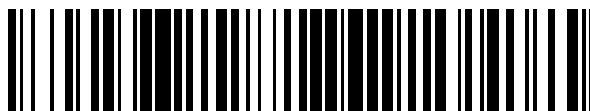


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 705 538**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/24 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **30.01.2013 PCT/GB2013/050211**

87 Fecha y número de publicación internacional: **08.08.2013 WO13114112**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **30.01.2013 E 13703468 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.10.2018 EP 2809350**

54 Título: **Composiciones acuosas de anticuerpo estabilizadas**

30 Prioridad:

30.01.2012 US 201261592323 P

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

25.03.2019

73 Titular/es:

**ARECOR LIMITED (100.0%)
Chesterford Research Park
Little Chesterford, Saffron Walden CB10 1XL, GB**

72 Inventor/es:

**CASY, GUY;
DERHAM, BARRY KINGSTON;
JEZEK, JAN y
ROYLE, NIKKI**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 705 538 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

Composiciones acuosas de anticuerpo estabilizadas

Antecedentes de la invención

Aunque una diversidad de procesos químicos, tales como oxidación, desamidación e isomerización de aspartato puede afectar a los atributos de calidad de las proteínas terapéuticas, tales como anticuerpos, la agregación de proteínas es posiblemente el proceso más común que afecta a la estabilidad de las proteínas. Típicamente, la agregación se ve exacerbada y este es el mecanismo de degradación clave de las proteínas formuladas en disolución acuosa a concentraciones elevadas, tal como 10 mg/ml o más. Durante el almacenamiento, la agregación puede conducir a un nivel inaceptablemente elevado de especies de peso molecular elevado (HMWS) en la formulación o a la formación de agregados insolubles de tamaño mayor (partículas). Dichas formulaciones contaminadas pueden encontrarse fuera de la especificación establecida por U.S. Food and Drug Administration y otras autoridades reguladoras farmacéuticas.

En cierto modo, la agregación de proteínas se puede controlar por medio de la optimización de diversos parámetros de la composición de proteínas. Por ejemplo, los métodos para controlar la velocidad de agregación pueden implicar la optimización de pH, adición de un quelante de iones metálicos o adición de un tensioactivo.

El fuerza iónica de la composición también puede afectar a la velocidad de agregación en las composiciones acuosas de proteínas. El desarrollo de las formulaciones convencionales para una proteína terapéutica, por tanto, típicamente incluye el tamizado de los modificadores de tonicidad, que pueden estar seleccionados entre especies químicas no modificadas, tales como azúcares, o una especie química cargada, tal como una sal orgánica o inorgánica. Típicamente, se prefiere un modificador de tonicidad no cargado si la velocidad de agregación es más baja en las composiciones de fuerza iónica baja, mientras que se prefiere un modificador de tonicidad cargado si la velocidad de agregación es más baja en las composiciones de fuerza iónica más elevada. Típicamente, los modificadores de tonicidad usados en las composiciones acuosas de proteína para aplicaciones terapéuticas incluyen cloruro sódico. Los modificadores de tonicidad no cargados típicos incluyen sacarosa, trehalosa, glicerol y manitol.

La agregación de proteínas es un proceso muy complejo, que implica un número de mecanismos diferentes. No obstante, se piensa que dos tipos dominantes de interacciones no covalentes conducen a la agregación de proteínas: (1) interacciones hidrófobas entre las partes no polares de las moléculas de proteína, e (2) interacciones carga-carga entre las regiones cargadas de las moléculas de proteína. Se piensa que en aquellos casos en los que la velocidad de agregación es más baja en las composiciones de fuerza iónica más elevada que en las composiciones de fuerza iónica más baja, la causa clave de la agregación se debe a las interacciones carga-carga entre las moléculas de proteína.

No obstante, también es de importancia crítica que las disoluciones y composiciones que sean capaces de controlar la agregación de proteína exhiban un perfil de toxicidad favorable, si se van a usar en aplicaciones terapéuticas. De este modo, cualesquiera aditivos que se pueden usar para reducir la velocidad de agregación de proteínas deben presentar por sí mismos un perfil de toxicidad favorable.

Como tal, existe una demanda de métodos mejorados para preparar disoluciones de proteínas estables y altamente concentradas, en particular disoluciones de anticuerpos altamente concentradas que tengan un perfil de toxicidad favorable y para uso apropiado en aplicaciones terapéuticas.

El documento US 2007/0036866 (Kissel et al.) describe polímeros de bloques catiónicos que comprenden residuos de PEI y PEG. El documento WO 2006/096461A2 (Pharmacia & Upjohn Company LLC) divulga composiciones de anticuerpos anti-M-CSF que comprenden un agente quelante y/o histidina. El documento WO 2001/141926A2 (Intas Biochemicals Limited) describe formulaciones líquidas de un polipéptido que contiene un dominio Fc de una inmunoglobulina, que se dice que está estabilizada para mantener la actividad del polipéptido que contiene un dominio Fc durante un período de tiempo prolongado. Veronika Knorr et al. (Pharmaceutical Research, Vol. 25, No. 12, 2008, pp 2937-2945) describen la síntesis de un copolímero de oligoetilenimina-poli(etilenglicol) basado en cetil sensible a ácido, que se dice que interviene en la mediación de una eficiencia de transfección mejorada con menor toxicidad. Alexander Philipp et al. (Reactive and Functional Polymers, Vol. 71, 2011, pp 288-293) describen la modificación funcional de oligoetilenimina reticulada con amida para un suministro mejorado de ARNs. Laura Mazzaferro et al. (International Journal of Biological Macromolecules, Vol. 47, 2010, pp 15-20) describen una evaluación de estabilidad de proteínas de siete proteínas modelo en presencia de una polietilenimina de bajo peso molecular (PEI, PM 2000Da). Nobuhiro Nishiyama Amida et al. (Journal of Controlled Release, Vol. 115, 2006, pp 208-215) describen un estudio en el que se sometieron a formación de complejos una serie de policatiómeros basados en PEG polietilenglicol con un número creciente de unidades de repetición de etilendiamina en una cadena lateral de policatiómeros con ADNp para poliplejos PEGilados como vehículo genético biocompatible. El documento WO 2005/072121A2 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) divulga polialquilen poliaminas con sustitución de ácido carboxílico en las que los átomos de nitrógeno de amina sobre la estructura de cadena principal de poliamina están sustituidos por grupos guanidina proporcionando un intervalo de pH que se extiende hasta valores de pH elevado. Se dice que las poliaminas modificadas son útiles como anfóteros de vehículo en enfoque isoeléctrico.

Xiofei Yuan et al. (Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, Vol. 92, 2012, pp 25-29) describen la modificación de superficie química de submicropartículas de poliestireno carboxilado (sMPs) con alfa-metoxi-poli(etilen glicol)-pentaetilenhexamina (mPEG-N6), que posee múltiples grupos terminales de amina en un extremo, que se exploró con respecto a la eficiencia de modificación. Xiofei Yuan et al. (Analytical Chemistry, Vol. 81, No. 4, 2009, pp 1549-1556) describen la modificación de la superficie de nanoesferas basadas en un complejo de nanoesfera/anticuerpo, poli(etilen glicol) con terminación de pentaetilenhexamina, N6-PEG que comprende N6-PEG- 5k (Mn = 6000 g/mol) y N6-PEG-2k (Mn = 2000 g/mol). El documento WO 2010/062896A1 (Abbott Laboratories) divulga composiciones y métodos que se dice que inhiben la separación de las inmunoglobulinas que comprenden una cadena ligera lambda, basada en la observación de que hierro, en presencia de histidina, tiene como resultado una fragmentación mayor de la molécula de IgG recombinante completamente humana que contiene una cadena ligera lambda debido a la escisión en la región de charnela.

Sumario de la invención

La presente invención aborda el problema de la agregación de proteínas de anticuerpo, en particular, proteínas de anticuerpo a concentraciones elevadas. La presente invención también aborda el problema de proporcionar disoluciones de anticuerpo concentradas que exhiben perfiles de toxicidad favorables y son apropiadas para su uso en aplicaciones terapéuticas. Se espera que la solicitud de la presente invención tenga como resultado una reducción considerable de la velocidad de agregación en composiciones acuosas de proteína de anticuerpos, al tiempo que proporciona composiciones con perfiles de toxicidad favorables y puede, por tanto, ser de utilidad en aplicaciones terapéuticas. La presente invención también aborda el problema de la auto-asociación de proteínas de anticuerpo y en composiciones acuosas de proteínas de anticuerpo, en particular a concentraciones elevadas de proteína de anticuerpo, al tiempo que proporciona composiciones terapéuticamente eficaces de proteínas de anticuerpo que exhiben perfiles de toxicidad favorables.

En una realización, la invención se refiere a una disolución acuosa que comprende una proteína de anticuerpo a una concentración de al menos aproximadamente 10 mg/ml y un oligómero de etilenimina, en el que el oligómero de etilenimina es trietilenimina y en el que el pH de la disolución está dentro del intervalo de 5,0 a 7,5.

En una realización, la invención proporciona un método de reducción de la velocidad de agregación de una proteína de anticuerpo en disolución acuosa a una concentración de al menos aproximadamente 10 mg/ml. El método comprende la etapa de adición a la disolución de un oligómero de etilenimina, donde el oligómero de etilenimina es trietilentetramina y donde el pH de la disolución está dentro del intervalo de 5,0 a 7,5.

También se divulga un método de reducción de la velocidad de aumento de viscosidad durante el almacenamiento, de una disolución acuosa de proteína de anticuerpo a una concentración de anticuerpo de al menos aproximadamente 10 mg/ml. El método comprende la etapa de adición a la disolución de un oligómero de etilenimina, donde el número de unidades de repetición de etilenimina (n) en el oligómero está dentro del intervalo de 2-12.

También se divulga un método de reducción de la velocidad de fragmentación no deseada de las proteínas de anticuerpo en disolución acuosa a una concentración de al menos aproximadamente 10 mg/ml, tal y como se detecta por medio de la formación de especies de bajo peso molecular durante el almacenamiento. En particular, dicha separación no deseada puede tener lugar en proteínas de fusión que comprenden más de un fragmento de anticuerpo. El método comprende la etapa de adición a la disolución de un oligómero de etilenimina; donde el número de unidades de repetición de etilenimina (n) en el oligómero está dentro del intervalo de 2-12.

Cabe esperar que las disoluciones y composiciones de las realizaciones descritas en la presente memoria demuestren perfiles de toxicidad favorables y, por tanto, resulten apropiadas para aplicaciones terapéuticas.

Breve descripción de los dibujos

Las Figuras 1A-1C muestran el efecto de los oligómeros de etilenimina sobre la velocidad de agregación en formulaciones de rituximab a 40 °C.

La Figura 2 muestra el efecto del tamaño de PEI sobre el efecto citotóxico en células HEK 293 y Vero.

La Figura 3 muestra el efecto del tamaño de oligómero de etilenimina sobre la inhibición de células Vero. El número después del punto indica el peso molecular (Da) del oligómero o polímero considerado.

La Figura 4 muestra el efecto del tamaño de oligómero de etilenimina sobre la inhibición de células MDCK. El número después del punto indica el peso molecular (Da) del oligómero o polímero considerado.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere al descubrimiento de que los oligómeros de etilenimina en los que n = 2-12, y específicamente trietilenimina, estabilizan disoluciones de anticuerpo altamente concentradas (es decir, concentraciones de al menos aproximadamente 10 mg/ml), al tiempo que se espera que exhiban un perfil de toxicidad favorable. En particular, cabe esperar que los oligómeros de etilenimina de la presente invención, específicamente

trietilentetramina, exhiban un perfil de toxicidad más favorable que los homólogos superiores (por ejemplo, polietileniminas, con peso mayor de 600 Da).

Debido a este perfil de toxicidad favorable esperado, la presente invención resulta particularmente aplicable a composiciones acuosas de proteínas de anticuerpo para aplicaciones terapéuticas.

- 5 En comparación con los métodos existentes para estabilizar formulaciones acuosas de concentración elevada de proteínas de anticuerpo, en particular con respecto a una menor velocidad de agregación y auto-asociación reversible, la presente invención ofrece varias ventajas. Por ejemplo, la presente invención debería permitir un enfoque más racional para el desarrollo de la formulación, precisando menos ensayo y error en el diseño de las formulaciones de ensayo. A su vez, esto permite una ruta acelerada de menor coste hasta una formulación optimizada que cumple los
- 10 requisitos de rendimiento clave de estabilidad de almacenamiento e idoneidad para la inyección subcutánea a bajo volumen.

En comparación con los métodos de la técnica anterior, los beneficios de estabilidad y el perfil de toxicidad favorable esperado que muestra la presente invención deberían permitir el uso de formulaciones acuosas de concentración más elevada de proteínas de anticuerpo terapéuticamente importantes.

- 15 La expresión "proteína de anticuerpo", tal y como se usa en la presente memoria, hace referencia a un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo conjugado con un resto activo, una proteína de fusión que comprende uno o más fragmentos de anticuerpo, tal como un dominio Fc de inmunoglobulina, o un derivado de cualquiera de los anteriormente mencionados. Los ejemplos de derivados incluyen derivados conjugados, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo conjugado con otro resto. Dichos restos incluyen polímeros químicamente inertes tales como
- 20 PEG. Los anticuerpos preferidos incluyen anticuerpos monoclonales y anticuerpos policlonales, preferentemente anticuerpos monoclonales. Los anticuerpos monoclonales pueden ser, por ejemplo, de mamíferos o aves, quiméricos, por ejemplo, quimeras de humano/primate o humano/ratón, anticuerpos humanizados o anticuerpos completamente humanizados. Los anticuerpos apropiados incluyen una inmunoglobulina, tal como IgG, incluyendo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, IgM, IgA, tal como IgA₁ o IgA₂, IgD, IgE o IgY. Los anticuerpos apropiados también incluyen anticuerpos de
- 25 cadena individual. También se incluyen fragmentos de anticuerpo que incluyen fragmentos de Fe, Fab, Fab₂, ScFv y similares. También se engloban anticuerpos de dominio individual que incluyen nanocuerpos.

Preferentemente, la proteína de anticuerpo es una proteína de anticuerpo terapéutica. Dicha proteína de anticuerpo tiene una actividad profiláctica o terapéutica deseada y está indicada para el tratamiento, inhibición o prevención de una enfermedad o trastorno médico.

- 30 El término "PEI" hace referencia a polietilenimina, un polímero de etilendiamina que contiene grupos de repetición que opcionalmente se pueden derivatizar.

El término "OEI" hace referencia a un oligómero de etilenimina, que contienen 2-12 unidades de repetición que opcionalmente se pueden derivatizar.

- 35 La expresión "disolución acuosa", tal y como se usa en la presente memoria, hace referencia a una disolución en agua, preferentemente agua destilada, agua desionizada, agua para inyección, agua estéril para inyección o agua bacteriostática para inyección. Las disoluciones acuosas de la invención incluyen una proteína de anticuerpo, un oligómero de etilenimina que es trietilentetramina y, opcionalmente, uno o más aditivos y/o excipientes. Las disoluciones acuosas también pueden incluir uno o más componentes, tales como aditivos o excipientes, que están parcialmente disueltos o no disueltos. La presencia de dicho componente o componentes tiene como resultado una
- 40 composición de multi-fase, tal como una suspensión o emulsión. Preferentemente, la disolución acuosa de la invención es una disolución homogénea, como viene determinado a simple vista o por medio de dispersión de luz.

- Un oligómero de etilenimina en el que el número de unidades de repetición de etilenimina (n) en el oligómero está dentro del intervalo 2-12, típicamente consiste esencialmente en, o comprende, un resto de fórmula $-(CH_2CH_2NH)_n-$ en la que n está dentro del intervalo 2-12, o un derivado ramificado del mismo. Un oligómero de
- 45 etilenimina lineal contiene únicamente grupos amino secundarios (sin considerar las funcionalidades terminales del oligómero), mientras un oligómero ramificado de polietileno puede contener grupos amino primarios, secundarios y terciarios.

- Se puede añadir trietilentetramina a la disolución acuosa o composición de la invención en forma de base libre o en forma de sal. El pH de la disolución acuosa o composición es, de forma preferida, suficientemente bajo como para que
- 50 al menos una parte de la disolución de los grupos básicos de trietilenimina estén protonados en disolución. El pH de la disolución acuosa o composición de acuerdo con la invención está dentro del intervalo de 5,0 a 7,5, por ejemplo de 5,5 a 7,0. Preferentemente el pH de la disolución acuosa o composición de acuerdo con la invención está dentro del intervalo de 5,5 a 6,0, de 6,0 a 6,5 o de 6,5 a 7,0.

- También se puede añadir trietilentetramina a la disolución acuosa o composición en forma de sal de un ácido apropiado, tal como un ácido farmacéuticamente aceptable. Los ácidos apropiados incluyen ácido clorhídrico, ácido bromhídrico, ácido cítrico, ácido láctico, ácido tartárico, ácido fosfórico, ácido metanosulfónico, ácido acético, ácido fórmico, ácido maleico, ácido fumárico, ácido málico, ácido succínico, ácido malónico, ácido sulfúrico, ácido L-
- 55

glutámico, ácido tartárico, ácido L-aspartico, ácido pirúvico, ácido mícico, ácido benzoico, ácido glucurónico, ácido oxálico y ácido ascórbico. En una realización, el ácido es un poliacido que comprende dos o más grupos ácidos.

En una realización, un 50-100 % de los centros de nitrógeno básico de trietilentetramina están protonados. En una realización adicional, un 80-100 % de los centros de nitrógeno básico de trietilentetramina están protonados. Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se contempla que cuando al menos un 95 % de los centros de nitrógeno básico del oligómero de etilenimina están protonados, la elevada densidad de carga en la superficie de proteína de anticuerpo queda enmascarada, inhibiéndose de este modo la agregación de la proteína de anticuerpo. En particular, sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se contempla que los parches negativamente cargados en la superficie de proteína del anticuerpo quedan enmascarados por el oligómero de etilenimina, inhibiendo de este modo la agregación accionada por la carga de la proteína de anticuerpo.

En una realización, el pH de la disolución acuosa que comprende una proteína de anticuerpo está por debajo del punto isoelectrico (pI) de la proteína. En una realización, el pI de la proteína de anticuerpo es más elevado que el pH de la disolución, de manera apropiada, al menos 0,5 unidades más elevado, de manera más apropiada entre 0,5 y 5 unidades más elevado, incluso de manera más apropiada entre 1 y 3 unidades más elevado. En una realización, el pI de la proteína de anticuerpo es de al menos 7, por ejemplo, dentro del intervalo de 7-10 o 7,5-9.

En una realización, la disolución acuosa que comprende una proteína de anticuerpo es isotónica. En una realización, la disolución acuosa que comprende una proteína de anticuerpo es hipertónica. En una realización, la disolución acuosa que comprende una proteína de anticuerpo es hipotónica.

Trietilentetramina está presente en la composición a una concentración que es suficiente para proporcionar la estabilidad deseada. En una realización, la concentración de trietilentetramina es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/ml, por ejemplo de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mg/ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,25 mg/ml, de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1 mg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 mg/ml, de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 mg/ml, o de aproximadamente 5 a aproximadamente 10 mg/ml. En una realización, la concentración de trietilentetramina es de aproximadamente 0,2 mg/ml a aproximadamente 2 mg/ml. Tal y como se usa en la presente memoria, la masa de trietilentetramina en la composición de la invención hace referencia al equivalente de base libre, es decir, no incluye ningún contra anión, si estuviera presente.

En determinadas realizaciones, la relación (peso/peso) de proteína de anticuerpo con respecto a trietilentetramina es de al menos 10, por ejemplo, de al menos 20. En determinadas realizaciones la relación en peso de proteína con respecto a trietilentetramina es de aproximadamente 20 a aproximadamente 300, preferentemente de aproximadamente 50 a aproximadamente 200. En determinadas realizaciones, la relación en peso de proteína con respecto a trietilentetramina es de aproximadamente 100. En determinadas realizaciones, la relación en peso de proteína con respecto a trietilentetramina puede ser mayor de 300, por ejemplo, hasta 500, 800 o 1000. En una realización, la relación (peso/peso) de proteína de anticuerpo con respecto a trietilentetramina es de aproximadamente 100 a aproximadamente 200.

Preferentemente, las disoluciones de la invención comprenden un tampón. Típicamente, el tampón está seleccionado para proporcionar un pH que permita la disolución de la proteína en la concentración deseada. Preferentemente, el pH es suficientemente bajo de forma que al menos una parte de los grupos básicos del oligómero de etilentetramina estén protonados. El tampón también se puede seleccionar para mejorar la estabilidad de la proteína.

Los presentes inventores han investigado el efecto del tamaño de los oligómeros y polímeros de etilenimina sobre la citotoxicidad, tal y como se describe en los Ejemplos 7 y 8. Los resultados se ilustran en las Figuras 2, 3 y 4, y claramente demuestran que a medida que aumenta el tamaño de la polietilenimina, también lo hace su efecto citotóxico. La citotoxicidad decreciente queda demostrada para polietilenimina de peso de aproximadamente 50.000 Da que disminuye hasta aproximadamente 800 Da (véase Ejemplo 7). Esta tendencia de citotoxicidad decreciente se puede extrapolar de manera razonable para sugerir que los oligómeros de etilenimina en los que el número de unidades de repetición de etilenimina (n) en el oligómero está dentro del intervalo de 2-12 (es decir, de peso < 800 Da) tendrían una citotoxicidad incluso más baja. De hecho, la citotoxicidad decreciente queda demostrada de forma adicional hasta aproximadamente 100 Da (véase Ejemplo 8). Sin pretender quedar ligado a teoría alguna, los presentes inventores piensan que los oligómeros de etilenimina en los que el número de unidades de repetición de etilenimina (n) en el oligómero está dentro del intervalo 2-12 tienen un tamaño suficiente para enmascarar regiones de la superficie de proteína de anticuerpo que tienen una densidad de carga elevada, solucionando de este modo el problema de la agregación de proteína de anticuerpo en las disoluciones concentradas. En particular, sin pretender quedar ligado a teoría alguna, se contempla que los oligómeros de etilenimina en los que n = 2-12 son de tamaño suficiente para enmascarar los parches de la proteína de anticuerpo que tienen una densidad de carga negativa, solucionando de este modo el problema de agregación de proteína de anticuerpo accionada por carga en las disoluciones concentradas. Además, como resultado de los estudios de los inventores (véase Figuras 2, 3 y 4), y de nuevo sin pretender quedar ligado a teoría alguna, los presentes inventores piensan que los oligómeros de etilenimina en los que el número de unidades de repetición de etilenimina (n) en el oligómero está dentro del intervalo de 2-12 son también de tamaño pequeño suficiente para evitar ejercer cualquier efecto tóxico asociado a la alteración de las

membranas celulares. Por tanto, dichos oligómeros pueden reducir la agregación en disoluciones concentradas de proteína de anticuerpo al tiempo que exhiben un perfil de toxicidad favorable. Por consiguiente, dichos oligómeros son de uso particular en aplicaciones terapéuticas.

5 Tal y como se describe en los Ejemplos 1-6, se ha encontrado que un oligómero de etilenimina definido como en la presente memoria puede reducir significativamente la velocidad de agregación de proteína de anticuerpo en una composición, tal como una disolución acuosa de proteína de anticuerpo, en comparación con una composición similar o idéntica pero que carece de dicho oligómero de etilenimina, tras almacenamiento en las mismas condiciones y durante la misma duración de tiempo.

10 En una realización de la divulgación, la presencia de un oligómero de etilenimina en el que el número de unidades de repetición de etilenimina (n) en el oligómero se encuentra dentro del intervalo 2-12 en una disolución acuosa concentrada de proteína de anticuerpo limita el aumento de las especies de proteína de peso molecular elevado a no más de un 5 % (en peso de la proteína total) tras el almacenamiento a 40 °C durante un mes, de manera

15 apropiada a no más de un 3 % y de manera más apropiada a no más de un 2 %. En una realización de la divulgación, la presencia de un oligómero de etilenimina en el que el número de unidades de repetición de etilenimina (n) en el oligómero se encuentra dentro del intervalo 2-12 en una disolución acuosa concentrada de proteína de anticuerpo limita el aumento de las especies de proteína de peso molecular elevado a no más de un 5 % (en peso de la proteína total) tras el almacenamiento a 2-8 °C durante dos años, de manera apropiada a no más de un 3 % y de manera más apropiada a no más de un 2 %. La cuantificación de las especies de peso molecular elevado es un porcentaje en peso de la proteína total en la composición.

20 En una realización de la divulgación, la presencia de un oligómero de etilenimina en el que el número de unidades de repetición de etilenimina (n) en el oligómero se encuentra dentro del intervalo 2-12 en una disolución acuosa concentrada de proteína de anticuerpo limita el aumento de las especies de proteína de peso molecular elevado en un 10 %, preferentemente en al menos un 25 %, y más preferentemente en al menos un 50 %, en comparación con una composición idéntica pero que carece del oligómero de etilenimina, tras el almacenamiento en las mismas condiciones y duración de tiempo.

25 En una realización de la divulgación, la presencia de un oligómero de etilenimina en el que el número de unidades de repetición de etilenimina (n) en el oligómero se encuentra dentro del intervalo 2- 12 en una disolución acuosa concentrada de proteína de anticuerpo mantiene una composición acuosa de proteína libre de agregados visibles al tiempo que se aprecia la formación de agregados visibles en una composición idéntica pero que carece del oligómero de etilenimina, tras almacenamiento en las mismas condiciones y durante la misma duración de tiempo. La cuantificación de agregados visibles se puede llevar a cabo por medio de turbidez u otros tipos de mediciones de dispersión de luz.

30 En determinadas realizaciones, el anticuerpo está fusionado o conjugado con una molécula activa, tal como una toxina o un agente quelante capaz de unirse a un ion metálico radioactivo, tal como ⁹⁹Tc, ¹¹¹Ir, ¹³¹I o ⁹⁰Y. En dichas realizaciones, el anticuerpo típicamente funciona como un agente de dirección, por ejemplo, para dirigir la molécula activa hasta células que muestran una determinada proteína de superficie celular.

35 Los anticuerpos específicos que se pueden formular tal y como se describe en la presente memoria incluyen, pero sin limitación, infliximab (anticuerpo quimérico, anti-TNFα), adalimumab (anticuerpo humano, anti- TNFα), basiliximab (anticuerpo quimérico, anti-IL-2), abciximab (anticuerpo quimérico, anti- GpIIb/IIIa), daclizumab (anticuerpo humanizado, anti-IL-2), gemtuzumab (anticuerpo humanizado, anti-CD33), alemtuzumab (anticuerpo humanizado, anti-CD52), edrecolomab (Ig2a murino, anti- EpCAM), rituximab (anticuerpo quimérico, anti-CD20), palivizumab (anticuerpo humanizado, anti-virus sincitial respiratorio), trastuzumab (anticuerpo humanizado, receptor anti-HER2/neu(erbB2)), bevacizumab (anticuerpo humanizado, anti-VEGF), cetuximab (anticuerpo quimérico, anti-EGFR), eculizumab (anticuerpo humanizado, proteína de sistema anti-complemento C5), efalizumab (anticuerpo humanizado, anti-CD 11a), ibritumomab (anticuerpo murino, anti-CD20), muromonab-CD3 (anticuerpo murino, receptor CD3 anti-célula T), natalizumab (anticuerpo humanizado, anti-α4 integrina), nimotuzumab (IgG1 humanizado, receptor anti-EGF), omalizumab (anticuerpo humanizado, anti-IgE), panitumumab (anticuerpo humanizado, anti-EGFR), ranibizumab (anticuerpo humanizado, anti-VEGF), 1-131 tositumomab (anticuerpo humanizado, anti-CD20), ofatumumab (anticuerpo humano, anti-CD-20), certolizumab (anticuerpo humanizado, anti-TNF-α), golimumab (anticuerpo humano, anti-TNFα) y denosumab (anticuerpo humano, ligando anti-RANK). Los anticuerpos preferidos incluyen trastuzumab y rituximab. Un anticuerpo adicional de interés es infliximab.

40 Otros anticuerpos quiméricos que se pueden formular tal y como se describe en la presente memoria incluyen bavituximab (anti-fosfatidilserina), brentuximab (anti-CD30), siltuximab (anti-IL-6), clenoliximab (anti-CD4), galiximab (anti-CD80), gomiliximab (anti-CD23), keliximab (anti- CD4), lumiliximab (anti-CD23), priliximab (anti-CD4), teneliximab (anti-CD40), vopaliximab (anti-VAPI), ecomeximab (anti-GD3) y pagibaximab (ácido lipoteicoico anti-estafilococo).

45 Otros anticuerpos humanizados que se pueden formular tal y como se describe en la presente memoria incluyen epratuzumab (anti-CD22), afutuzumab (anti-CD20), bivatuzumab mertansina (anti-CD44), cantuzumab mertansina (anti-mucino), citatuzumab bogatox (anti-TACSTD1), dacetuzumab (anti-CD40), elotuzumab (anti-CD319),

etaracizumab (anti- $\alpha_v\beta_3$ -integrina), farletuzumab (anti-FR α), inotuzumab ozogamicina (anti-CD22), labetuzumab (antígeno anti-carcinoembrionario), lintuzumab (anti-CD33), milatuzumab (anti-CD74), nimotuzumab (anti-EGFR), oportuzumab monatox (anti-EpCAM), pertuzumab (anti-HER2), sibrotuzumab (anti-FAP), tacatuzumab tetraxetan (anti-alfa-fetoproteína), tigatuzumab (anti-TRAIL-2), tucotuzumab celmoleucina (anti-EpCAM), veltuzumab (anti-CD20), aselizumab (anti-CD62L), apolizumab (anti-HLA-DRB), benralizumab (anti-CD125), cedelizumab (anti-CD4), epratuzumab (anti-CD22), erlizumab (anti-CD18), fontolizumab (anti-interferón- γ), mepolizumab (anti-IL5), ocrelizumab (anti-CD20), pascolizumab (anti-IL4), pexelizumab (componente 5 anti-complemento), PRO-140 (anti-CCR5), reslizumab (anti-IL5), rontalizumab (anti interferón- α), rovelizumab (anti-CD11, CD18), siplizumab (anti-CD2), talizumab (anti-IgE), teplizumab (anti-CD3), tocilizumab (anti-IL6R), vedolizumab (anti- $\alpha_4\beta_7$ -integrina), visilizumab (anti-CD3), ibalizumab (anti-CD4), tefibazumab (factor anti-grumos A), tadocizumab (anti- $\alpha_{11b}\beta_3$ -integrina), bapineuzumab (anti-amiloide- β), solanezumab (anti-amiloide- β), tanezumab (anti-NGF), urtoxazumab (subunidad B de toxina II de tipo Shiga de E. coli), felvizumab (anti-virus sincitial respiratorio), motavizumab (glicoproteína F de anti-virus sincitial respiratorio) y lebrikizumab (anti-IL13).

Los anticuerpos humanos adicionales que se pueden formular como se describe en la presente memoria incluyen atorolimumab (factor anti-Rh), fresolimumab (anti-TGF β -1, -2 y -3), lerdelimumab (anti-TGF β -2), metelimumab (anti-TGF β -1), morolimumab (factor anti-Rh), ipilimumab (anti-CTLA-4), tremelimumab (anti-CTLA-4), bertilimumab (anti-CCL11), zanolimumab (anti-CD4), briakinumab (anti-IL12,-23), canakinumab (anti-IL1 β), ustekinumab (anti-IL12, -23), adecatumumab (anti-EpCAM), belimumab (factor de activación anti-célula B), cixutumumab (receptor anti-IGF-1), conatumumab (anti-TRAIL-R2), figitumumab (anti-IGF-1 receptor), iratumumab (anti-CD30), lexatumumab (anti-TRAIL-R2), lucatumumab (anti-CD40), mapatumumab (anti-TRAIL-R4), necitumumab (anti-EGFR), olaratumab (anti-PDGF-R α), pritumumab (anti-vimentina), robatumumab (receptor anti-IGF-1), votumumab (antígeno anti-tumoral CTAA16.88), zalutumumab (anti-EGFR), stamulumab (anti-miostatina), efungumab (anti-fúngico HSP90), exbivirumab (antígeno de superficie anti-hepatitis B), foravirumab (glicoproteína antri-rabia), libivirumab (antígeno de superficie anti-hepatitis B), rafivirumab (glicoproteína anti-rabia), regavirumab (glicoproteína B anti-citomegalovirus), sevirumab (anti-citomegalovirus), tuvirumab (virus anti-hepatitis B), panobacumab (serotipo IATS 011 anti-pseudomonas aeruginosa), raxibacumab (toxina anti-antrax), ramucirumab (anti-VEGF- R2), y gantenerumab (anti-amiloide β).

También se pueden formular proteínas de fusión que comprenden un fragmento de molécula de inmunoglobulina de acuerdo con la invención. Las proteínas de fusión apropiadas incluyen proteínas que comprenden un dominio de proteína activa fusionado a uno o más fragmentos de inmunoglobulina, tal como dominios Fc. Dichas proteínas de fusión incluyen proteínas diméricas que tienen unidades monoméricas que comprenden un dominio de proteína activa, tal como un receptor soluble o un dominio de unión a ligando extracelular, que se fusiona con un dominio Fc de inmunoglobulina. Se pueden asociar dos dominios Fc por medio de enlaces disulfuro para formar la proteína dimérica. Dichas proteínas de fusión incluyen etanercept, abatacept y belatacept.

Los derivados conjugados que comprenden anticuerpos (o uno o más fragmentos de anticuerpo) y polímero químicamente inerte tal como PEG también se pueden formular de acuerdo con la invención. Dichos derivados incluyen certolizumab pegol.

La proteína de anticuerpo se puede aislar a partir de fuentes naturales o puede ser una proteína recombinante.

En determinadas realizaciones, la proteína de anticuerpo es sustancialmente pura, es decir, la composición comprende una proteína individual y sustancialmente nada de ninguna proteína adicional. En realizaciones preferidas, la proteína comprende al menos un 99 %, preferentemente al menos un 99,5 %, y más preferentemente al menos aproximadamente un 99,9 % del contenido total de proteína de la composición. En realizaciones preferidas, la proteína es suficientemente pura para su uso en una composición farmacéutica.

La concentración de proteína de anticuerpo en la disolución acuosa es de al menos aproximadamente 10 mg/ml, y está preferentemente dentro del intervalo de aproximadamente 25 mg/ml hasta aproximadamente 400 mg/ml. En determinadas realizaciones, la concentración es de al menos aproximadamente 25 mg/ml. En determinadas realizaciones, la concentración de proteína es de al menos aproximadamente 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml. Más preferentemente, la concentración de proteína es mayor de 50 mg/ml por ejemplo al menos aproximadamente 80 mg/ml. La concentración puede ser de hasta aproximadamente 400 mg/ml, por ejemplo hasta aproximadamente 350 mg/ml, 300 mg/ml, 250 mg/ml, 200 mg/ml o 175 mg/ml. Cada intervalo de concentración delimitado por uno de los límites inferiores anteriores y uno de los límites superiores anteriores se contempla en la presente memoria.

La expresión "farmacéuticamente aceptable", tal y como se usa en la presente memoria, hace referencia a los componentes de una composición farmacéutica que resultan apropiados para el uso y modo de administración deseados al cuerpo de un humano o animal, tal como un mamífero, sin consecuencias adversas no deseadas, tales como toxicidad, irritación y respuesta alérgica y con una relación de riesgo/beneficio razonable.

De manera apropiada, la composición de la invención comprende un tampón con el fin de estabilizar el pH de la composición, que también se puede seleccionar para mejorar la estabilidad de la proteína. En una realización, un tampón está seleccionado para tener un pKa próximo al pH de la composición; por ejemplo de manera apropiada se emplea acetato como tampón cuando el pH de la composición está dentro del intervalo de 4,5-5,5. De manera

apropiada, se emplea histidina como tampón cuando el pH de la composición está dentro del intervalo de 5,6-6,5. Alternativamente, en otra realización, la composición de la invención se estabiliza de forma adicional como se divulga en el documento WO 2008/084237, que describe una composición que comprende una proteína y uno o más aditivos, caracterizada por que el sistema está sustancialmente libre de un tampón convencional, es decir, un compuesto con un pKa de 1 unidad de pH de la composición en el intervalo de temperatura deseado para el almacenamiento de la composición. En la presente realización, el pH de la composición se ajusta a un valor en el que la composición tiene una estabilidad de medición máxima con respecto al pH; uno o más aditivos (tampones desplazados) son capaces de intercambiar protones con la proteína y tienen valores de pKa de al menos 1 unidad más o menos que el pH de la composición en el intervalo de temperatura deseada para el almacenamiento de la composición. Manteniendo la proteína a un pH apropiado, o cerca de un valor en el cual la estabilidad de medición sea máxima, en ausencia de un tampón convencional, la estabilidad de almacenamiento de la proteína se puede aumentar de forma sustancial. En determinadas realizaciones, generalmente la estabilidad de almacenamiento se puede mejorar de forma adicional, de forma sustancialmente posible, por medio del uso de aditivos que tienen un pKa entre 1 y 5 unidades de pH, preferentemente entre 1 y 3 unidades de pH, del modo más preferido de 1,5 a 2,5 unidades de pH, con respecto al pH de la composición acuosa en el intervalo de temperatura deseada para el almacenamiento de la composición.

Las disoluciones de la invención pueden incluir de forma adicional uno o más excipientes convencionales, tales como una sal inorgánica, preferentemente una sal que sea una combinación de sodio, potasio, calcio o amonio, con cloruro, sulfato, carbonato, sulfito, nitrato, lactato, succinato, acetato, maleato o lactato; un aminoácido, preferentemente histidina, glicina, arginina o metionina (por ejemplo, como anti-oxidante); un azúcar o alcohol de azúcar, preferentemente trehalosa, sacarosa, manitol, rafinosa, sorbitol, lactitol, glicerol o 1,2-propanodiol; un tensioactivo, preferentemente polisorbato 20, polisorbato 60, polisorbato 80, poloxámero 188 o poloxámero 407; un agente quelante de metal en forma de traza, preferentemente EDTA; un conservante, preferentemente fenol, m-cresol, alcohol bencílico, propilparabeno, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio. Una sal inorgánica que es una combinación de magnesio con cloruro, sulfato carbonato, sulfito, nitrato, lactato, succinato, acetato, maleato o lactato también es un excipiente apropiado.

Las disoluciones de la invención opcionalmente comprenden un modificador de tonicidad. Los modificadores de tonicidad apropiados se listan a continuación en los antecedentes de la invención, y pueden ser especies químicas cargadas o no cargadas. Los modificadores de tonicidad no cargados típicos incluyen azúcares tales como sacarosa, trehalosa, glicerol y manitol. Los modificadores de tonicidad cargados típicos incluyen especies químicas cargadas, tales como arginina o cloruro sódico.

En una realización, la tonicidad de la disolución acuosa de la proteína de anticuerpo se ajusta usando especies cargadas tales como una sal orgánica o inorgánica. En una realización, la tonicidad de la disolución acuosa de la proteína de anticuerpo se ajusta usando especies no cargadas tales como un azúcar o alcohol de azúcar.

Las composiciones acuosas de la presente invención abarcan una amplia gama de osmolaridad, incluyendo composiciones hipotónicas, isotónicas e hipertónicas. Preferentemente, las disoluciones de la invención son sustancialmente isotónicas. Las disoluciones preferidas tienen una osmolaridad dentro del intervalo de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 mOsm/l. Preferentemente, la osmolaridad está dentro del intervalo de aproximadamente 250 a aproximadamente 350 mOsm/l. Más preferentemente, la osmolaridad es de aproximadamente 300 mOsm/l. En una realización, se pretende que la disolución para administración a un sujeto por medio de inyección intramuscular o subcutánea y la osmolaridad de la disolución se escojan con el fin de minimizar el dolor tras la inyección.

La expresión "especies de peso molecular elevado", tal y como se usa en la presente memoria, hace referencia a cualquier componente del contenido de proteína que tenga un peso molecular aparente al menos aproximadamente el doble del peso molecular de la proteína activa parental. Es decir, las especies de peso molecular elevado son agregados multiméricos de la proteína parental. Los agregados multiméricos pueden comprender las moléculas de proteína parental con conformación considerablemente modificada o pueden ser un conjunto de unidades de proteína parental en la conformación nativa o casi nativa. La determinación de las especies de peso molecular elevado se puede hacer usando métodos conocidos en la técnica, incluyendo cromatografía de exclusión por tamaño, electroforesis, ultracentrifugación analítica/velocidad de sedimentación, dispersión de luz, dispersión de luz dinámica, dispersión de luz estática y separación de flujo de campo.

Preferentemente, la composición de la invención comprende no más de un 5 % (en peso de la proteína total) de especies de peso molecular elevado tras el almacenamiento a 40 °C durante al menos uno, dos o tres meses. En una realización, la cantidad de especies de peso molecular elevado aumenta en no más de un 5 % (en peso de la proteína total), preferentemente no más de un 3 % tras el almacenamiento a 40 °C durante al menos uno, dos o tres meses. La cuantificación de las especies de peso molecular elevado es un porcentaje en peso de la proteína total en la composición.

En realizaciones preferidas, una composición de la presente invención debería exhibir un aumento de especies de peso molecular elevado durante el almacenamiento que sea al menos un 10 % menor, preferentemente al menos un 25 % menor, más preferentemente al menos un 50 % menor, que una composición idéntica pero que carece de trietilentetramina, tras el almacenamiento en las mismas condiciones y duración de tiempo.

En una realización, las composiciones de la invención son composiciones farmacéuticas apropiadas para administración de una proteína de anticuerpo terapéutica a un sujeto que lo precisa. Dichas composiciones se pueden usar en un método de administración de la proteína terapéutica al sujeto.

También se divulga un método de administración de una proteína de anticuerpo terapéutica a un sujeto que lo precisa.

- 5 El método comprende la etapa de administración de una disolución acuosa que comprende la proteína de anticuerpo en una concentración de al menos aproximadamente 10 mg/ml, y un oligómero de etilenimina en el que el número de unidades de repetición de etilenimina (n) en el oligómero está dentro del intervalo de 2-12. Preferentemente, la composición se administra por medio de inyección intravenosa, subcutánea o intramuscular. Más preferentemente, la composición se administra por medio de inyección subcutánea.
- 10 En realizaciones preferidas, la concentración de la proteína es suficientemente elevada para que el volumen total de cada administración no exceda aproximadamente 2 ml. Preferentemente, el volumen total de cada administración no excede aproximadamente 1,5 ml o aproximadamente 1,0 ml. En una realización, el volumen de la disolución de cada administración es de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 ml, preferentemente de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 1,5 ml.
- 15 En otra realización, la invención proporciona una composición farmacéutica envasada apropiada para administración a un sujeto que lo precisa. La composición farmacéutica comprende una disolución acuosa que comprende una proteína de anticuerpo terapéutica a una concentración de al menos aproximadamente 10 mg/ml y trietilentetramina, en la que el pH de la disolución está dentro del intervalo de 5,0 a 7,5.
- 20 Preferentemente, el volumen de la disolución es de aproximadamente 2 ml o menos. En una realización, el volumen de la disolución proporciona un volumen de administración de aproximadamente 0,5 a aproximadamente 2 ml, con un exceso suficiente para adaptarse a las limitaciones de captación de disolución por medio de la jeringa. En una realización, el exceso es de aproximadamente un 10 % a aproximadamente un 20 % del volumen de administración. Preferentemente, la composición farmacéutica se envasa en un vial apropiado para introducción de una aguja para la retirada de la disolución. En una realización, la composición farmacéutica se envasa en un vial de vidrio con un tapón de caucho. La composición farmacéutica envasada se puede proporcionar en un estuche, que además comprende instrucciones de uso y, opcionalmente, una jeringa apropiada para administración intramuscular o subcutánea. Alternativamente, la composición farmacéutica envasada se puede proporcionar en forma de jeringa desechable pre-llena, apropiada para administración intramuscular o subcutánea. Un dispositivo de auto-inyector pre-lleno también resultaría apropiado para administración intramuscular o subcutánea.
- 25 Los porcentajes de oligómero de etilenimina, tal y como se usan en la presente memoria, hacen referencia a peso, basado en el oligómero libre de etilenimina (es decir, excluyendo el peso de cualquier contraión).

Aspectos adicionales de la invención incluyen:

A. Una disolución acuosa que comprende:

- 35 (a) una proteína de anticuerpo a una concentración de al menos aproximadamente 10 mg/ml, 25 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml, o un intervalo de aproximadamente 25 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml (por ejemplo, hasta aproximadamente 350 mg/ml, 300 mg/ml, 250 mg/ml, 200 mg/ml o 175 mg/ml); y
- 40 (a) trietilentetramina, en la que la concentración de trietilentetramina es de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 10 mg/ml (por ejemplo, de aproximadamente 0,01 a aproximadamente 0,1 mg/ml, de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 0,25 mg/ml, de aproximadamente 0,25 a aproximadamente 1 mg/ml, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 mg/ml, de aproximadamente 2 a aproximadamente 5 mg/ml, o de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 10 mg/ml);

y

- 45 en la que el pH de la disolución acuosa está dentro del intervalo de 5,0 a 7,5 (por ejemplo, de 5,5 a 7,0) y la disolución tiene una osmolaridad dentro del intervalo de aproximadamente 200 a aproximadamente 500 mOsm/l.

B. La disolución acuosa del aspecto A, en la que la disolución acuosa comprende un tampón que proporciona un pH suficiente para permitir que la disolución de la proteína alcance la concentración deseada y suficientemente baja para permitir la protonación de una parte de los grupos básicos en el oligómero de etilenimina.

- 50 C. La disolución acuosa del aspecto A o B, en la que la concentración de la proteína de anticuerpo es suficientemente elevada de forma que el volumen total de cada dosis de administración no supere aproximadamente 2 ml.

D. La disolución acuosa del aspecto A, B o C, en la que la disolución acuosa comprende además uno o más excipientes convencionales.

Ejemplos

Materiales

- 5 Se obtuvieron etilendiamina (Mw 60 Da), dietilentriamina (Mw 103 Da), trietilentetramina (Mw 146 Da), tetraetilenpentamina (Mw 189 Da), pentaetilenhexamina (Mw 232 Da) y PEI800 (Polietilenimina, etilendiamina ramificada, Mw promedio ~800 por LS, Mn promedio ~600 por GPC) a partir de Sigma-Aldrich.

Abreviaturas

CPE	Efecto citopático
DMEM	Medio Esencial Mínimo de Dulbecco
FBS	Suero Bovino Fetal
HEK	Riñón Embrionario Humano
MDCK	Epitelio de Riñón Canino de Madin-Darby
mPEG	polímero de polietilen glicol con protección de metoxi
PEG	polietilen glicol
PEI	polietilenimina

Preparación de formulación y ensayo de estabilidad

- 10 Se prepararon formulaciones de sustancias terapéuticas de proteína, rituximab y certolizumab pegol, tanto en ausencia como en presencia de diversos oligómeros de etilenimina. Se usaron los siguientes productos como material de partida: MabThera® (rituximab) y Cimzia® (certolizumab pegol). Las composiciones de los dos productos son las siguientes:

MabThera®:

- 15 rituximab (10 mg/ml)
citrato de sodio dihidratado (7,35 mg/ml)
polisorbato 80 (0,7 mg/ml)
cloruro sódico (9,0 mg/ml)

El pH es de aproximadamente 6,5.

Fuente Discusión EMA Scientific en MabThera®

- 20 (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/EPAR_-_Scientific_Discussion/human/000_165/WC500025817.pdf)

Cimzia®:

- 25 certolizumab pegol (200 mg/ml)
acetato de sodio (1,36 mg/ml)
cloruro sódico (7,31 mg/ml)

El pH es de aproximadamente 4,7.

Fuente RxList (<http://www.rxhst.com/script/main/hp.asp>)

- 30 Con el fin de preparar las formulaciones para ensayo, fue necesario retirar los excipientes originales y sustituirlos por excipientes seleccionados. Se usó el siguiente procedimiento para preparar las formulaciones para ensayo: Se retiraron las composiciones originales del recipiente del fabricante y se sometieron a diálisis en módulos de diálisis de

valor límite de 3,5 kDa (Thermo Piece) a 2-8 °C, usando tres cambios durante un mínimo de 4 horas en cada una, incluyendo una incubación durante la noche. Posteriormente, se concentró la proteína hasta 133,3 mg/ml (rituximab, Ejemplos 1-4), 187 mg/ml (rituximab, Ejemplo 5) o 150 mg/ml (certolizumab pegol, Ejemplo 6) usando concentradores centrífugos Amicon con MWCO 50 kDa (rituximab) o 30 kDa (certolizumab pegol).

- 5 Se añadieron las disoluciones de fondo, que contenían nuevos excipientes y ajustadas hasta el pH requerido, a las proteínas sometidas a diálisis para lograr la concentración requerida de excipientes y proteína en la composición final. Se colocaron las muestras formuladas en almacenamiento a 40 °C o 5 °C, y se sometió a ensayo la estabilidad tras un período de tiempo concreto. Se sometió a ensayo la estabilidad de las proteínas en las composiciones que contenían oligómeros de etilenimina y se comparó con una "formulación de control" con idéntico fondo en ausencia de los oligómeros. Para permitir la comparación adicional, se preparó una "formulación original" que tenía una composición idéntica de excipientes que la del producto original (es decir, MabThera® en el caso de rituximab y Cimzia® en el caso de certolizumab pegol) pero con una concentración particular de proteína, tal y como se especifica en cada Ejemplo (por ejemplo, en el Ejemplo 1 la formulación original contiene 100 mg/ml de rituximab).

Métodos de evaluación de la agregación

- 15 La agregación de las composiciones acuosas de proteína se puede evaluar por medio de:

(a) Evaluación visual

- 20 Se colocaron los viales en una posición apropiada con un fondo de contraste seleccionado de forma apropiada, y bajo iluminación suficiente y apropiada para destacar cualquier desviación potencial o visual. Se coloca un control (o material recién preparado) a lo largo para comparación directa. Se clasifican las disoluciones como transparentes si no se aprecian imperfecciones visuales; turbias si existe un cambio significativo en la opacidad del material; y si existen fracciones insolubles, o si existen partículas visibles en la parte inferior del vial, se considera que ha tenido lugar la formación de un precipitado.

(b) Cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

- 25 Se mide la cantidad de especies de peso molecular elevado usando una columna de exclusión por tamaño 300x7,8 mm S3000 (o equivalente) con una columna protectora. La fase móvil es fosfato de potasio de pH 6,5 con un caudal de 0,4 ml/min, volumen de inyección de 1 µl y se detectó a 210 y 280 nm. Los resultados se expresan como % de especies de alto peso molecular (HMWS), es decir, la suma de todas las áreas de pico que corresponden a una proteína agregada con respecto a la suma de todos los picos relacionados con proteína del cromatograma. Se puede apreciar una pequeña variabilidad de tiempo-punto a tiempo-punto en términos de valores absolutos de % de HMWS, por ejemplo debida al uso repetido de columna de exclusión por tamaño. No obstante, en un tiempo-punto concreto se someten a ensayo las muestras usando la columna en la misma condición, de manera que los valores generados dentro del tiempo-punto representan un buen indicativo de la estabilidad relativa de la proteína en las composiciones sometidas a ensayo.

- 35 Ejemplo comparativo 1: Rituximab - demostración de control de agregación en presencia de tetraetilenpentamina y pentaetilenhexamina

- 40 Se formuló rituximab a 100 mg/ml, en la siguiente disolución de fondo: EDTA (0,2 mM), metionina (1 mM), histidina (10 mM). Se ajustó el pH a 6,5. Los efectos de los oligómeros de etilenimina (i) pentahidrocloruro de tetraetilanpentamina (n = 4) y (ii) pentaetilenhexamina (n = 5) sobre el aumento de la agregación en presencia de trehalosa a 40 °C y 5 °C se muestran en las Tablas 1 y 2, respectivamente. En todas las disoluciones de fondo, se consideró que la presencia de oligómeros de etilenimina (i) y (ii) reducía considerablemente la velocidad de formación de HMWS. Además, a 40 °C, se observó precipitación tras 8 semanas en las formulaciones de control que no contenían un oligómero de etilenimina.

Tabla 1. Velocidad de agregación en las formulaciones de rituximab a 40 °C

Trehalosa* (mM)	Tetraetilenpentamina** (mg/ml)	Pentaetilenhexamina (mg/ml)	pH	% HMWS Hasta	% HMWS 8 semanas	Visual (8 semanas)
200			6,5	1,49	2,82	Transparente
200	0,1		6,5	1,40	1,79	Transparente
200	0,5		6,5	1,44	1,85	Transparente
200	2,5		6,5	1,40	1,45	Transparente
200		0,2	6,5	1,42	1,89	Transparente
200		1,0	6,5	1,40	1,24	Transparente

200		5,0	6,5	1,41	1,29	Transparente
Formulación original, NaCl 154 mM, Citrato 25 mM, 700 mg/ml de			6,5	1,55	3,22	Transparente, precipitado inferior

* y EDTA (0,2 mM), metionina (1 mM) e histidina (10 mM)

** como sal de pentahidrocloreuro (concentración en columna basada en el peso de la base)

Tabla 2. Velocidad de agregación en las formulaciones de rituximab a 5 °C

Trehalosa* (mM*)	Tetaetilenpentamina** (mg/ml)	Pentaetilenhexamina (mg/ml)	pH	% HMWS Hasta	% HMWS 8 semanas	Visual (8 semanas)
200			6,5	1,49	1,25	Transparente
200	0,1		6,5	1,40	1,23	Transparente
200	0,5		6,5	1,44	1,22	Transparente
200	2,5		6,5	1,40	1,21	Transparente
200		0,2	6,5	1,42	1,22	Transparente
200		1,0	6,5	1,40	1,24	Transparente
200		5,0	6,5	1,41	1,07	Transparente
Formulación original, NaCl 154 mM, Citrato 25 mM, 700 mg/ml de Tween 80			6,5	1,55	1,28	Transparente

* y EDTA (0,2 mM), metionina (1 mM) e histidina (10 mM)

** como sal de pentahidrocloreuro (concentración en columna basada en el peso de la base)

Ejemplo 2: Rituximab - investigación adicional de control de agregación en presencia de diversos aditivos oligoméricos

Se formula rituximab a 100 mg/ml, en la siguiente disolución de fondo: EDTA (0,2 mM), metionina (1 mM), histidina (10 mM). Se ajusta el pH a 6,5.

Se pueden someter a ensayo los siguientes aditivos oligoméricos:

- (a) Etilendiamina; control
- (b) Dietilentriamina (comparador)
- (c) Trietilentetramina
- (d) Tetraetilenpentamina (comparador)
- (e) Pentaetilenhexamina (comparador)

Tabla 3

Arginina (mM)	Trehalosa (mM)	(a) (mg/ml)	(b) (mg/ml)	(c) (mg/ml)	(d) (mg/ml)	(e) (mg/ml)	pH
80							6,5
	200	0,2					6,5
	200	1					6,5
	200	5					6,5
	200		0,2				6,5
	200		1				6,5
	200		5				6,5
	200			0,2			6,5

	200			1			6,5
	200			5			6,5
	200				0,2		6,5
	200				1		6,5
	200				5		6,5
	200					0,15	6,5
	200					1,5	6,5
	200					8	6,5
	200					16	6,5
Formulación original, NaCl 154 mM, Citrato 25 mM, 700 mg/ml de Tween 80							6,5

Ejemplo comparativo 3: Rituximab - demostración de control de agregación en presencia de tetraetilenpentamina y pentaetilenhexamina, en disolución de fondo alternativa que contiene arginina.

- 5 Se formuló rituximab a 100 mg/ml, en la siguiente disolución de fondo: EDTA (0,2 mM), metionina (1 mM), histidina (10 mM), en presencia de arginina (80 nM) como modificador de tonicidad. El pH de todas las formulaciones se ajustó a 6,5. Con fines de comparación, también se incluye la formulación de un producto comercial líquido de rituximab ("Formulación Original" también con rituximab a 100 ng/ml). Los efectos de los oligómeros de etilenimina (i) pentahidrocloreuro de tetraetilanpentamina (n = 4) y (ii) pentaetilenhexamina (n = 5) sobre el aumento de la agregación a 40 °C y 5 °C se muestran en la Tabla 4. En todas las disoluciones de fondo, se consideró que la presencia de oligómeros de etilenimina (i) y (ii) reducía considerablemente la velocidad de formación de HMWS, en comparación con las disoluciones de fondo que no contenían un oligómero de etilenimina. Además, se encontró que la velocidad de formación de HMWS a 40 °C en presencia de un oligómero de etilenimina fue menor que en la formulación Original, que también mostró signos de precipitación tras 8 semanas.

Tabla 4. Velocidad de agregación en las formulaciones de rituximab a 40 °C

Arginina (mM)	Tetraetilenpentamina (mg/ml)	Pentaetilenhexamina (mg/ml)	% HMWS	% HMWS
80			1,47	2,57
80	0,1		1,58	2,08
80	0,5		1,53	1,89
80	2,5		1,47	0,85
80		0,2	1,42	1,92
80		1,0	1,57	1,62
80		5,0	1,36	0,83
Formulación Original: Rituximab (100 mg/ml), citrato de sodio dihidratado (7,35 mg/ml), polisorbato 80 (0,7 mg/ml), cloruro sódico (9,0 mg/ml), pH 6,5			1,55	3,22

15

Ejemplo 4: Rituximab - Demostración de control de agregación por medio de diversos oligómeros de etilenimina

Se formuló rituximab a 100 mg/ml, en la siguiente disolución de fondo: EDTA (0,2 mM), metionina (1 mM), histidina (10 mM) y trehalosa (200 mM). Se ajusta el pH a 6,5. Los efectos de los siguientes aditivos sobre el aumento de la agregación en presencia a 40 °C se muestran en la Tabla 5.

- 20 (a) Etilendiamina (referencia)
(b) Dietilentriamina (comparador)
(c) Trietilentetramina
(d) Pentaetilenhexamina (comparador)

25 Los resultados se expresan en términos de % de especies de alto peso molecular (HMWS) medido por medio de SEC. Se llevaron a cabo las siguientes observaciones: en todas las disoluciones de fondo se encontró que la presencia de

oligómeros de etilenimina (b), (c) y (d) reducía considerablemente la velocidad de formación de HMWS de manera dependiente de la dosis en comparación con la formulación de fondo que no contenía un oligómero de etilenimina; la velocidad de agregación en presencia de los oligómeros de etilenimina (b), (c) y (d) fue en todos los casos menor cuando se comparó con la formulación de producto líquido comercial de rituximab ("Formulación Original"); y otra formulación de comparador que contenía etilendiamina (a) fue menos efectiva a la hora de reducir la formación de HMWS.

Tabla 5. Velocidad de agregación en las formulaciones de rituximab tras 16 semanas a 40 °C.

(a) (mg/ml)/mM	(b) (mg/ml)/mM	(c) (mg/ml)/mM	(d) (mg/ml)/mM	% HMWS 0 semanas	% HMWS 16 semanas
				0,69	3,21
0,2/3,3				0,49	2,44
1/17				0,72	2,27
5/83				0,78	2,08
	0,2/1,9			0,81	0,94
	1/9,7			0,70	0,70
	5/49			0,79	0,67
		0,2/1,4		0,74	0,81
		1/6,8		0,84	0,56
		5/34		0,74	0,51
			0,15/0,65	0,59	1,28
			1,5/6,5	0,67	0,24
			8/34	0,52	0,17
			16/69	0,73	0,16
Formulación Original: Rituximab (100 mg/ml), citrato de sodio dihidratado (7,35 mg/ml), polisorbato 80 (0,7 mg/ml), cloruro sódico (9,0 mg/ml), pH 6,5				0,75	3,40

Ejemplo 5: Rituximab - Demostración de control de agregación a una concentración más elevada por medio de oligómeros de etilenimina

Se formuló rituximab a 140 mg/ml, en la siguiente disolución de fondo: EDTA (0,2 10 mM), metionina (1 mM), histidina (10 mM) y trehalosa (200 mM). Se ajusta el pH a 6,5. Se investigó el efecto de los siguientes aditivos en la velocidad de agregación:

(a) Dietilentriammina (comparador)

(b) Trietilentetramina

(c) Pentaetilenhexamina (comparador)

El efecto de los oligómeros de etilenimina sobre la velocidad de agregación de rituximab a 40 °C se muestra en la Tabla 6. Los resultados se expresan en términos de % de especies de alto peso molecular (HMWS) medido por medio de SEC. Los resultados se muestran en las Figuras 1A-1C. Los oligómeros de etilenimina (a), (b) y (c) mostraron una reducción considerable dependiente de la dosis en la velocidad de agregación de ofrituximab (Figuras 1A-1C).

Tabla 6. Efecto de los oligómeros de etilenimina sobre la velocidad de agregación en las formulaciones de rituximab a 40 °C.

(a) (mg/ml)/ mM	(b) (mg/ml)/mM	(c) (mg/ml)/mM	% HMWS 0 semanas	% HMWS 12 semanas	% HMWS 26 semanas
			0,33	1,41	6,42
0,02/0,19			0,37	0,91	4,09
0,1/0,97			0,38	0,35	0,89

1/9,7			0,38	0,24	1,51
5/49			0,37	0,29	1,83
	0,03/0,21		0,36	0,29	4,18
	0,14/0,96		0,35	0,32	3,26
	1/6,8		0,36	0,27	0,45
	5/34		0,26	0,17	0,64
		0,04/0,17	0,33	0,96	4,66
		0,22/0,95	0,28	0,69	1,01
		1/4,3	0,36	0,26	0,54
		5/22	0,29	0,26	0,32
Formulación Original: Rituximab (140 mg/ml), citrato de sodio dihidratado (7,35 mg/ml), polisorbato 80 (0,7 mg/ml), cloruro sódico (9,0 mg/ml), pH 6,5			0,31	1,23	3,34

Ejemplo 6: Certolizumab pegol - Demostración de control de agregación en presencia de oligómeros de etilenimina

- 5 Se formuló certolizumab pegol a 100 mg/ml en tampón de histidina (10 mM, pH 6,0) en presencia de NaCl (150 mM) o 1,2-propanodiol (200 mM) como modificadores de tonicidad. Los efectos de los oligómeros de etilenimina (a) y (b) sobre la velocidad de agregación a 40 °C se muestran en la Tabla 7 (modificador de tonicidad de NaCl 150 mM) y la Tabla 8 (modificador de tonicidad de 1,2-propanodiol 200 mM).

Se sometieron a ensayo los siguientes aditivos:

- (a) Pentaetilenhexamina (Comparador)
- (b) Trietilentetramina

- 10 Los resultados se expresan en términos de % de especies de alto peso molecular (HMWS) medido por medio de SEC.

Se encontró que los oligómeros de etilenimina (a) y (b) reducían la velocidad de formación de HMWS. En la composición que contenía 1,2-propanodiol (Tabla 8), este efecto aumentó con la dosis. También se muestra que la velocidad de formación de HMWS fue considerablemente menor en presencia de oligómeros de etilenimina en comparación con la formulación del producto líquido comercial de Certolizumab pegol ("Formulación Original").

- 15 Tabla 7. Velocidad de agregación en las formulaciones de Certolizumab pegol a 40 °C en las composiciones que contienen NaCl.

NaCl (mM)	(a) (mg/ml)/mM	(b) (mg/ml)/mM	% HMWS 0 semanas	% HMWS 8 semanas
150	1/4,3		0,53	1,72
150	3/13		0,45	1,21
150		1/6,9	0,63	1,51
150		3/21	0,49	1,02
Formulación Original: Certolizumab pegol (100 mg/ml), acetato de sodio (1,36 mg/ml), cloruro sódico (7,31 mg/ml), pH 4,7			0,53	3,06

Tabla 8. Velocidad de agregación en las formulaciones de Certolizumab pegol a 40 °C en composiciones que contienen 1,2-propanodiol.

1,2- propanodiol (mM)	(a) (mg/ml)/ mM	(b) (mg/ml)/mM	% HMWS 0 semanas	% HMWS 8 semanas
200	1/4,3		0,47	1,35
200	3/13		0,45	1,03
200		1/6,9	0,55	1,02

200		3/21	0,49	0,85
Formulación Original: Certolizumab pegol (100 mg/ml), acetato de sodio (1,36 mg/ml), cloruro sódico (7,31 mg/ml), pH 4,7			0,53	3,06

Métodos de evaluación de citotoxicidad

Ejemplo 7: Determinación de efecto del tamaño de PEI sobre el efecto citotóxico en células HEK 293 y Vero

Se sometieron a subcultivo estirpes celulares de Riñón Embrionario Humano (HEK) 293, obtenidas en la Universidad de Birmingham y Vero, obtenidas en ECACC (The European Collection of Cell Cultures) y se usaron para preparar placas de 96 pocillos a una concentración de 1×10^4 células/cm² en Medio Esencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) + 2 % de Suero Bovino Fetal (FBS) + 4 mM de L-glutamina. Se incubaron las células durante 24 horas a 37 °C para obtener confluencia. Tras 24 horas se prepararon diversos PEI de peso molecular entre aproximadamente 800 Da y aproximadamente 50.000 Da, hasta una concentración de reserva de 5 mg/ml y se ajustó el pH a 7: (pesos moleculares 600, 1800, 10.000 y 50-100.000). A continuación, se diluyó la reserva en DMEM+2 % de FBS+4mM L-Glutamina hasta las siguientes concentraciones: 2,5 mg/mL, 1,25 mg/ml, 600 ug/ml, 300 ug/ml, 150 ug/ml, 75 ug/ml, 25 ug/ml, 10 ug/ml y 5 ug/ml. Tras la etapa de dilución se añadieron 100 µl de todas las concentraciones, incluyendo la concentración de reserva, a 8 pocillos/placa, dando lugar a 8 réplicas/concentración. Se incubaron las placas a 37 °C durante 72 horas antes de evaluación del efecto citopático (CPE), como se muestra en la Figura 2. Como se ha comentado anteriormente, la Figura 2 demuestra claramente que a medida que disminuye el tamaño de PEI, lo hace también el efecto citotóxico.

El efecto citotóxico de los oligómeros de etilenimina de la presente invención se puede evaluar por medio de sustancialmente el mismo método.

Ejemplo 8: Efecto de tamaño del oligómero de etilenimina sobre el efecto citotóxico usando células Vero y MDCK.

Se obtuvieron células Vero y Epiteliales de Riñón Canino de Madin-Darby (MDCK) a partir de ECACC (The European Collection of Cell Cultures, Health Protection Agency, Porton Down, Salisbury, SP4 0JG). Se sometieron las células a sub-cultivos y se usaron para preparar placas de 96 pocillos a una concentración de 1×10^4 células/cm² en Medio Esencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) + 2 % de Suero Bovino Fetal (FBS) + 4 mM de L-glutamina. Se incubaron las células durante 24 horas a 37 °C para obtener confluencia. Transcurridas 24 horas, se prepararon diversos oligómeros de etilenimina y polímeros (es decir, PEI) hasta una concentración de reserva de 5 mg/ml y se ajustó su pH a 7. Se sometieron a ensayo oligómeros y polímeros del siguiente peso molecular: 102, 145, 188, 231, 800, 1800, 10.000 y 50-100.000 Da. A continuación, se diluyeron las disoluciones de reserva en DMEM+ 2 % de FBS + 4 mM de L-Glutamina hasta las siguientes concentraciones: 2,5 mg/ml, 1,25 mg/ml, 600 µg/ml, 300 µg/ml, 150 µg/ml, 75 µg/ml, 25 µg/ml, 10 µg/ml y 5 µg/ml. Tras la etapa de dilución se añadieron 100 µl de cada muestra a cada concentración a 8 pocillos en un placa, dando lugar a 8 réplicas por concentración. Se incubaron las placas a 37 °C durante 72 horas antes de evaluación de inhibición celular y efecto citopático (CPE). La Figura 3 demuestra que el tamaño del polímero y oligómero de etilenimina está directamente relacionado con el efecto citotóxico en células Vero; cuanto más pequeño es el tamaño, menor es el efecto citotóxico tal y como viene determinado por medio de la concentración del oligómero o polímero de etilenimina necesaria para el efecto citotóxico. No se pudo obtener diferenciación alguna entre los tres oligómeros más pequeños sometidos a ensayo ya que ninguno de ellos mostró el efecto citopático a la concentración más elevada sometida a ensayo. Se apreció un efecto similar del tamaño del polímero u oligómero de etilenimina sobre el efecto citotóxico usando células MDCK (Figura 4), aunque el efecto fue menos gradual en este caso, con una disminución acusada de la citotoxicidad de los oligómeros por debajo de 189 Da.

A lo largo de toda la memoria descriptiva y las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto dicte lo contrario, se entiende que la palabra "comprender" y variaciones tales como "comprende" "que comprende" implican la inclusión de un número entero, etapa, grupo de números enteros o grupos de etapas referidos, pero no la exclusión de ningún otro número entero, etapa, grupo de números enteros o grupo de etapas.

Aunque se ha mostrado particularmente la presente invención y se ha descrito con referencias a sus realizaciones preferidas, se comprende por parte de los expertos en la técnica que se pueden llevar a cabo diversos cambios en la forma y detalles de la misma, sin apartarse por ello del alcance de la invención englobado por las reivindicaciones adjuntas. También se debería comprender que las realizaciones descritas en la presente memoria no son mutuamente excluyentes y que se pueden combinar las características procedentes de diversas realizaciones, en su totalidad o en parte, de acuerdo con la invención.

Cuando se describen aspectos o realizaciones de la invención en términos de un grupo de Markush u otros grupos de alternativas, la presente invención engloba no solo el grupo listado en su totalidad, sino también cada miembro del grupo de forma individual y todos los posibles subgrupos del grupo principal, y también el grupo principal carente de uno o más de los miembros de grupo. La presente invención prevé la exclusión explícita de uno o más de cualquiera de los miembros de grupo en la invención reivindicada.

Se pretende que el término "y/o" tal y como se usa en una frase tal como "A y/o B" de la presente memoria incluya

tanto A como B; A o B; A (solo); y B (solo). De igual forma, se pretende que el término "y/o" tal y como se usa en una frase tal como "A, B y/o C" englobe cada una de las siguientes realizaciones: A, B y C; A, B o C; A o C; A o B; B o C; A y C; A y B; B y C; A (solo); B (solo); y C (solo).

REIVINDICACIONES

1. Una disolución acuosa que comprende una proteína de anticuerpo a una concentración de al menos 10 mg/ml y un oligómero de etilenimina, en la que el oligómero de etilenimina es trietilentetramina y en la que el pH de la disolución está dentro del intervalo de 5,0 a 7,5.
- 5 2. Un método de reducción de la velocidad de agregación de una proteína de anticuerpo en disolución acuosa, en el que la concentración de proteína de anticuerpo es de al menos 10 mg/ml, que comprende la etapa de añadir a la disolución un oligómero de etilenimina, en el que el oligómero de etilenimina es trietilentetramina y en el que el pH de la disolución está dentro del intervalo de 5,0 a 7,5.
- 10 3. La disolución acuosa de la reivindicación 1 o el método de la reivindicación 2, en el que el pH de la disolución está dentro del intervalo de 5,5 a 7.
4. La disolución acuosa o el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el oligómero de etilenimina está presente a una concentración de 0,1 mg/ml a 5 mg/ml.
- 15 5. La disolución acuosa o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que la proteína de anticuerpo es un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un anticuerpo conjugado a un resto activo, una proteína de fusión que comprende uno o más fragmentos de anticuerpo, o un derivado de cualquiera de los anteriormente mencionados, por ejemplo, un anticuerpo monoclonal tal como un anticuerpo murino, un anticuerpo quimérico, un anticuerpo humanizado o un anticuerpos humano, y en particular trastuzumab, rituximab o bevacizumab.
- 20 6. La disolución acuosa o el método de la reivindicación 5, en el que la proteína de anticuerpo es una proteína de fusión que comprende un dominio de proteína activa condensado a uno o más fragmentos de inmunoglobulina Fc por ejemplo etanercept, abatacept o belatacept.
7. La disolución acuosa o el método de la reivindicación 5, en la que el derivado es un derivado conjugado que comprende uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpo y un polímero químicamente inerte por ejemplo certolizumab pegol.
- 25 8. La disolución acuosa o el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la concentración de proteína de anticuerpo está entre 25 mg/ml y 300 mg/ml.
9. La disolución acuosa o el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8 en la que la concentración de proteína de anticuerpo es de hasta 175 mg/ml.
10. La disolución acuosa o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la relación en peso (peso/peso) de proteína de anticuerpo con respecto al oligómero de etilenimina es de al menos 10.
- 30 11. La disolución acuosa o el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el pl de la proteína de anticuerpo es mayor que el pH de la disolución, por ejemplo el pl de la disolución de anticuerpo es de al menos 0,5 unidades mayor que el pH de la disolución.
12. La disolución acuosa o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el pl de la proteína de anticuerpo es de al menos 7, o en el que el pl de la proteína de anticuerpo está dentro del intervalo de 7-10.
- 35 13. La disolución acuosa o el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 el que la disolución acuosa es isotónica.
14. Una composición farmacéutica envasada apropiada para administración a un sujeto que lo precisa, que comprende la disolución acuosa de la reivindicación 1 o cualquiera de las reivindicaciones 3 a 13.
- 40 15. La disolución acuosa o el método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que un 50-100 % de los centros de nitrógeno básicos del oligómero de etilenimina están protonados.

Figura 1A

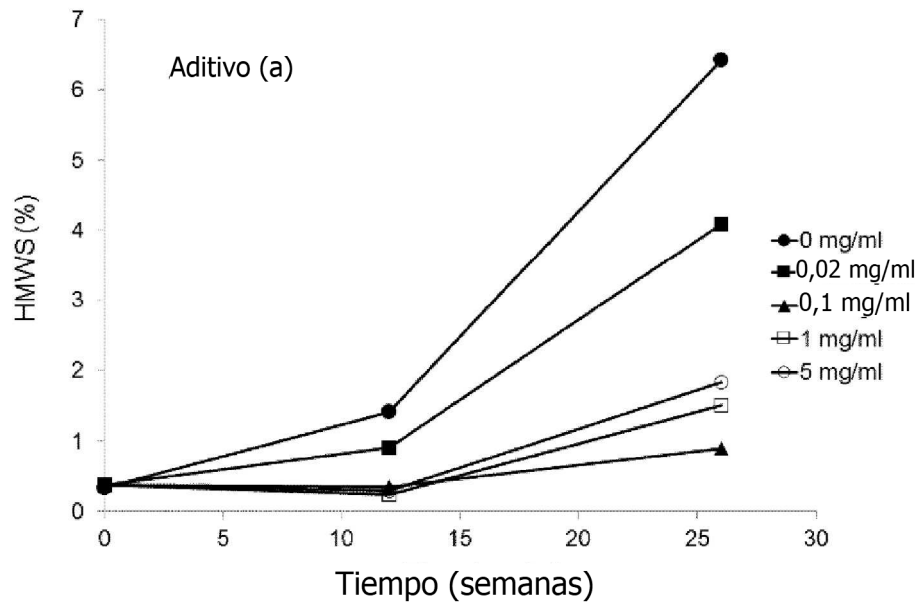


Figura 1B

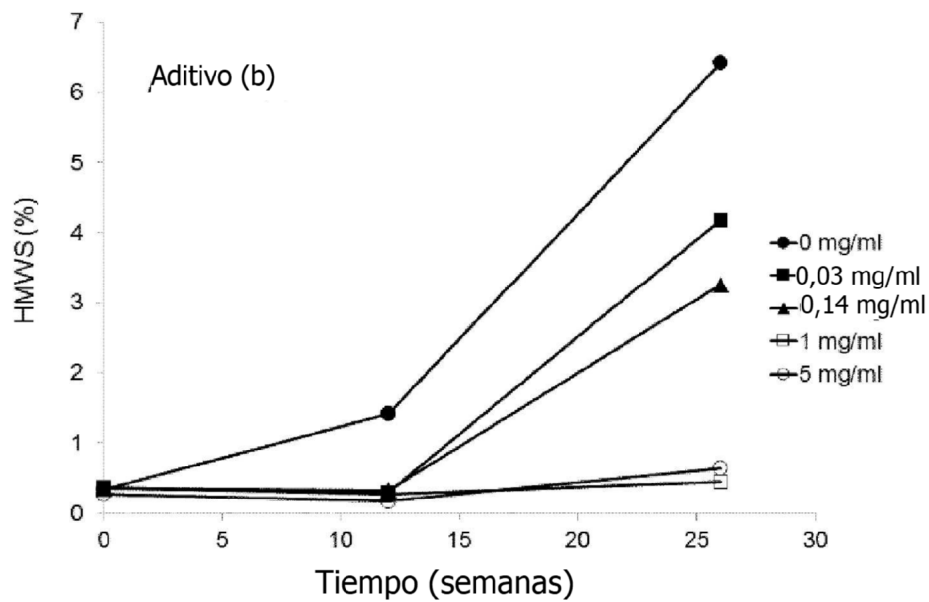


Figura 1C

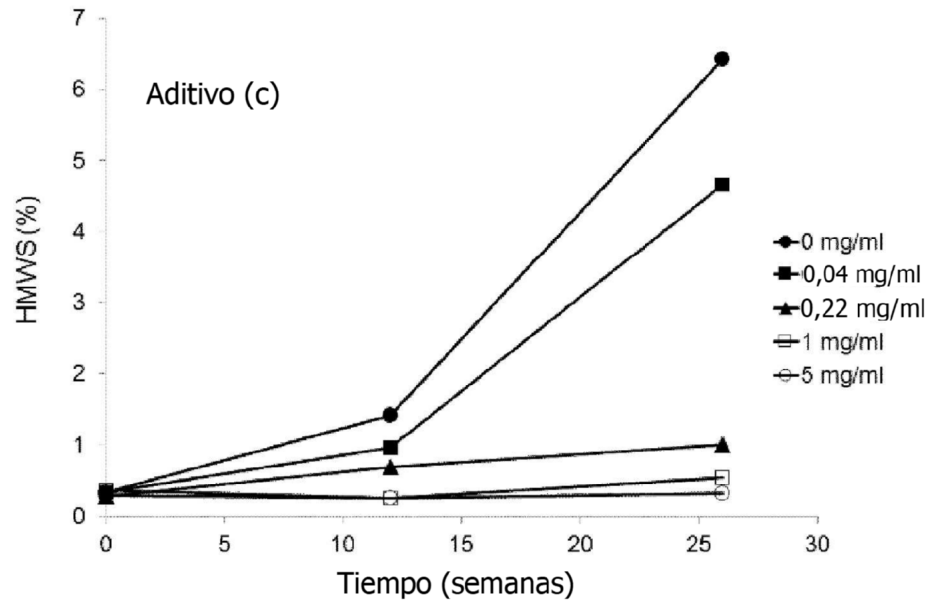


Figura 2

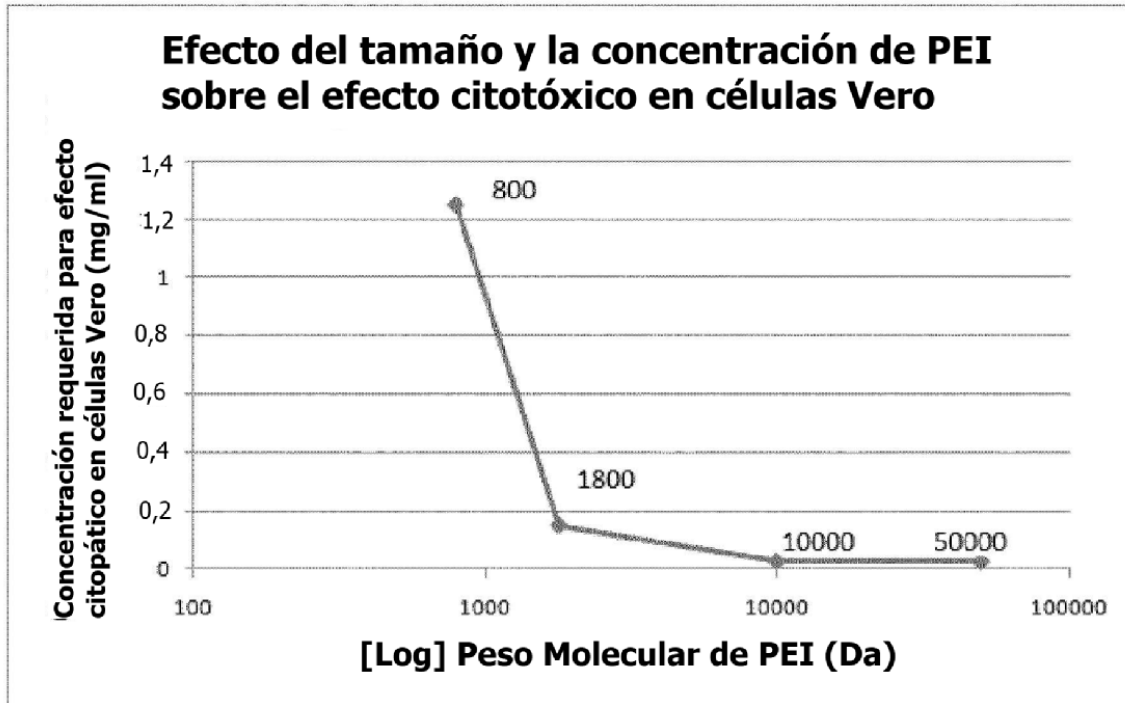
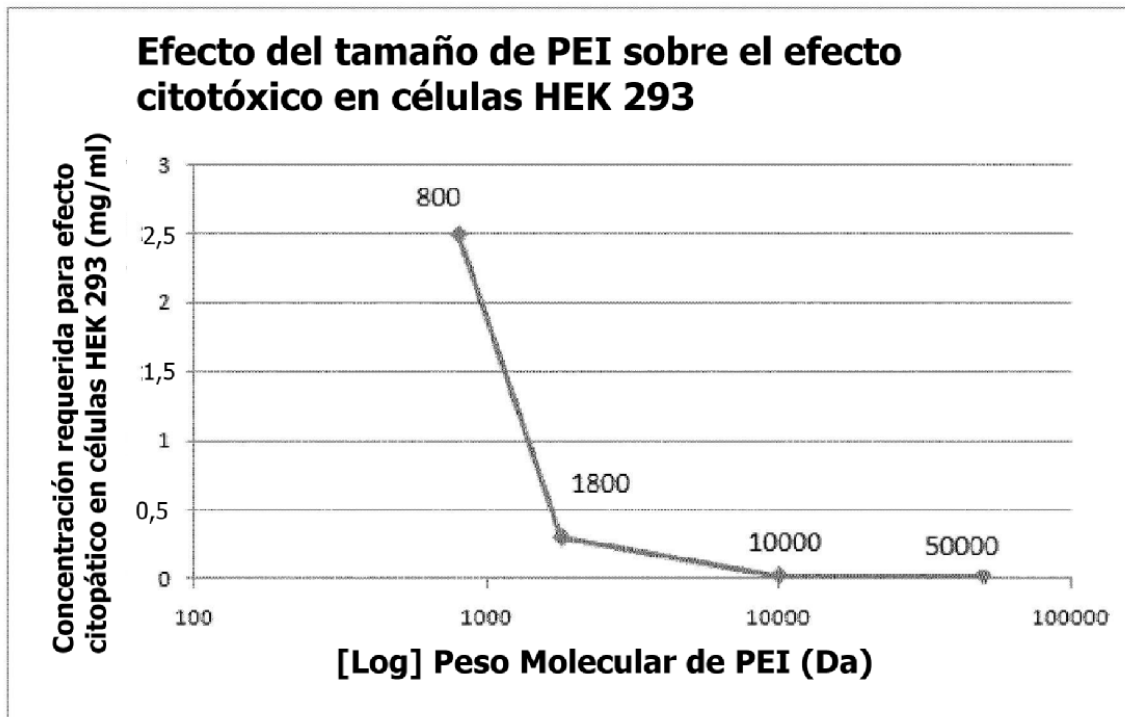


Figura 3

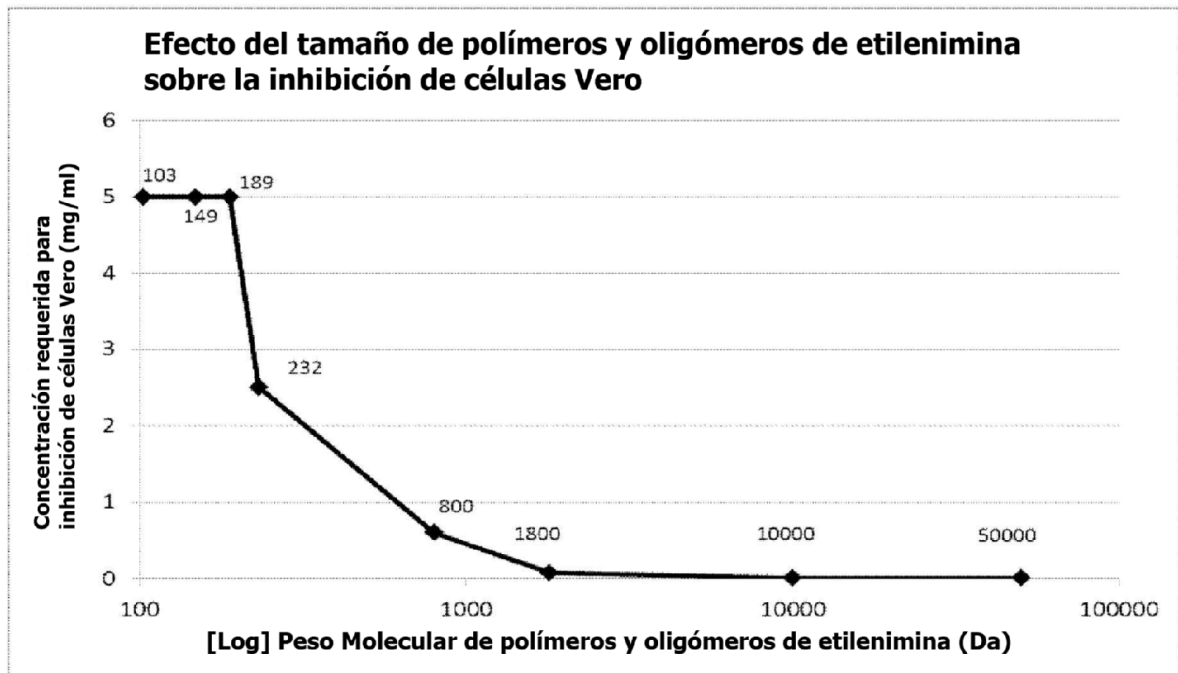


Figura 4

