (2003). Influence of histidine on the stability and physical properties of a fully human antibody in aqueous and solid forms. *Pharm Res* 20:1952-1960.
- Paborji M, Pochopin NL, Coppola WP, Bogardus JB (1994). Chemical and physical stability of chimeric L6, a mouse-human monoclonal antibody. *Pharm Res* 11:764-771.
- Samo MEC, Vasquez RA, Yung S-G, Graf CR (1999). Stable intravenously-administrable immune globulin preparation. *Baxter International Inc, US patent US5945098*.
- EMA/CHMP/BWP/247713/2012 (22.05.2014). Guideline on similar biological medicinal products containing biotechnology-derived proteins as active substance: quality issues (revision 1)
- U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration (February 2012). Guidance for Industry - Scientific Considerations in Demonstrating Biosimilarity to a Reference Product" (DRAFT GUIDANCE).
- Public Health Service (PHS) Act §262. Public Health Service Act, Title 42: The Public Health And Welfare, Chapter 6a: Public Health Service, Subchapter II: General Powers and Duties, Part F: Licensing of Biological Products and Clinical Laboratories, Subpart 1 - Biological Products: §262 Regulation of Biological Products (<http://www.fda.gov/regulatoryinformation/legislation/ucml48717.htm>).
- Kappelgaard AM, Bojesen A, Skydsgaard K, Sjøgren I, Laursen T (2004). Liquid growth hormone: preservatives and buffers. *Horm Res.62 Suppl 3:98-103*.
- Frenken LAI, van Lier HJ, Jordans JG, Leunissen KM, van Leusen R, Verstappen VM, Koene RA (1993). Identification of the component part in an epoetin alfa preparation that causes pain after subcutaneous injection. *Am J Kidney Dis.* 22(4):553-6.
- Fransson J, Espander-Jansson A. Local tolerance of subcutaneous injections (1996). *J Pharm Pharmacol.* 48(10):1012-5.
- Kolhe P, Amend E, Singh SK (2010). Impact of freezing on pH of buffered solutions and consequences for monoclonal antibody aggregation. *Biotechnol Prog.* 26(3):727-33.
- Gatlin LA and Gatlin CAB (1999). Formulation and administration techniques to minimize injection pain and tissue damage associated with parenteral products. In *Injectable Drug Development: Techniques to Reduce Pain and Irritation* (Gupta PK and Brazeau GA eds) Interpharm Press, Denver 401-425.
- Roskos LK, Davis CG and Schwab GM (2004). The clinical pharmacology of therapeutic monoclonal antibodies. *Drug Devel Res* 62(3): 108-120.
- Pennica D, Nedwin GE, Hayflick JS, Seeburg PH, Derynck R, Palladino MA, Kohr WJ, Aggarwal BB, Goeddel DV (1984). Human tumour necrosis factor: precursor structure, expression and homology to lymphotoxin. *Nature* 312 (5996):724-729
- Wang W (1999). Instability, stabilization, and formulation of liquid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 185:129-188.
- Chi EY, Krishnan S, Randolph TW and Carpenter JF (2003). Physical stability of proteins in aqueous solution: mechanism and driving forces in nonnative protein aggregation. *Pharmaceutical Research* 20: 1325-1336.

- Vermeer AWP and Norde W (2000). The thermal stability of immunoglobulin: Unfolding and aggregation of a multi-domain protein. *Biophys J* 76: 394-404.
- Moore JM, Patapoff TW and Cromwell ME (1999). Kinetics and thermodynamics of dimer formation and dissociation for a recombinant humanized monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor. *Biochemistry* 38 (42): 13960-13967.
- 5 Szenczi A, Kardos J, Medgyesi G and Zavodszky N (2006). The effect of solvent environment on the conformation and stability of human polyclonal IgG in solution. *Biologicals* 34(1): 5-14.
- Wan HZ, Kaneshiro S, Frenz J and Cacia J (2001). Rapid method for monitoring galactosylation levels during recombinant antibody production by electrospray mass spectrometry with selective-ion monitoring. *J Chrom A* 913(1-2):437-446.
- 10 Zheng JY, Janis LJ (2005). Influence of pH, buffer species, and storage temperature on physicochemical stability of a humanized monoclonal antibody LA298. *Int J Pharm* 308:46-51.
- Son K, Kwon C. Stabilization of human epidermal growth factor (hEGF) in aqueous formulation (1995). *Pharm Res.*12(3):451-4.
- Bam NB, Randolph TW, Cleland JL (1995). Stability of protein formulations: investigation of surfactant effects by a novel EPR spectroscopic technique. *Pharm Res.* 12(1):2-11.
- 15 Wade AM and Tucker HN (1998). Antioxidant characteristics of L-histidine. *J Nutr Biochem* 9 (6): 308-315.
- International Conference on Harmonization of Technical Requirements of Pharmaceuticals for Human Use. Quality of Biotechnological Products. Stability Testing of Biotechnological/Biological Products (ICH Q5C).
- Cleland JL, Powell MF and Shire SJ (1993). The development of stable protein formulations: A close look at protein aggregation, deamidation, and oxidation. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 10(4): 307-377.
- 20 Carpenter JF, Kendrick BS, Chang BS, Manning MC and Randolph TW (1999). Inhibition of stress-induced aggregation of protein therapeutics. *Meth Enzymol* 309: 236-255.
- Remmele RL Jr, Callahan WJ, Krishnan S, Zhou L, et al (2006). Active dimer of Epratuzumab provides insight into the complex nature of an antibody aggregate. *J Pharm Sci* 95(1): 126-145.
- 25 Chelius D, Rehder DS, Bondarenko PV (2005). Identification and characterization of deamidation sites in the conserved regions of human immunoglobulin gamma antibodies. *Anal Chem.* 77(18):6004-11.

## REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n farmac3utica que est3 libre de un tamp3n de fosfato y se selecciona del grupo que consiste en
- 5 (a) una formulaci3n farmac3utica acuosa l3quida que comprende una cantidad terap3uticamente eficaz de Adalimumab en una soluci3n tamponada que comprende L-Histidina y citrato, teniendo dicha formulaci3n un pH de 5 a 5,5 y un contenido de especies agregadas de Adalimumab despu3s del almacenamiento a 5°C durante 3 a 6 meses de menos de 5%;
- 10 (b) una formulaci3n farmac3utica acuosa l3quida que comprende una cantidad terap3uticamente eficaz de Adalimumab en una soluci3n tamponada que comprende L-Histidina y citrato, teniendo dicha formulaci3n un pH de 5 a 5,5 y un contenido de especies agregadas de Adalimumab despu3s del almacenamiento a 25°C durante 3 a 6 meses de menos de 5%;
- 15 (c) una formulaci3n farmac3utica acuosa l3quida que comprende una cantidad terap3uticamente eficaz de Adalimumab en una soluci3n tamponada que comprende L-Histidina y citrato, teniendo dicha formulaci3n un pH de 5 a 5,5 y un contenido de especies 3cidas de Adalimumab despu3s del almacenamiento a 25°C durante 3 a 6 meses de menos de 40%;
- (d) una formulaci3n farmac3utica acuosa l3quida que comprende una cantidad terap3uticamente eficaz de Adalimumab en una soluci3n tamponada que comprende L-Histidina y citrato, teniendo dicha formulaci3n un pH de 5 a 5,5 y un contenido de especies agregadas de Adalimumab en condiciones de estr3s t3rmico durante 10 minutos a 55°C de menos de 5%;
- 20 (e) una formulaci3n farmac3utica acuosa l3quida que comprende una cantidad terap3uticamente eficaz de Adalimumab en una soluci3n tamponada que comprende L-histidina y citrato, teniendo dicha formulaci3n un pH de 5 a 5,5 y un contenido de especies 3cidas de Adalimumab en condiciones de estr3s t3rmico durante 10 minutos a 55°C de menos de 40%; y
- 25 (f) una formulaci3n farmac3utica acuosa l3quida que comprende una cantidad terap3uticamente eficaz de Adalimumab en una soluci3n tamp3n que comprende L-Histidina y citrato, teniendo dicha formulaci3n un pH de 5 a 5,5 y reteniendo de neutralizaci3n de TNF $\alpha$  de al menos el 80% despu3s de almacenamiento de 6 meses a una temperatura de 5°C o 25°C, y/o despu3s de ser sometida a estr3s t3rmico durante 10 minutos a 55°C, condiciones de congelaci3n-descongelaci3n de -20°C a 5°C y/o estr3s mec3nico;
- 30 en la que la concentraci3n de Adalimumab en la formulaci3n farmac3utica de cualquiera de (a) a (f) es 50 mg/ml y la formulaci3n comprende adem3s un poliol y un tensioactivo que es un polisorbato, y en la que la especie agregada se mide mediante cromatograf3a l3quida de alto rendimiento con exclusi3n por tama3o (HP-SEC) y las especies 3cidas se miden mediante cromatograf3a l3quida de alto rendimiento con intercambio de cationes fuertes (SCX) (SCX-HPLC).
- 35 2. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1, que adem3s es adecuada para inyecci3n subcut3nea de un solo uso y contenida en un recipiente farmac3utico.
3. Recipiente farmac3utico que comprende una formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1 3c 2, en el que el recipiente es una jeringa precargada, una pluma de inyecci3n, una ampolla, una botella, un autoinyector o una bolsa de infusi3n, preferiblemente cerrados bajo una atm3sfera protectora de nitr3geno.
- 40 4. Recipiente, seg3n la reivindicaci3n 3, en el que la dosis de Adalimumab es de 40 mg.
5. Formulaci3n, seg3n la reivindicaci3n 1 3c 2, o el recipiente, seg3n la reivindicaci3n 3 3c 4, para usar como medicamento para usar en el tratamiento de un trastorno en el que la actividad de TNF $\alpha$  es perjudicial, preferiblemente en la que el trastorno en el que la actividad de TNF $\alpha$  es perjudicial se selecciona del grupo que consiste en un trastorno autoinmune o inflamatorio.
- 45 6. Formulaci3n o recipiente para usar, seg3n la reivindicaci3n 5, en la que la formulaci3n se dise3a para administrarse subcut3neamente al sujeto humano con necesidad de la misma en un r3gimen de dosificaci3n bisemanal de cada 13-15 d3as.
- 50 7. Formulaci3n o recipiente para usar, seg3n la reivindicaci3n 5 3c 6, en la que la formulaci3n se administra en combinaci3n con un agente terap3utico adicional que inhibe la producci3n o actividad de TNF $\alpha$ , preferiblemente metotrexato.

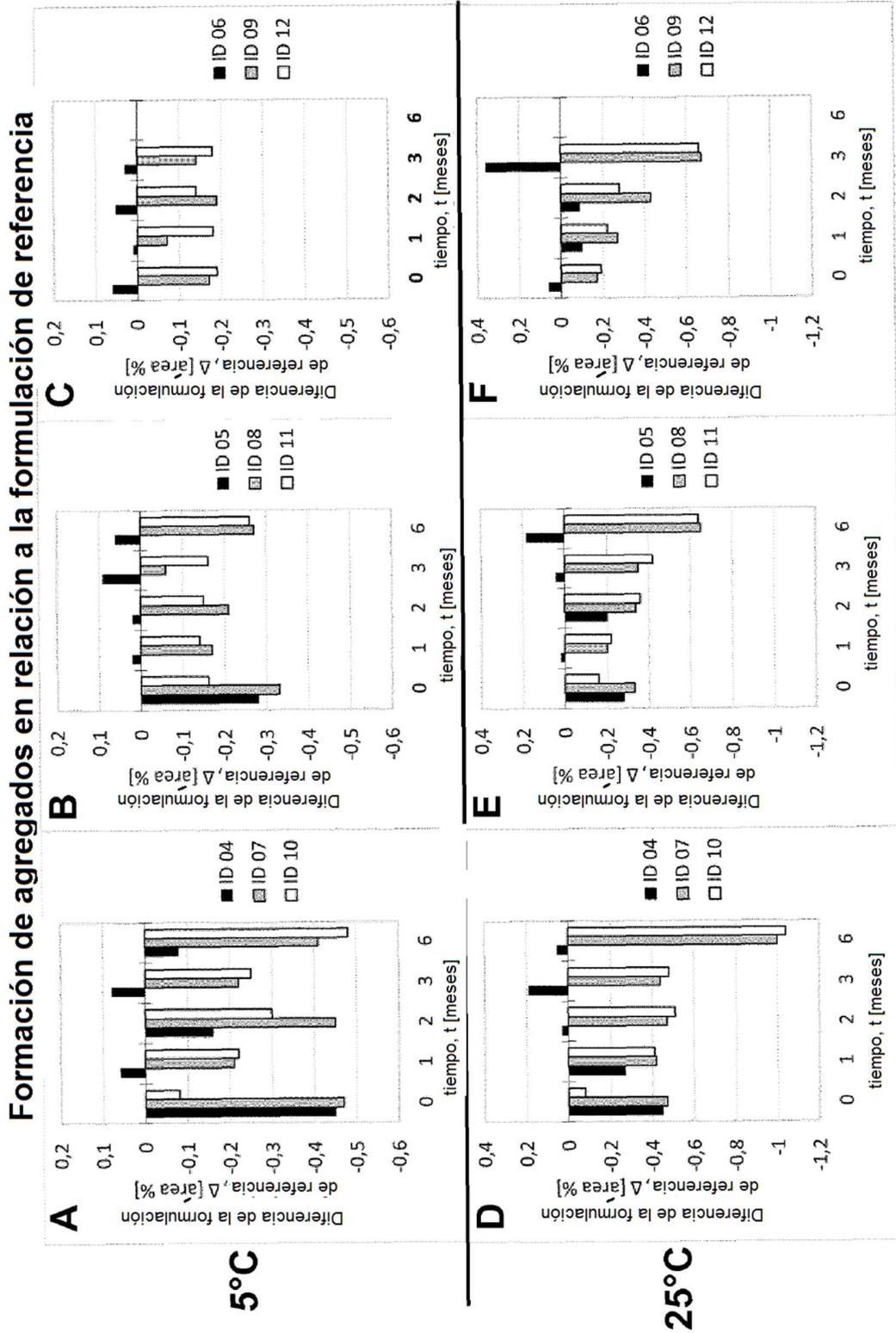
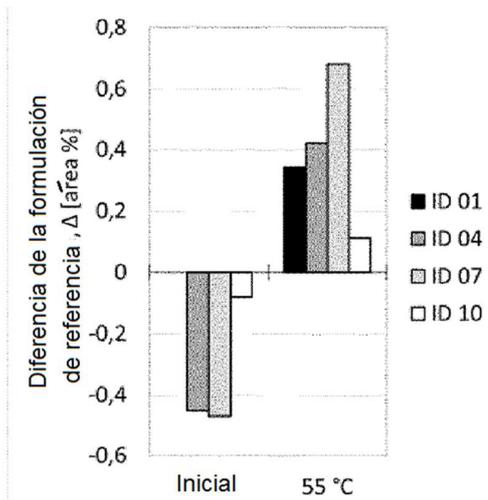


Figura 1

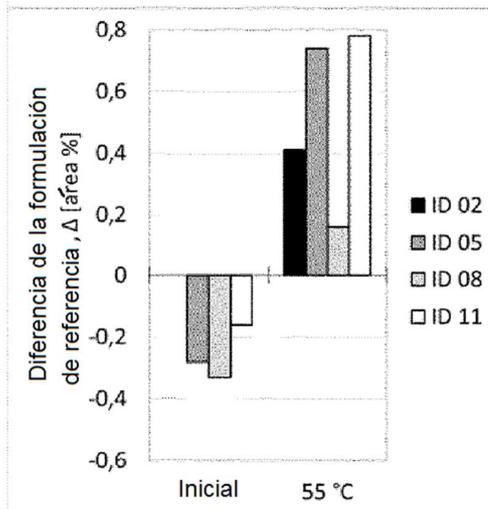
**A**

Formulación			Agregados [Área%] a 55°C			
ID	Tampón	Estabilizante	Inicial		55 °C	
			[Área%]	Δ	[Área%]	Δ
01	Citrato-Fosfato		4,10	0	4,44	0,34
04	Citrato		3,65	-0,45	4,07	0,42
7	Histidina-Citrato		3,63	-0,47	4,31	0,68
10	Histidina-Acetato		4,02	-0,08	4,13	0,11
02	Citrato-Fosfato	EDTA	4,10	0	4,51	0,41
05	Citrato	EDTA	3,82	-0,28	4,56	0,74
08	Histidina-Citrato	EDTA	3,77	-0,33	3,93	0,16
11	Histidina-Acetato	EDTA	3,94	-0,16	4,72	0,78

**B**



**C**



**Figura 2**

Impurezas ácidas con respecto a la formulación de referencia

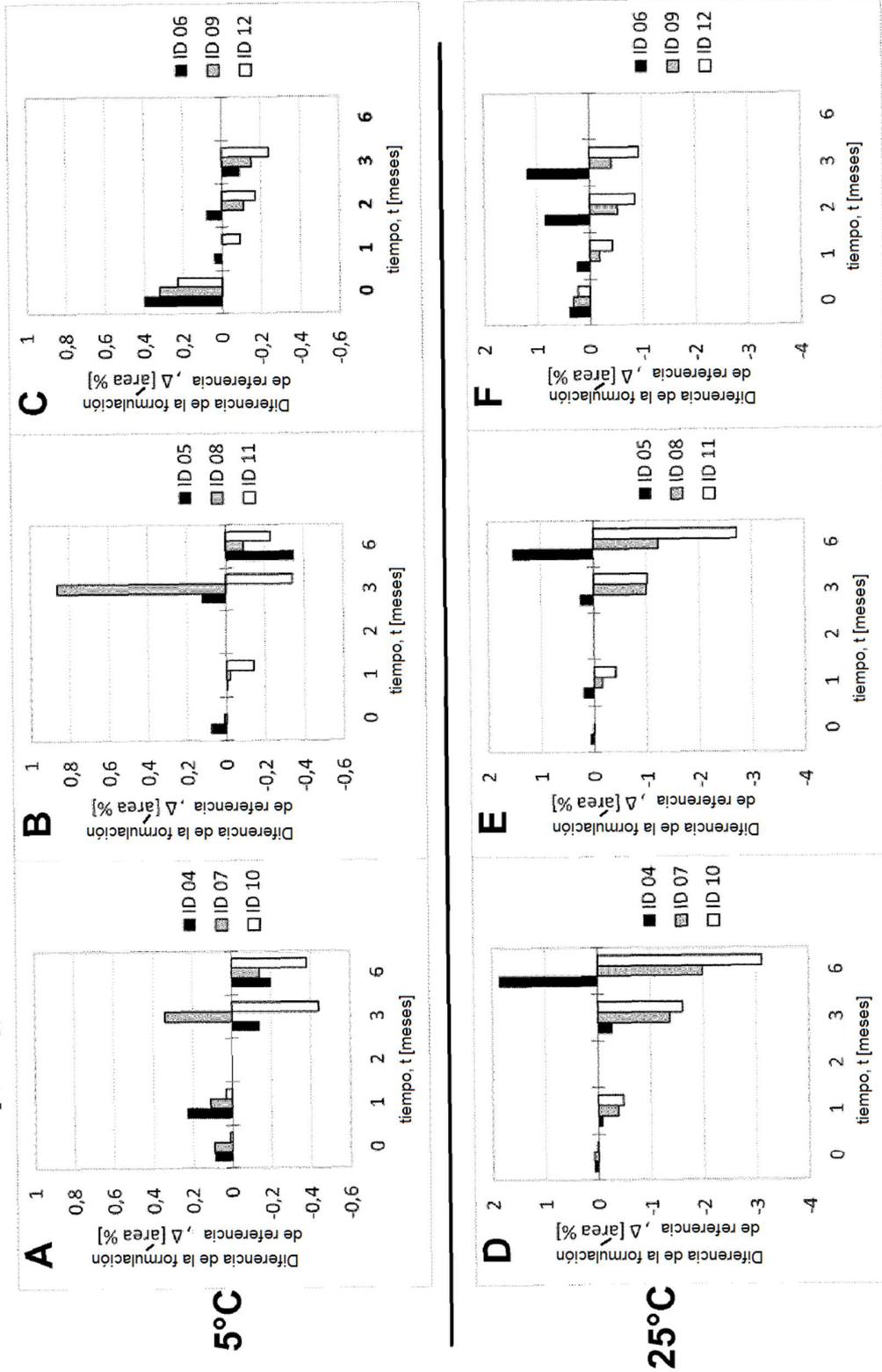
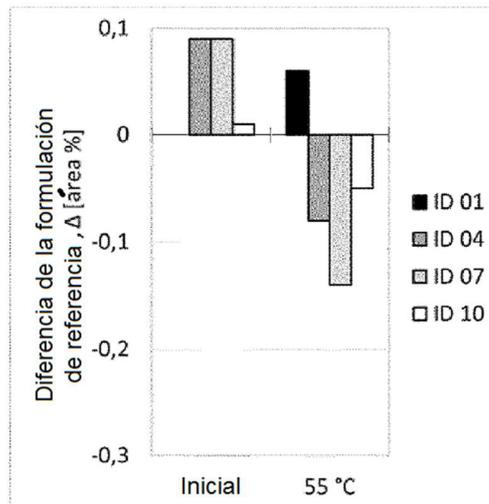


Figura 3

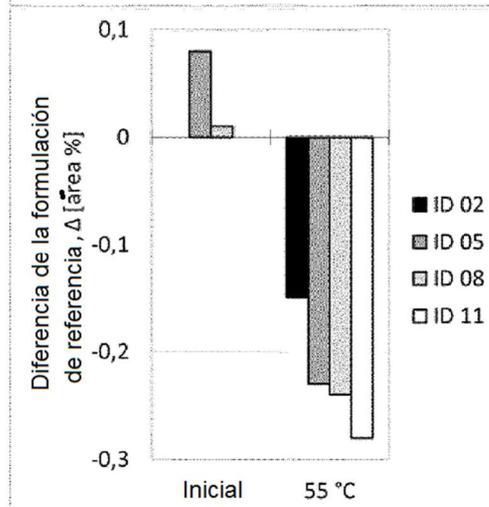
**A**

Formulación			Impurezas ácidas [Área%] a 55°C			
ID	Tampón	Estabilizante	Inicial		55 °C	
			[Área%]	$\Delta$	[Área%]	$\Delta$
01	Citrato-Fosfato		32,25	0	32,31	0,06
04	Citrato		32,34	0,09	32,26	-0,08
7	Histidina-Citrato		32,34	0,09	32,2	-0,14
10	Histidina-Acetato		32,26	0,01	32,21	-0,05
02	Citrato-Fosfato	EDTA	32,30	0	32,15	-0,15
05	Citrato	EDTA	32,38	0,08	32,15	-0,23
08	Histidina-Citrato	EDTA	32,31	0,01	32,07	-0,24
11	Histidina-Acetato	EDTA	32,30	0,00	32,02	-0,28

**B**



**C**



**Figura 4**

**A**

neutralización de TNF-alfa (%)									
ID	0 meses	3 meses 5 °C	6 meses 5 °C	3 meses 25 °C	6 meses 25 °C	congelación- descongelación	mecánico	estrés térmico 55 °C	
01	101,5	100,4	106,19	92,8	104,22	101,3	102	110,2	
10	104,2	79,4	98,42	95,1	94,56	109,9	101,8	105,3	
12	86	93,6	102,19	93,6	105,58	106,9	106	99,9	
07	92,2	91,4	106,17	91,9	89,33	90,71	87,1	110,4	
09	111,9	96,3	95,56	101,2	100,15	109,5	100,7	112,8	

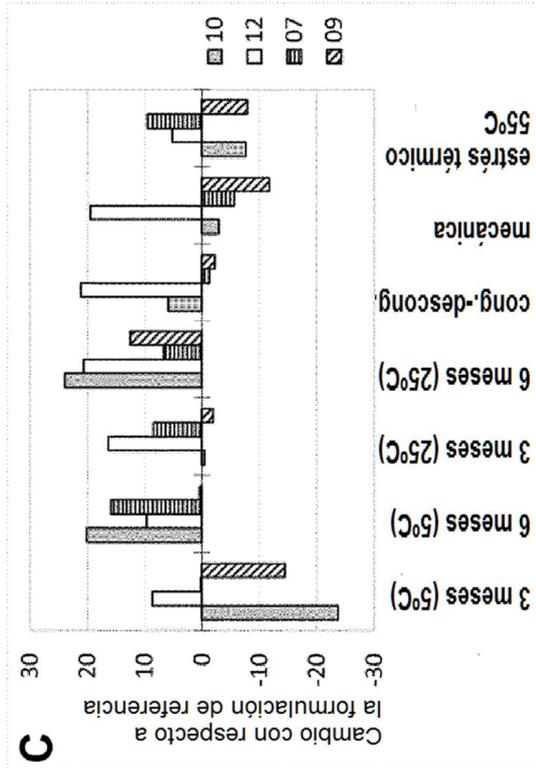
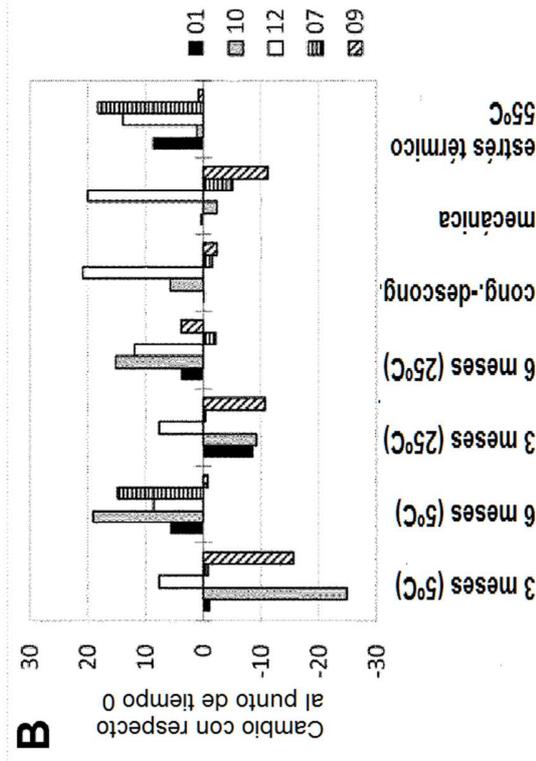


Figura 5