

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 243**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/26 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **14.02.2013 PCT/US2013/026034**

87 Fecha y número de publicación internacional: **22.08.2013 WO13123114**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **14.02.2013 E 13711986 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2814468**

54 Título: **Composiciones farmacéuticas de anticuerpos ANTI-VLA1 (CD49A)**

30 Prioridad:

16.02.2012 US 201261599827 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.11.2019

73 Titular/es:

**SANTARUS, INC. (100.0%)
3611 Valley Centre Drive, Suite 400
San Diego, CA 92130, US**

72 Inventor/es:

**FOWLER, ADAM JEREMY;
BOWE, CRAIG MICHAEL;
YOUNT, WAYNE CURTIS;
COBB, NATHAN JEREMY y
KELLY, TIMOTHY MARTIN**

74 Agente/Representante:

SALVÀ FERRER, Joan

ES 2 732 243 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 farmacéuticas de anticuerpos ANTI-VLA1 (CD49A)

5 **Antecedentes**

Las integrinas son una superfamilia de receptores de superficie celular que median en la adhesión célula-células y célula-matriz. Estas proteínas heterodiméricas, compuestas de dos cadenas de polipéptido, α y β , unidas de forma no covalente, proporcionan anclaje así como señales para el crecimiento, migración y diferenciación celular durante el desarrollo y la reparación de tejido. Las integrinas han estado también implicadas en procesos inmunológicos e inflamatorios, que requieren la extravasación de las células de los vasos sanguíneos, a los tejidos y hacia el sitio de infección.

VLA-1 (también llamada $\alpha 1\beta 1$) pertenece a una clase de integrinas llamadas integrinas VLA (“*Very Late Antigen* - antígeno muy tardío”). VLA-1 se une al colágeno (tanto los tipos I como IV) y la laminina, y se ha asociado con la adhesión celular y la migración al colágeno; contracción y reorganización de matrices de colágeno; y regulación de la expresión de genes involucrados en la remodelación de la matriz extracelular.

Se ha comprobado que la VLA-1 está implicada en el desarrollo de la artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria crónica asociada a la resorción ósea. La infiltración de las células T en la membrana sinovial artrítica de los pacientes expresa altos niveles de VLA-1, y su bloqueo con anticuerpos reduce significativamente la respuesta inflamatoria y el desarrollo de la artritis en modelos animales.

El documento WO 02/083854 A2 se refiere a anticuerpos que se unen específicamente a integrina VLA-1 y a métodos de uso de estos anticuerpos para tratar los trastornos inmunológicos de un individuo.

25 **Sumario**

La invención se basa, al menos en parte, en el desarrollo de formulaciones que contienen altas concentraciones de anticuerpo anti-VLA-1. Algunas realizaciones son especialmente adecuadas para su suministro a un individuo, tal como un ser humano, por ejemplo, un paciente humano, mediante suministro subcutáneo (SC).

A partir de la descripción contenida en la presente memoria, la presente invención proporciona una composición farmacéutica de anticuerpos acuosa que comprende

35 (i) de 165 mg/ml a 190 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 (anti-*Very Late Antigen*-1) que tiene una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de id. de sec. n.º 1 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la id. de sec. n.º: 2, que comprende, además

40 (ii) histidina a una concentración de 25 mM a 35 mM;

(iii) sorbitol a una concentración de 170 mM a 288 mM; y

(iv) polisorbato a una concentración de 0,008 % a 0,012 %, y

45 y donde la composición tiene un pH de 5 a 7.

La presente invención y realizaciones de la misma se exponen en las reivindicaciones anexas

50 Las formulaciones proporcionan un efecto terapéutico para un trastorno inflamatorio, inmunitario o autoinmune. Por ejemplo, la formulación puede proporcionar un efecto terapéutico para un trastorno inflamatorio, tal como la artritis reumatoide (AR).

En un aspecto, la descripción muestra una composición farmacéutica acuosa, tal como una composición farmacéutica acuosa estable, que contiene un anticuerpo anti-VLA-1 a una concentración de ≥ 100 mg/ml, por ejemplo, al menos aproximadamente 110 mg/ml, al menos aproximadamente 120 mg/ml, al menos aproximadamente 130 mg/ml, al menos aproximadamente 140 mg/ml, al menos aproximadamente 150 mg/ml, al menos aproximadamente 160 mg/ml, al menos aproximadamente 170 mg/ml, al menos aproximadamente 180 mg/ml, al menos aproximadamente 190 mg/ml, o al menos aproximadamente 200 mg/ml. En un ejemplo, la composición comprende un anticuerpo anti-VLA-1 a una concentración inferior a aproximadamente 200 mg/ml, inferior a aproximadamente 205 mg/ml, inferior a aproximadamente 210 mg/ml, inferior a aproximadamente 215 mg/ml, inferior a aproximadamente 220 mg/ml o inferior a aproximadamente 225 mg/ml. En otro ejemplo, la composición comprende un anticuerpo anti-VLA a una concentración de aproximadamente 155 mg/ml a aproximadamente 165 mg/ml, de aproximadamente 165 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml, de aproximadamente 175 mg/ml a aproximadamente 185 mg/ml, de aproximadamente 180 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml, de aproximadamente 185 mg/ml a aproximadamente 195 mg/ml, de aproximadamente 195 mg/ml a aproximadamente 205 mg/ml, de aproximadamente 205 mg/ml a aproximadamente 215 mg/ml o de aproximadamente 215 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml. En otro ejemplo, la composición comprende un anticuerpo

anti-VLA-1 a una concentración superior a aproximadamente 100 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml, tal como de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, de aproximadamente 175 mg/ml a aproximadamente 195 mg/ml, o de aproximadamente 180 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml.

5 En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 además comprende un tampón, tal como un tampón de acetato, histidina, succinato o fosfato. El tampón puede estar a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, por ejemplo, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, tal como de aproximadamente 30 mM. Por ejemplo, la composición puede contener un tampón de histidina a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, por ejemplo, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, tal como de aproximadamente 30 mM. En una realización, la composición contiene un tampón de acetato a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM, por ejemplo, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, tal como de aproximadamente 30 mM.

15 En otro ejemplo, la composición farmacéutica acuosa además comprende un excipiente, tal como sorbitol, cloruro de sodio (NaCl), sacarosa, trehalosa o manitol. La composición puede incluir un excipiente a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 300 mM, por ejemplo, de 110 mM a aproximadamente 270 mM, de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 230 mM, o de aproximadamente 130 mM a aproximadamente 210 mM, de aproximadamente 170 mM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 200 mM. Por ejemplo, la composición puede contener sorbitol a una concentración de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 300 mM, por ejemplo, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 240 mM, de aproximadamente 230 mM a aproximadamente 270 mM, o de aproximadamente 240 mM a aproximadamente 260 mM. En otro ejemplo, la composición puede contener NaCl a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, por ejemplo, de aproximadamente 110 mM a aproximadamente 190 mM, de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 180 mM, o de aproximadamente 130 mM a aproximadamente 170 mM. En otro ejemplo, la composición puede contener sacarosa a una concentración de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 240 mM, de aproximadamente 230 mM a aproximadamente 270 mM, o de aproximadamente 240 mM a aproximadamente 260 mM. En otro ejemplo, la composición puede contener trehalosa a una concentración de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 240 mM, de aproximadamente 230 mM a aproximadamente 270 mM, o de aproximadamente 240 mM a aproximadamente 260 mM. En otro ejemplo más, la composición puede contener manitol a una concentración de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 240 mM, de aproximadamente 230 mM a aproximadamente 270 mM, o de aproximadamente 240 mM a aproximadamente 260 mM.

25 En otro ejemplo, la composición farmacéutica acuosa además comprende un tensioactivo, tal como un polisorbato, por ejemplo, polisorbato 80 o polisorbato 20. En una realización, la concentración de tensioactivo es a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,5 %, de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,1 %, por ejemplo, de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %, tal como aproximadamente 0,01 %.

35 Como se utiliza en la presente memoria, un “tensioactivo” es una sustancia que reduce la tensión superficial de un líquido, y se utilizan para evitar la adsorción superficial y actúan como estabilizantes frente a la agregación de proteínas. Los tensioactivos ilustrativos adecuados para su uso en la presente memoria incluyen, por ejemplo, polisorbato 80 (también denominado Tween 80), polisorbato 20 (también denominado Tween 20). También pueden utilizarse otros tensioactivos de resistencia similar.

45 En otro ejemplo más, la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 7, por ejemplo, un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 7, un pH de aproximadamente 5 a aproximadamente 6, un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7, o un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 6,5. En un ejemplo, la composición tiene un pH de aproximadamente 4,5, un pH de aproximadamente 5, un pH de aproximadamente 5,5, un pH de aproximadamente 6, un pH de aproximadamente 6,5 o un pH de aproximadamente 7.

50 En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa comprende un tampón, un excipiente, y un tensioactivo. Por ejemplo, en un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa comprende acetato, sorbitol y polisorbato 80. En un ejemplo, el acetato está a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, el sorbitol está a una concentración de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 240 mM, el polisorbato 80 está a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %, y la composición tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6. En otro ejemplo, el acetato está a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, el sorbitol está a una concentración de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 300 mM, el polisorbato 80 está en una concentración de aproximadamente 0,0055 % a aproximadamente 0,05 %, y la composición tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 5,5. En un ejemplo, el acetato está a una concentración de aproximadamente 30 mM, el sorbitol está a una concentración de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 250 mM, el polisorbato 80 está en una concentración de aproximadamente 0,01 %, y la formulación tiene un pH de aproximadamente 5,5.

55 En otro ejemplo, la composición comprende histidina, sorbitol y polisorbato 20. Por ejemplo, la histidina está a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, el sorbitol está a una concentración de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 270 mM, el polisorbato 20 está en una concentración de aproximadamente 0,005 % a 0,05 %, y la composición tiene un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 7.

En un ejemplo, la histidina está a una concentración de aproximadamente 30 mM, el sorbitol está a una concentración de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 250 mM, el polisorbato 20 está en una concentración de aproximadamente 0,01 %, y la composición tiene un pH de aproximadamente 6,0.

5 En otro ejemplo, la composición farmacéutica acuosa comprende acetato, NaCl y polisorbato 80. En un ejemplo, el acetato está a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, el NaCl está a una concentración de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 180 mM, el polisorbato 80 está en una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %, y la composición tiene un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6. En un ejemplo, el acetato está a una concentración de
10 aproximadamente 30 mM, el NaCl está a una concentración de aproximadamente 150 mM, el polisorbato 80 está en una concentración de aproximadamente 0,01 %, y la formulación tiene un pH de aproximadamente 5,5.

En otro ejemplo, la composición comprende histidina, NaCl y polisorbato 20. Por ejemplo, la histidina está a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, el NaCl está a una concentración de
15 aproximadamente 120 mM a aproximadamente 180 mM, el polisorbato 20 está a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %, y la composición tiene un pH de aproximadamente 6 a aproximadamente 7. En una realización, la histidina está a una concentración de aproximadamente 30 mM, el NaCl está a una concentración de aproximadamente 150 mM, el polisorbato 20 está en una concentración de aproximadamente 0,01 %, y la composición tiene un pH de aproximadamente 6,0.

20 En otra realización, el anticuerpo anti-VLA-1 en la composición farmacéutica acuosa es un anticuerpo monoclonal. En otra realización, el anticuerpo anti-VLA-1 es un anticuerpo injertado en CDR. En otra realización más, el anticuerpo anti-VLA-1 es un anticuerpo humanizado.

25 En otra realización, el anticuerpo anti-VLA-1 es un anticuerpo monoclonal humanizado, tal como SAN-300. En otro ejemplo, el anticuerpo anti-VLA-1 es una variante de SAN-300. Por ejemplo, en algunos ejemplos, la región variable de cadena ligera del anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos de aminoácido, pero no más de 2 residuos de aminoácido, 3 residuos de aminoácido, 4 residuos de aminoácido, 5 residuos de aminoácido, o 6 residuos de aminoácido de la región variable de cadena ligera de SAN-300, y/o la región variable de
30 cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos de aminoácido, pero no más de 2 residuos de aminoácido, 3 residuos de aminoácido, 4 residuos de aminoácido, 5 residuos de aminoácido o 6 residuos de aminoácido de la región variable de cadena pesada de SAN-300. En algunos ejemplos, algunas o todas las diferencias son cambios conservativos.

35 En otro ejemplo, el anticuerpo anti-VLA-1 tiene una o ambas de entre una región variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de la id. de sec. n.º 4 (figura 2A), y una región variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de la id. de sec. n.º 5 (figura 2B). En otros ejemplos, el anticuerpo anti-VLA-1 es una variante de uno de dichos anticuerpos. Por ejemplo, en algunos ejemplos, la región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos de aminoácidos, pero no más de 2 residuos de aminoácido, 3 residuos
40 de aminoácido, 4 residuos de aminoácido, 5 residuos de aminoácido, 6 residuos de aminoácido, 7 residuos de aminoácido, 8 residuos de aminoácido, 9 residuos de aminoácido o 10 residuos de aminoácido de la secuencia de la id. de sec. n.º 4, y/o la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos de aminoácido, pero no más de 2 residuos de aminoácido, 3 residuos de aminoácido, 4 residuos de aminoácido, 5 residuos de aminoácido, 6 residuos de aminoácido, 7 residuos de aminoácido, 8 residuos de aminoácido, 9 residuos
45 de aminoácido o 10 residuos de aminoácido definidos según la id. de sec. n.º 5. En otros ejemplos, la región variable de cadena ligera tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % a la secuencia de la id. de sec. n.º 4, y/o la región variable de cadena pesada tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % a la secuencia de la id. de sec. n.º 5.

50 En otro ejemplo más, el anticuerpo anti-VLA-1 tiene una o ambas de entre una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 (figura 3), y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la id. de sec. n.º 2 (figura 4). En otros ejemplos, el anticuerpo contra VLA-1 es una variante de uno de dichos anticuerpos. Por ejemplo, en algunos ejemplos, la cadena ligera del anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos de aminoácidos, pero no más de 2 residuos de aminoácido, 3 residuos de aminoácido, 4 residuos de aminoácido, 5 residuos de aminoácido, 6
55 residuos de aminoácido, 7 residuos de aminoácido, 8 residuos de aminoácido, 9 residuos de aminoácido o 10 residuos de aminoácido de la secuencia de la id. de sec. n.º 1, y/o la cadena pesada del anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos que difiere en uno o más residuos de aminoácido, pero no más de 2 residuos de aminoácido, 3 residuos de aminoácido, 4 residuos de aminoácido, 5 residuos de aminoácido, 6 residuos de aminoácido, 7 residuos de aminoácido, 8 residuos de aminoácido, 9 residuos de aminoácido o 10 residuos de aminoácido de la secuencia de la id. de sec. n.º 2. En otros ejemplos,
60 la cadena ligera del anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % a la secuencia de la id. de sec. n.º 1, y/o la cadena pesada del anticuerpo tiene una secuencia de aminoácidos que es idéntica en un 80 %, 85 %, 90 % o 95 % a la secuencia de la id. de sec. n.º 2.

Una primera secuencia de aminoácidos “difiere” o es “diferente” o muestra una “diferencia” en comparación con una
65 segunda secuencia de aminoácidos cuando existe una diferencia en la identidad de un aminoácido (por ejemplo, una sustitución de un aminoácido diferente para un aminoácido en la id. de sec. n.º 4 o 5 mencionado anteriormente), o una

delección o inserción. Una diferencia puede ser, por ejemplo, en una región marco, una región CDR, una región de bisagra o una región constante. Una diferencia puede ser interna o estar situada al final de una secuencia de proteína. En algunos ejemplos, algunas o todas las diferencias son cambios conservativos en comparación con la secuencia indicada.

5 En otro ejemplo, la composición comprende menos de citrato 20 mM y, en otro ejemplo, la composición está prácticamente exenta de citrato. Por ejemplo, el nivel de citrato comprende menos de citrato 20 mM, o el nivel de citrato es tal que no tiene efecto en una propiedad descrita en la presente memoria, tal como dolor en el sitio de inyección cuando se administra a un individuo.

10 En otra realización, la composición farmacéutica acuosa que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de la id. de sec. n.º 2 es estable durante al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, al menos 30 meses, o al menos 36 meses o más (por ejemplo, al menos 1 año, al menos 2 años, al menos 3 años o más). Por ejemplo, la composición puede ser estable durante al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, al menos 30 meses, o al menos 36 meses o más (por ejemplo, al menos 1 año, al menos 2 años, al menos 3 años o más), a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C (por ejemplo, de aproximadamente 4 °C, aproximadamente 5 °C). En una realización, la composición es estable durante al menos 24 meses (al menos 2 años) a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C. En otra realización, la composición es estable durante al menos 2 días, al menos 3 días, al menos 4 días, al menos 5 días, al menos 6 días, o al menos 7 días o más (por ejemplo, al menos una semana, o al menos 12 días, o al menos 14 días o más), a temperatura ambiente (de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, tal como aproximadamente 25 °C).

En una realización, menos de aproximadamente 1 %, menos de aproximadamente 2 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 10 %, o menos de aproximadamente 15 % del anticuerpo en la composición de anticuerpo anti-VLA-1 se ha agregado al cabo de un período de 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 30 meses, o 36 meses o más, tal como al cabo de un período de 1 año, 2 años o 3 años o más. En otra realización, menos de aproximadamente 1 %, menos de aproximadamente 2 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 10 %, o menos de aproximadamente 15 % del anticuerpo en la composición de anticuerpo anti-VLA-1 se ha fragmentado al cabo de un período de 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 30 meses, o 36 meses o más, tal como al cabo de un período de 1 año, 2 años, 3 años o más.

En determinadas realizaciones, la agregación o fragmentación de la proteína se mide mediante dynamic light scattering (dispersión de luz dinámica - DLS), size exclusion chromatography (cromatografía de exclusión por tamaño - SEC), color/transparencia, dispersión de luz UV o cromatografía de exclusión por tamaño. En una realización, la agregación se mide mediante DLS. La DLS se puede llevar a cabo por métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos, por ejemplo, por Nobbmann y col., en "Dynamic Light Scattering as a Relative Tool for Assessing the Molecular Integrity and Stability of Monoclonal Antibodies" *Biotech. and Genetic Engineering Rev.* 24:117-128, 2007. En otra realización, la agregación se mide mediante SEC. La SEC se puede realizar mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica, tales como los descritos, por ejemplo, en Skoog, D. A.; *Principles of Instrumental Analysis*, 6ª ed.; Thompson Brooks/Cole: Belmont, CA, 2006, capítulo 28.

En una realización, menos de aproximadamente 1 %, menos de aproximadamente 2 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 15 % o menos de aproximadamente 20 % del anticuerpo en la composición farmacéutica acuosa ha experimentado fragmentación al cabo de un período de 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 30 meses, o 36 meses o más, (por ejemplo, al cabo de un período de 1 año, 2 años, 3 años o más).

En una realización, menos de aproximadamente 1 %, menos de aproximadamente 2 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 15 % o menos de aproximadamente 20 % del anticuerpo en la composición farmacéutica acuosa ha experimentado fragmentación al cabo de un período de 6 meses, 12 meses, 18 meses, 24 meses, 30 meses, o 36 meses o más, (por ejemplo, al cabo de un período de 1 año, 2 años, 3 años o más). En otra realización, se analiza la desamidación mediante la medición de la pérdida de proteínas, tal como mediante espectroscopía, por ejemplo, espectroscopía de UV-Vis ("ultravioleta-visible"). El uso de espectroscopia de UV-Vis se estudia en, por ejemplo, Schmid, "Biological Macromolecules: UV-visible spectrophotometry" *Encyclopedia of Life Sciences*, p. 1-4, publicado en línea el 19 de abril de 2001.

En una realización, el anticuerpo anti-VLA-1 en la composición farmacéutica acuosa presenta menos de un nivel previamente seleccionado de agregación cuando la formulación se almacena en un recipiente cerrado a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, tal como a aproximadamente 4 °C, durante un período de tiempo previamente seleccionado, tal como al cabo de un período de almacenamiento de al menos 30 días, al menos 60 días, al menos 90 días, al menos 180 días, al menos 1 año, al menos 1,5 años, al menos 2 años, al menos 2,5 años, al menos 3 años o más. En otra realización, el anticuerpo anti-VLA-1 en la composición farmacéutica acuosa presenta un nivel de pérdida de proteína inferior a un nivel previamente seleccionado debido a la agregación cuando la formulación se almacena en un recipiente cerrado a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, por ejemplo, a aproximadamente 4 °C, durante un período de tiempo previamente seleccionado. En una realización, el nivel previamente seleccionado de pérdida de proteína es inferior a aproximadamente 40 %, inferior a aproximadamente 35 %, inferior a aproximadamente 30 %, inferior a

aproximadamente 20 %, inferior a aproximadamente 15 %, inferior a aproximadamente 10 %, inferior a aproximadamente 8 %, inferior a aproximadamente 5 %, inferior a aproximadamente 3 %, inferior a aproximadamente 1 %, o inferior a aproximadamente 0,5 %. En una realización, al cabo de 6 meses, un año, dos años o tres años, menos de aproximadamente 1 %, menos de aproximadamente 2 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 10 %, menos de aproximadamente 15 %, menos de aproximadamente 20 %, menos de aproximadamente 30 %, menos de aproximadamente 35 %, menos de aproximadamente 40 % del anticuerpo en la formulación ha experimentado agregación.

La pérdida de proteínas puede medirse, por ejemplo, mediante espectroscopía, tal como espectroscopía de UV-Vis. En determinadas realizaciones, la agregación se mide mediante dynamic light scattering (dispersión de luz dinámica - DLS), color/transparencia, dispersión de luz UV o cromatografía de exclusión por tamaño.

En otra realización, el anticuerpo anti-VLA-1 en la composición farmacéutica acuosa presenta un nivel de pérdida de proteína inferior a un nivel previamente seleccionado cuando la formulación se somete a un número previamente seleccionado de ciclos de congelación/descongelación, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más ciclos de congelación/descongelación. En una realización, el número previamente seleccionado de ciclos de congelación/descongelación es de 5. Un “ciclo de congelación/descongelación” es una secuencia que comprende al menos un período en el que la muestra es un sólido congelado seguido de un período en el que las muestras son un líquido, o una secuencia que comprende al menos un período en el que la muestra es líquida seguido de un período en el que las muestras son un sólido congelado. Los períodos de tiempo pueden ser igual a, o de mayor duración que, por ejemplo, 5 minutos, 10 minutos, 15 minutos, 20 minutos, 30 minutos, 45 minutos, 60 minutos o de 120 minutos, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 6 horas, 24 horas, 48 horas, o 3 días, 5 días, 10 días, o 20 días de duración. Los períodos líquidos y sólidos no tienen por qué ser de la misma longitud. Los períodos sólidos pueden mantenerse a 0 °C o menos, por ejemplo, -10 °C, -20 °C, -30 °C, -40 °C, -60 °C o -80 °C. El período sólido puede ser de al menos, por ejemplo, 2 horas, 3 horas, 4 horas, o más. El período sólido puede ir seguido de descongelación, por ejemplo, a 18 °C, 20 °C, 23 °C, o más, hasta que se funde. La muestra puede permanecer fundida durante 20 minutos, 30 minutos, una hora, o dos horas o más, antes de congelar la muestra de nuevo, para comenzar otro ciclo de congelación/descongelación. La muestra se puede almacenar en estado congelado o en estado fundido entre ciclos de congelación/descongelación. En una realización, el nivel previamente seleccionado de pérdida de proteína después de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o más ciclos de congelación/descongelación es, por ejemplo, inferior a aproximadamente 40 %, inferior a aproximadamente 35 %, inferior a aproximadamente 30 %, inferior a aproximadamente 20 %, inferior a aproximadamente 15 %, inferior a aproximadamente 10 %, inferior a aproximadamente 8 %, inferior a aproximadamente 5 %, inferior a aproximadamente 3 %, inferior a aproximadamente 1 %, o inferior a aproximadamente 0,5 %. La pérdida de proteínas puede medirse, por ejemplo, mediante espectroscopía de UV-Vis.

En otra realización más, el anticuerpo anti-VLA-1 en la composición farmacéutica acuosa presenta un nivel de pérdida de proteína inferior a un nivel previamente seleccionado cuando la formulación se somete a estrés lumínico, tal como cuando la composición se almacena en un recipiente cerrado a una temperatura de 2 °C a 8 °C, por ejemplo, 4 °C, y se expone a un 1,2 lux horas de luz blanca y a continuación a energía UV de 200 W/m². En una realización, el nivel previamente seleccionado de pérdida de proteína es inferior a aproximadamente 40 %, inferior a aproximadamente 35 %, inferior a aproximadamente 30 %, inferior a aproximadamente 20 %, inferior a aproximadamente 15 %, inferior a aproximadamente 10 %, inferior a aproximadamente 8 %, inferior a aproximadamente 5 %, inferior a aproximadamente 3 %, inferior a aproximadamente 1 %, o inferior a aproximadamente 0,5 %. La pérdida de proteínas puede medirse, por ejemplo, mediante espectroscopía de UV-Vis.

En otra realización, el anticuerpo anti-VLA-1 en la composición farmacéutica acuosa presenta un nivel de pérdida de proteína inferior a un nivel previamente seleccionado cuando la formulación se somete a agitación, por ejemplo, agitación a 550 rpm, 600 rpm, 650 rpm, 700 rpm, 750 rpm, o más rápida, durante un período de tiempo previamente seleccionado, tal como durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días, 5 días o más (por ejemplo, durante 24 horas, 48 horas, 72 horas, 96 horas, 120 horas o más) a temperatura ambiente. En una realización, el nivel previamente seleccionado de pérdida de proteína es inferior a aproximadamente 40 %, inferior a aproximadamente 35 %, inferior a aproximadamente 30 %, inferior a aproximadamente 20 %, inferior a aproximadamente 15 %, inferior a aproximadamente 10 %, inferior a aproximadamente 8 %, inferior a aproximadamente 5 %, inferior a aproximadamente 3 %, inferior a aproximadamente 2 %, inferior a aproximadamente 1,5 %, inferior a aproximadamente 1 %, inferior a aproximadamente 0,5 %, o inferior a aproximadamente 0,25 %. La pérdida de proteínas puede medirse, por ejemplo, mediante espectroscopía de UV-Vis.

En otra realización, el anticuerpo anti-VLA-1 en la composición farmacéutica acuosa presenta un nivel de pérdida de proteína inferior a un nivel previamente seleccionado cuando la formulación se somete a un nivel previamente seleccionado de estrés oxidativo. El nivel previamente seleccionado de estrés oxidativo se puede proporcionar mediante la presencia de peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0,04 % (v/v) con incubación a 37 °C durante un período de tiempo previamente seleccionado, tal como durante 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, o 6 horas o más. En una realización, el nivel previamente seleccionado de pérdida de proteína es inferior a aproximadamente 35 %, inferior a aproximadamente 30 %, inferior a aproximadamente 25 %, inferior a aproximadamente 20 %, inferior a aproximadamente 15 %, o inferior a aproximadamente 10 %. La pérdida de proteínas puede medirse, por ejemplo, mediante espectroscopía de UV-Vis.

En otra realización, el anticuerpo anti-VLA-1 en la composición farmacéutica acuosa presenta un nivel de pérdida de proteína inferior a un nivel previamente seleccionado cuando la formulación se somete a un nivel previamente seleccionado de estrés por desamidación. El nivel previamente seleccionado de desamidación puede proporcionarse aumentando el pH de la composición, tal como a un pH ≥ 9 en presencia de tampón Tris(tris(hidroximetil)aminometano), y después incubando la composición a aproximadamente 25 °C durante un período de tiempo previamente seleccionado, tal como durante 2 días, 3 días, 4 días, 5 días, 6 días o más. En una realización, el nivel previamente seleccionado de pérdida de proteína es inferior a aproximadamente 20 %, inferior a aproximadamente 15 %, inferior a aproximadamente 10 %, inferior a aproximadamente 5 %, inferior a aproximadamente 3 %, o inferior a aproximadamente 1 %. La pérdida de proteínas puede medirse, por ejemplo, mediante espectroscopía de UV-Vis.

En una realización, la composición farmacéutica acuosa que comprende una formulación de anticuerpo anti-VLA-1 es para administración subcutánea (SC).

En una realización, la composición farmacéutica acuosa puede ser administrada con jeringa para la autoadministración por parte del paciente a un sitio de administración subcutánea. Por ejemplo, la composición acuosa, cuando se dispone en una jeringa adecuada para la administración subcutánea puede ser expulsada e inyectada de este modo a un sitio de administración subcutáneo del paciente, usando una presión suficiente para apretar el émbolo para la autoadministración por parte del paciente. La presión, o “fuerza del émbolo” puede ser, por ejemplo, igual o inferior a 4 libras. En una realización, la fuerza del émbolo permitirá la administración de una dosificación unitaria en 10 segundos o menos. En otra realización, aproximadamente 1 ml de una composición farmacéutica acuosa, dispuesta en una jeringa que tiene una aguja de un calibre previamente seleccionado, se puede expulsar a una velocidad previamente seleccionada con una fuerza del émbolo no superior a una cantidad previamente seleccionada. En otra realización, aproximadamente 2 ml de una composición farmacéutica acuosa, dispuesta en una jeringa que tiene una aguja de un calibre previamente seleccionado, se puede expulsar a una velocidad previamente seleccionada con una fuerza del émbolo no superior a una cantidad previamente seleccionada. Por ejemplo, se puede expulsar aproximadamente 1 ml de la composición farmacéutica acuosa, dispuesta en una jeringa que tiene una aguja de calibre 25, una aguja de calibre 27, o una aguja de calibre 30 a 10 ml/minuto con una fuerza del émbolo no superior a 4 libras.

Como se utiliza en la presente memoria, una “dosificación unitaria” es una cantidad adecuada para administrar de una sola vez. La dosificación unitaria puede proporcionar una cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo anti-VLA-1; por ejemplo, una cantidad de anticuerpo anti-VLA-1 para aliviar uno o más síntomas de un trastorno inflamatorio, tal como uno o más síntomas de artritis o IBD.

En una realización, la composición farmacéutica acuosa que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 tiene una viscosidad adecuada para el suministro subcutáneo con una jeringa, tal como una viscosidad inferior a 21 cP (centipoises), inferior a 18 cP, inferior a 15 cP, inferior a 14 cP, tal como a 3 rpm, 5 rpm, 7 rpm, o 9 rpm. En una realización, la composición tiene una viscosidad de aproximadamente 10 cP a aproximadamente 20 cP, de aproximadamente 10 cP a aproximadamente 15 cP, de aproximadamente 10 cP a aproximadamente 14 cP o, por ejemplo, de 10 cP a 13 cP, a por ejemplo, 3 rpm, 5 rpm, 7 rpm, o 9 rpm.

La “viscosidad” es una medida de la resistencia de un fluido que se deforma por esfuerzo cortante o tensión. Una sustancia más espesa tiene una mayor resistencia y, por lo tanto, mayor viscosidad, que una sustancia menos espesa.

En una realización, la composición farmacéutica acuosa es para la administración por parte de un profesional de la salud.

En un ejemplo, la descripción presenta una composición farmacéutica acuosa que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2; acetato a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM; sorbitol a una concentración de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 275 mM; polisorbato 80 a una concentración de 0,005 % a 0,5 %; y un pH de aproximadamente 4,5 a un pH de aproximadamente 6,0. En un ejemplo, la concentración de anticuerpos es de ≥ 100 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, de aproximadamente 140 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml. En otro ejemplo, el anticuerpo está a una concentración de aproximadamente 155 mg/ml a aproximadamente 195 mg/ml, de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml, o de aproximadamente 170 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml. En algunos ejemplos, el anticuerpo está a una concentración de aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 165 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml o aproximadamente 190 mg/ml.

En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa comprende acetato a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, por ejemplo, aproximadamente 30 mM. En otro ejemplo, la composición farmacéutica acuosa contiene sorbitol a una concentración de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 275 mM, por ejemplo, de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 240 mM. En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa contiene sorbitol a una concentración de aproximadamente 250 mM. En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa contiene polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %, tal como a aproximadamente 0,01 %. En otro ejemplo más, la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de aproximadamente 5,5.

5 En una realización, la composición farmacéutica acuosa de la invención que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 tiene una osmolalidad de aproximadamente 80 mOsm/kg a aproximadamente 500 mOsm/kg, por ejemplo, de aproximadamente 100 mOsm/kg a aproximadamente 450 mOsm/kg, de aproximadamente 150 mOsm/kg a aproximadamente 400 mOsm/kg, de aproximadamente 200 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg, por ejemplo, de aproximadamente 280 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg, por ejemplo, de aproximadamente 300 mOsm/kg a aproximadamente 325 mOsm/kg. En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 tiene una osmolalidad inferior a aproximadamente 500 mOsm/kg, inferior a aproximadamente 455 mOsm/kg, inferior a aproximadamente 405 mOsm/kg, inferior a aproximadamente 355 mOsm/kg, inferior a aproximadamente 305 mOsm/kg o inferior a aproximadamente 255 mOsm/kg.

10 En otro ejemplo, la composición farmacéutica acuosa contiene un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2 a una concentración de aproximadamente 170 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml. En un ejemplo, la composición también incluye acetato a una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 35 mM, sorbitol a una concentración de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 275 mM, polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,02 %, y un pH de aproximadamente 5,5.

20 En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa incluye un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2 a una concentración de aproximadamente 185 mg/ml a aproximadamente 195 mg/ml; acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM; sorbitol a una concentración de aproximadamente 250 mM; polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,01 %; y un pH de aproximadamente 5,5.

25 En una realización, la composición farmacéutica acuosa de la invención comprende un anticuerpo anti-VLA-1 a una concentración de aproximadamente 190 mg/ml.

30 En un aspecto, la descripción presenta una composición farmacéutica acuosa que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2; acetato a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM; NaCl a una concentración de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 180 mM; polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %; y un pH de aproximadamente 4,5 a aproximadamente 6,0. En un ejemplo, el anticuerpo está a una concentración de ≥ 100 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, de aproximadamente 140 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml. En otro ejemplo, el anticuerpo está a una concentración de aproximadamente 155 mg/ml a aproximadamente 195 mg/ml, de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml, o de aproximadamente 170 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml. En algunos ejemplos, el anticuerpo está a una concentración de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 165 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml o aproximadamente 190 mg/ml.

40 En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa comprende acetato a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, por ejemplo, aproximadamente 30 mM. En otro ejemplo, la composición farmacéutica acuosa contiene NaCl a una concentración de aproximadamente 130 mM a aproximadamente 170 mM, por ejemplo, de aproximadamente 140 mM a aproximadamente 160 mM. En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa contiene NaCl a concentración de aproximadamente 150 mM. En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa contiene polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %, tal como a aproximadamente 0,01 %. En otro ejemplo más, la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de aproximadamente 5,5.

50 En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 tiene una osmolalidad de 80 mOsm/kg a 350 mOsm/kg.

55 En otro ejemplo, la composición farmacéutica acuosa contiene un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2 a una concentración de aproximadamente 170 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml. En un ejemplo, la composición también incluye acetato a una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 35 mM, NaCl a una concentración de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 180 mM, polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,02 %, y un pH de aproximadamente 5,5.

60 En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa incluye un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2 a una concentración de aproximadamente 185 mg/ml a aproximadamente 195 mg/ml; acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM; NaCl a una concentración de aproximadamente 150 mM; polisorbato 80 a aproximadamente 0,01 %; y un pH de aproximadamente 5,5.

65 En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa comprende un anticuerpo anti-VLA-1 a una concentración de aproximadamente 190 mg/ml.

5 En un ejemplo, la descripción presenta una composición farmacéutica acuosa que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2; histidina a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM; sorbitol a una concentración de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 300 mM; polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %; y un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,0. En un ejemplo, el anticuerpo está a una concentración de \geq 100 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, de aproximadamente 140 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml. En otro ejemplo, el anticuerpo está a una concentración de aproximadamente 155 mg/ml a aproximadamente 195 mg/ml, de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml, o de aproximadamente 170 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml. En algunos ejemplos, el anticuerpo está a una concentración de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 165 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml o aproximadamente 190 mg/ml.

15 En un ejemplo, la composición incluye histidina a una concentración de 20 mM a 40 mM, tal como a una concentración de aproximadamente 30 mM. En otra realización, la composición comprende sorbitol a una concentración de 220 mM a 280 mM, por ejemplo, de 240 mM a 260 mM, tal como de aproximadamente 250 mM. En otro ejemplo, la composición comprende polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a 0,05 %, tal como de aproximadamente 0,01 %. En otra realización, la composición tiene un pH de aproximadamente 6,0 y, en otro ejemplo más, la composición tiene una osmolalidad de aproximadamente 280 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg.

25 En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa incluye un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2 a una concentración de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml; histidina a una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 35 mM de histidina; sorbitol a una concentración de aproximadamente 240 mM a aproximadamente 260 mM; polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,02 %; y un pH de aproximadamente 6.

30 En otra realización, la composición incluye un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2 a una concentración de aproximadamente 170 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml. histidina a una concentración de aproximadamente 30 mM; sorbitol a una concentración de aproximadamente 250 mM; polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,01 %; y un pH de aproximadamente 6.

35 En una realización, la composición incluye anticuerpo a una concentración de aproximadamente 180 mg/ml.

40 En un aspecto, la descripción presenta composición farmacéutica acuosa que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2; histidina a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM; NaCl a una concentración de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 180 mM; polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %; y un pH de aproximadamente 5,5 a aproximadamente 7,0. En un ejemplo, la concentración de anticuerpo está a una concentración de \geq 100 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 120 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, o de aproximadamente 140 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml. En otro ejemplo, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 155 mg/ml a aproximadamente 195 mg/ml, de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml, o de aproximadamente 170 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml. En algunos ejemplos, la concentración de anticuerpo es de aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 165 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml o 190 mg/ml.

50 En un ejemplo, la composición incluye histidina a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, tal como a una concentración de aproximadamente 30 mM. En otra realización, la composición comprende NaCl a una concentración de aproximadamente 130 mM a aproximadamente 170 mM, por ejemplo, de aproximadamente 140 mM a aproximadamente 160 mM, tal como de aproximadamente 150 mM. En otro ejemplo, la composición comprende polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %, tal como de aproximadamente 0,01 %. En otra realización, la composición tiene un pH de aproximadamente 6,0 y, en otra realización más, la composición tiene una osmolalidad de aproximadamente 280 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg.

60 En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa incluye un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2 a una concentración de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml; histidina a una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 35 mM de histidina; NaCl a una concentración de aproximadamente 140 mM a aproximadamente 160 mM; polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,02 %; y un pH de aproximadamente 6.

65 En otro ejemplo, la composición incluye un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2 a una concentración de aproximadamente 170 mg/ml a aproximadamente 180 mg/ml; histidina a una concentración de aproximadamente

30 mM; NaCl a una concentración de aproximadamente 150 mM; polisorbato 20 a aproximadamente 0,01 %; y un pH de aproximadamente 6.

En un ejemplo, la composición incluye anticuerpo a una concentración de aproximadamente 180 mg/ml.

5 En un aspecto, la descripción presenta una composición farmacéutica acuosa que contiene un anticuerpo anti-VLA-1 en una cantidad eficaz para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria; y un medio para suministrar la cantidad eficaz del anticuerpo en una formulación adecuada para el suministro subcutáneo.

10 En un aspecto, la descripción presenta una forma farmacéutica unitaria de una composición farmacéutica acuosa descrita en la presente memoria. En un ejemplo, la composición incluye aproximadamente 200 mg de anticuerpo anti-VLA-1. En otro ejemplo, la composición incluye un anticuerpo anti-VLA-1 en una cantidad de aproximadamente 155 mg a aproximadamente 165 mg, de aproximadamente 165 mg a aproximadamente 175 mg, de aproximadamente 175 mg a aproximadamente 185 mg, de aproximadamente 185 mg a aproximadamente 195 mg de aproximadamente 195 mg a aproximadamente 205 mg, de aproximadamente 205 mg a aproximadamente 215 mg, o de aproximadamente 215 mg a aproximadamente 225 mg. En un ejemplo, la composición incluye anticuerpo anti-VLA-1 a una cantidad de aproximadamente 160 mg a aproximadamente 210 mg de anticuerpo, por ejemplo, de aproximadamente 180 mg o aproximadamente 190 mg.

20 En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa que contiene un anticuerpo anti-VLA-1, cuando se administra a un ser humano suministrará aproximadamente 2,0 mg de anticuerpo por kg de peso corporal a aproximadamente 4,0 mg de anticuerpo por kg de peso corporal al ser humano.

25 En otro ejemplo, la composición farmacéutica acuosa tiene un volumen de aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 1,5 ml, tal como aproximadamente 0,5 ml, aproximadamente 0,75 ml, o aproximadamente 1,0 ml. En un ejemplo, una dosis unitaria suministra un anticuerpo anti-VLA-1 en una cantidad de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 315 mg, tal como de aproximadamente 100 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 210 mg, aproximadamente 250 mg o aproximadamente 300 mg.

30 En otro aspecto, la descripción presenta una dosis unitaria de una formulación acuosa de anticuerpo anti-VLA-1, donde la administración de la dosis unitaria suministrará un anticuerpo anti-VLA-1 en una cantidad de aproximadamente 0,03 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 10 mg por kg de peso corporal, de aproximadamente 0,03 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 6 mg por kg de peso corporal, de aproximadamente 0,1 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 6 mg por kg de peso corporal, de aproximadamente 0,3 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 6 mg por kg de peso corporal, de aproximadamente 0,3 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 3 mg por kg de peso corporal, de aproximadamente 1 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 3 mg por kg de peso corporal, de aproximadamente 2,0 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 4,0 mg por kg de peso corporal. Por ejemplo, la administración de la dosis unitaria a un ser humano suministrará una cantidad de aproximadamente 2,1 mg/kg, aproximadamente 2,2 mg/kg, aproximadamente 2,3 mg/kg, aproximadamente 2,5 mg/kg, aproximadamente 2,8 mg/kg, aproximadamente 3,0 mg/kg, aproximadamente 3,1 mg/kg, aproximadamente 3,2 mg/kg, aproximadamente 3,3 mg/kg, aproximadamente 3,4 mg/kg, o aproximadamente 3,6 mg/kg.

45 En un aspecto, la descripción presenta una pluralidad de formas farmacéuticas unitarias de una composición farmacéutica acuosa descrita en la presente memoria. En un ejemplo, la pluralidad es dos.

En un ejemplo, la pluralidad de formas farmacéuticas unitarias, cuando se toman juntas, comprende al menos aproximadamente 160 mg de anticuerpo anti-VLA-1, al menos aproximadamente 170 mg de anticuerpo anti-VLA-1, al menos aproximadamente 180 mg de anticuerpo anti-VLA-1, al menos aproximadamente 190 mg de anticuerpo anti-VLA-1, al menos aproximadamente 200 mg de anticuerpo anti-VLA-1, al menos aproximadamente 300 mg de anticuerpo anti-VLA-1, al menos aproximadamente 400 mg de anticuerpo anti-VLA-1, al menos aproximadamente 500 mg de anticuerpo anti-VLA-1, al menos aproximadamente 600 mg de anticuerpo anti-VLA-1, al menos aproximadamente 700 mg de anticuerpo anti-VLA-1, al menos aproximadamente 800 mg de anticuerpo anti-VLA-1, al menos aproximadamente 900 mg de anticuerpo anti-VLA-1, al menos aproximadamente 1.000 mg de anticuerpo anti-VLA-1. En otro ejemplo, la pluralidad de formas farmacéuticas unitarias, cuando se toman juntas, comprende de aproximadamente 155 mg de anticuerpo anti-VLA-1 a aproximadamente 165 mg de anticuerpo anti-VLA-1, de aproximadamente 165 mg de anticuerpo anti-VLA-1 a aproximadamente 175 mg de anticuerpo anti-VLA-1, de aproximadamente 175 mg de anticuerpo anti-VLA-1 a aproximadamente 185 mg de anticuerpo anti-VLA-1, de aproximadamente 185 mg de anticuerpo anti-VLA-1 a aproximadamente 195 mg de anticuerpo anti-VLA-1, de aproximadamente 195 mg de anticuerpo anti-VLA-1 a aproximadamente 205 mg de anticuerpo anti-VLA-1, de aproximadamente 205 mg de anticuerpo anti-VLA-1 a aproximadamente 215 mg de anticuerpo anti-VLA-1, de aproximadamente 215 mg de anticuerpo anti-VLA-1 a aproximadamente 225 mg de anticuerpo anti-VLA-1. En otro ejemplo más, la pluralidad de formas farmacéuticas unitarias, cuando se toman en conjunto, incluye de aproximadamente 160 mg de anticuerpo anti-VLA-1 a aproximadamente 210 mg de anticuerpo anti-VLA-1, por ejemplo, aproximadamente 180 mg de anticuerpo anti-VLA-1 o aproximadamente 190 mg de anticuerpo anti-VLA-1.

65

En un ejemplo, la pluralidad de formas farmacéuticas unitarias, cuando se toman juntas, cuando se administra a un ser humano, suministrará una cantidad de aproximadamente 0,03 mg de anticuerpo anti-VLA-1 por kg de peso corporal a aproximadamente 10,0 mg de anticuerpo anti-VLA-1 por kg de peso corporal.

5 En un ejemplo, cada una de la pluralidad de formas farmacéuticas unitarias tiene un volumen de aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 3 ml, por ejemplo, aproximadamente 1 ml, aproximadamente 1,5 ml, aproximadamente 2 ml, o aproximadamente 2,5 ml.

En un ejemplo, cada forma de dosificación puede contener una cantidad idéntica de anticuerpo.

10 En un aspecto, la descripción presenta un kit que comprende una forma farmacéutica unitaria como se describe en la presente memoria.

15 En un aspecto, la descripción presenta un recipiente, que tiene dispuesto en él una composición farmacéutica acuosa descrita en la presente memoria. En un ejemplo, el recipiente tiene dispuesto en él una formulación de dosificación unitaria como se describe en la presente memoria.

20 En un ejemplo, el recipiente es un dispositivo de suministro, tal como una jeringa. En otro ejemplo, el recipiente es adecuado para la administración subcutánea.

En un aspecto, la descripción presenta un método de administración de una composición farmacéutica acuosa descrita en la presente memoria mediante la activación de un dispositivo de suministro y administrando a continuación el anticuerpo anti-VLA-1 dispuesto en el dispositivo de suministro al paciente.

25 En un ejemplo, la activación del dispositivo comprende uno o más de retirada del dispositivo de un envase, retirada de una cubierta de la aguja u orificio del dispositivo, o agitación del dispositivo. En otro ejemplo, la activación del dispositivo además incluye inspeccionar el dispositivo para determinar la presencia de precipitado, material coloreado, o turbiedad u opalescencia.

30 En un ejemplo, el paciente, por ejemplo, un paciente que tiene un trastorno inflamatorio, realiza una o ambas etapas de administración de la composición.

En un ejemplo, el paciente tiene artritis, tal como artritis reumatoide; inflamación intestinal; lupus; rechazo de trasplantes; o psoriasis.

35 La descripción presenta métodos que optimizan la administración de una formulación líquida de un anticuerpo anti-VLA-1, tal como SAN-300, a un paciente.

40 En un ejemplo, el método permite un aumento gradual en la concentración del anticuerpo proporcionado. Esto permite aumentar la concentración de anticuerpos y puede permitir la monitorización de la tolerancia por parte del paciente, reacciones y lo similar a medida que se aumenta la concentración. Por ejemplo, el método puede comenzar proporcionando SAN-300 al paciente en una o más concentraciones iniciales o relativamente bajas, y a continuación proporcionar SAN-300 al paciente a una concentración final más alta. Las formulaciones ilustrativas para la concentración inicial tendrán de forma típica una concentración de anticuerpo inferior a aproximadamente 80 %, inferior a aproximadamente 70 %, inferior a aproximadamente 50 %, inferior a aproximadamente 30 %, inferior a aproximadamente 20 % o inferior a aproximadamente 10 % de la concentración mayor final. Las concentraciones iniciales típicas pueden ser, por ejemplo, de aproximadamente 20 mg/ml, aproximadamente 30 mg/ml o aproximadamente 40 mg/ml. Las concentraciones finales típicas serán, por ejemplo, de aproximadamente 150 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 170 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml de, o aproximadamente 200 mg/ml. En algunos ejemplos, el paciente recibirá una, o una pluralidad de administraciones a una o una pluralidad de las concentraciones iniciales. Por ejemplo, en un ejemplo, el paciente recibirá concentraciones crecientes durante un número de administraciones. En algunos ejemplos, el paciente recibirá 2, 3, 4, 5, 6, 7 u 8 administraciones a una o más concentraciones iniciales antes de alcanzar la concentración final. Por ejemplo, el paciente recibirá una o más administraciones a una primera concentración inicial, y una o más administraciones a una segunda concentración superior. En algunos ejemplos, se evalúa el paciente tras una o más por administraciones para determinar la presencia de síntomas, incluidos síntomas adversos. En algunos ejemplos, se administra al paciente una formulación que tiene una concentración aumentada de SAN-300 solamente después de determinar que el paciente no tiene una reacción adversa inaceptable a la administración anterior.

60 En un ejemplo, la composición de anticuerpo anti-VLA-1 se proporciona empaquetada previamente en un recipiente que puede ser, por ejemplo, un dispositivo de suministro, tal como una jeringa.

65 En otro aspecto, la descripción presenta un método para instruir a un paciente que necesita un tratamiento con anticuerpos anti-VLA-1 de cómo administrar una formulación descrita en la presente memoria. El método incluye (i) proporcionar al paciente al menos una dosis unitaria de una formulación de un anticuerpo anti-VLA-1 descrito en la presente memoria; y (ii) instruir al paciente que se autoadministre la al menos una dosis unitaria subcutáneamente.

Otro método incluido en la descripción es un método de tratamiento que incluye (i) proporcionar al paciente al menos dos dosis unitarias de una formulación de anticuerpo anti-VLA-1; y (ii) instruir al paciente que se autoadministre las dosis unitarias subcutáneamente, por ejemplo, subcutáneamente, dosis a dosis.

5 En un ejemplo, el paciente tiene un trastorno inflamatorio, inmunitario o autoinmune, tal como un trastorno artrítico, tal como artritis reumatoide, artritis juvenil, artritis psoriásica, o espondilitis anquilosante; rechazo de injerto de tejido u
 10 órgano o enfermedad de injerto contra huésped; lesiones agudas del SNC, tales como accidente cerebrovascular o lesión de la médula espinal; enfermedad renal crónica; alergia, tal como asma alérgico; diabetes de tipo 1; enfermedad inflamatoria intestinal, tal como la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa; miastenia gravis; fibromialgia; un trastorno
 15 inflamatorio/inmunitario de la piel, tal como psoriasis, vitiligo, dermatitis, o liquen plano; lupus eritematoso sistémico; síndrome de Sjögren; cáncer hematológico, tal como mieloma múltiple, leucemia o linfoma; un cáncer sólido, tal como un sarcoma o un carcinoma, tal como el de pulmón, pecho, próstata o cerebro; o un trastorno fibrótico, tal como fibrosis pulmonar, mielofibrosis, cirrosis hepática, glomerulonefritis mesangial proliferativa, glomerulonefritis crescética, nefropatía diabética, o fibrosis intersticial renal.

En otro aspecto, la invención presenta la composición de anticuerpos de la invención para usar en un método de
 20 tratamiento de un paciente mediante la administración al paciente de la composición que contiene un anticuerpo anti-VLA-1 en una formulación para la administración subcutánea, por ejemplo, una composición tal como se describe en la presente memoria. En una realización, el paciente tiene un trastorno inflamatorio, tal como artritis, por ejemplo, artritis reumatoide (AR); inflamación intestinal; lupus; rechazo de trasplantes; psoriasis; fibrosis; o la enfermedad de Crohn. En
 25 otra realización, la composición se administra a modo de régimen. En otra realización, el método además incluye seleccionar un paciente adecuado para el tratamiento con la composición. Un paciente adecuado para el tratamiento, por ejemplo, ha demostrado tener un signo o síntoma indicativo de inicio de la enfermedad, tal como un signo o un síntoma indicativo de AR. En otra realización más, el método además incluye la administración al paciente de un segundo agente terapéutico, tal como un antiinflamatorio, un antihistamínico, un analgésico o un corticosteroide.

En una realización, el paciente tiene artritis reumatoide, y se selecciona considerando si el paciente ha demostrado una respuesta inadecuada a un tratamiento alternativo previo para la artritis reumatoide. Un “tratamiento alternativo
 30 previo” se refiere a cualquier tratamiento que no sea un tratamiento que comprenda un anticuerpo anti-VLA-1 como se describe en la presente memoria. El tratamiento alternativo previo para la artritis reumatoide puede ser, por ejemplo, un DMARD (fármaco antirreumático modificador de la enfermedad) o un inhibidor de TNF- α (factor de necrosis tumoral alfa). El DMARD puede ser, por ejemplo, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina o hidroxicloroquina. En una realización, el inhibidor de TNF- α es un anticuerpo, tal como infliximab, adalimumab, certolizumab pegol o golimumab; o una proteína de fusión, tal como etanercept. En otra realización, el primer agente terapéutico es un inhibidor de VLA 2, tal como un anticuerpo anti-VLA-2, por ejemplo, GBR 500.

En una realización, la composición de anticuerpo de la invención para usar en el método de tratamiento de un
 40 paciente además comprende administrar al paciente un segundo agente terapéutico, tal como un corticosteroide, un antiinflamatorio, un antihistamínico o un analgésico, tal como acetaminofén.

En otra realización, el segundo agente terapéutico es un agente de agotamiento de células B, tal como un anticuerpo anti-CD20, por ejemplo, rituximab (Rituxan, Genentech, Inc., South San Francisco, CA; e IDEC Pharmaceutical, San Diego, CA). En otra realización más, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de un miembro de la familia de las jano quinasas (JAK) o un miembro de la familia de las tirosina quinasas del bazo (SYK). Los miembros de la familia JAK incluyen JAK1, JAK2, JAK3 y TYK2 y los miembros de la familia SYK incluyen SYK y ZAP-70. En una
 45 realización, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de JAK3, tal como el inhibidor de moléculas pequeñas CP 690.550 (tofacitinib). En otra realización, el segundo agente terapéutico es un inhibidor de SYK, tal como el inhibidor de moléculas pequeñas R406, o su profármaco R788.

En una realización, el paciente tiene una inflammatory bowel disease (enfermedad inflamatoria del intestino - IBD) y se selecciona considerando si el paciente ha demostrado una respuesta inadecuada a un tratamiento alternativo previo para la IBD. El tratamiento alternativo previo para la IBD puede ser, por ejemplo, un inhibidor de una integrina, tal como MAdCAM-1 (molécula de adhesión celular de adresina mucosal vascular1, integrina $\alpha 4\beta 7$). El inhibidor de MAdCAM-1 puede ser un anticuerpo anti-MAdCAM-1, tal como vedolizumab (MLN0002, Millennium Pharmaceuticals, Cambridge, MA).
 55

En otra realización, un individuo se trata con uno o más agentes terapéuticos antes de recibir un tratamiento con anticuerpos anti-VLA-1, tal como una infusión de una terapia anti-VLA-1, tal como para prevenir o aliviar las reacciones adversas a la administración de anticuerpos anti-VLA-1, por ejemplo, para prevenir o mejorar los efectos adversos asociados con la infusión de un anticuerpo anti-VLA-1. Por ejemplo, en una realización, el pretratamiento incluye la administración de uno o más de un analgésico, tal como acetaminofén, una antihistamina o un corticosteroide, tal como metilprednisolona.
 60

En una realización, el pretratamiento se administra de 15 minutos a una hora o más, por ejemplo, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, o una hora o más, antes de la administración del anticuerpo anti-VLA-1, tal como antes de la infusión del anticuerpo anti-VLA-1.
 65

5 En una realización, se administra a un individuo, tal como a un paciente con AR, acetaminofén o un antihistamínico, o ambos, antes de la administración de un anticuerpo anti-VLA-1, tal como antes de la infusión con un anticuerpo anti-VLA-1. En una realización, se administra a un paciente con AR un corticosteroide (también llamado un glucocorticoide), tal como metilprednisolona, antes del tratamiento con un anticuerpo anti-VLA-1.

10 En una realización, el pretratamiento se administra a una dosis de aproximadamente 50 mg por 75 kg de ser humano a aproximadamente 150 mg por 75 kg de ser humano. Por ejemplo, el pretratamiento, tal como la administración de metilprednisolona, se suministra a una dosis o de aproximadamente 50 mg por 75 kg de ser humano, aproximadamente 75 mg por 75 kg de ser humano, aproximadamente 100 mg por 75 kg de ser humano, aproximadamente 125 mg por 75 kg de ser humano, o aproximadamente 150 mg por 75 kg de ser humano.

15 En otra realización, el pretratamiento se administra de 15 minutos a una hora o más, por ejemplo, 15 minutos, 30 minutos, 45 minutos, o una hora o más, antes de la administración del anticuerpo anti-VLA-1, tal como antes de la infusión del anticuerpo anti-VLA-1.

El pretratamiento se puede administrar, por ejemplo, mediante suministro intravenoso, tal como mediante infusión.

20 En otro aspecto, la descripción presenta un método de evaluación de un paciente mediante la determinación de si el paciente cumple con un criterio previamente seleccionado y, si el paciente cumple con el criterio previamente seleccionado, al aprobar, proporcionar, prescribir o administrar una formulación de anticuerpo anti-VLA-1 descrita en la presente memoria al paciente. En un ejemplo, el criterio previamente seleccionado es que el paciente no responde adecuadamente a un tratamiento o régimen terapéutico alternativo anterior, tal como para el tratamiento de AR. En otro ejemplo, el criterio es como se describe en la solicitud en copropiedad con n.º de serie 61/498.263, presentada el 17 junio de 2011.

30 En otro aspecto, la descripción presenta un método de instrucción a un receptor para que administre una formulación de SAN-300. El método incluye instruir al receptor, tal como un usuario final, que el fármaco se debe administrar al paciente subcutáneamente. En algunos ejemplos, el usuario final es un paciente, un médico, una farmacia de venta al detalle o al por mayor, un distribuidor, o departamento de farmacia en un hospital, hospital geriátrico o una HMO (Health Maintenance Organization [Organización para el mantenimiento de la salud]).

35 En un aspecto, la descripción presenta un método de preparación de una composición acuosa que comprende aproximadamente ≥ 100 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1, por ejemplo, una composición acuosa descrita en la presente memoria, combinando anticuerpo, tampón, excipiente, y un tensioactivo en proporción para obtener una composición acuosa que comprende de ≥ 100 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml del anticuerpo anti-VLA-1.

40 Como se utiliza en la presente memoria, el término “excipiente” es una sustancia farmacológicamente inactiva usada como portador para los ingredientes activos de un medicamento.

45 En un ejemplo, el tampón es histidina y, en otro ejemplo, el tampón es acetato. En otro ejemplo, el excipiente es sorbitol y, en otro ejemplo, el excipiente es cloruro de sodio. En otro ejemplo, el tensioactivo es polisorbato 80 y, en otro ejemplo, el tensioactivo es polisorbato 20. En otro ejemplo, el tensioactivo es polisorbato 80 y, en otro ejemplo, el tensioactivo es polisorbato 20.

En otro ejemplo, el anticuerpo anti-VLA-1 comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2.

50 En otro aspecto, se proporciona un método para distribuir una composición descrita en la presente memoria. La composición contiene una formulación de SAN-300 y es adecuada para la administración subcutánea. El método incluye proporcionar a un receptor, tal como un usuario final, con un envase que contiene dosificaciones unitarias suficientes del fármaco para tratar un paciente durante al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 24 meses, o al menos 36 meses. En algunos ejemplos, el usuario final es un paciente, un médico, una farmacia de venta al detalle o al por mayor, un distribuidor, un departamento de farmacia en un hospital, un hospital geriátrico o una HMO.

60 En otro aspecto, la descripción presenta un método de evaluación de la calidad de un envase o lote de envases de una composición descrita en la presente memoria que contiene un anticuerpo anti-VLA-1. El método incluye, por ejemplo, evaluar si el envase ha caducado. La fecha de caducidad es de al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, al menos 36 meses, o al menos 48 meses, por ejemplo, más de 24 meses o más de 36 meses, desde un evento previamente seleccionado, tal como la fabricación, ensayo o envasado. En algunos ejemplos, se toma una decisión o se lleva a cabo una etapa como resultado del análisis. Por ejemplo, el anticuerpo en el envase se utiliza o desecha, clasifica, selecciona, libera o retiene, transporta, desplaza a una nueva ubicación, se introduce en el comercio, se vende, o se pone a la venta, se retira del comercio o se retira del mercado, dependiendo de si el producto ha caducado.

65

- 5 En otro aspecto, la descripción muestra un envase que contiene al menos 2 dosis unitarias de una composición acuosa que contiene un anticuerpo anti-VLA-1. En un ejemplo, todas las dosis unitarias contienen la misma cantidad de anticuerpo y, en otros ejemplos, hay dosificaciones unitarias de dos o más intensidades, o dos o más formulaciones diferentes. Por ejemplo, diferentes formulaciones pueden tener diferentes intensidades o propiedades de liberación. En un ejemplo, al menos una dosificación contiene anticuerpo anti-VLA-1 en una cantidad de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 315 mg, por ejemplo, de aproximadamente 100 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 210 mg, aproximadamente 250 mg, aproximadamente 300 mg, aproximadamente 325 mg, aproximadamente 350 mg, aproximadamente 360 mg, aproximadamente 400 mg, aproximadamente 450 mg o aproximadamente 500 mg.
- 10 En otro aspecto, la descripción incluye un método de instrucción a un receptor para que administre una formulación acuosa que contiene anticuerpo anti-VLA-1. El método incluye instruir al receptor (por ejemplo, un usuario final, paciente, médico, farmacia de venta al detalle o al por mayor, distribuidor, o departamento de farmacia de un hospital, un hospital geriátrico o HMO) que el anticuerpo debe administrarse a un paciente antes de la fecha de caducidad. La fecha de caducidad es de al menos 6 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, al menos 36 meses, o al menos 48 meses, por ejemplo, más de 18 meses, más de 24 meses o más de 36 meses, desde un evento previamente seleccionado, tal como la fabricación, ensayo o envasado. En un ejemplo, el receptor también recibe un suministro del anticuerpo, tal como un suministro de dosificaciones unitarias del anticuerpo.
- 15 En otro aspecto, la descripción presenta el uso de un método o sistema para distribuir una formulación descrita en la presente memoria, monitorizar o hacer el seguimiento del suministro de una formulación descrita en la presente memoria a una farmacia, centro de infusión, o un paciente, monitorizar uno o más pacientes, seleccionar pacientes, o compilar o registrar datos sobre el uso de una formulación descrita en la presente memoria.
- 20 En otro aspecto, la descripción presenta un método de análisis de un producto o un proceso, tal como un proceso de fabricación. El método incluye proporcionar una formulación acuosa de una composición de anticuerpo anti-VLA-1, por ejemplo, uno elaborado mediante un proceso descrito en la presente memoria, y proporcionar una evaluación de la formulación evaluando un parámetro de solución, tal como el color (por ejemplo, de incoloro a ligeramente amarillo, o de incoloro a amarillo), la transparencia (por ejemplo, de transparente a ligeramente opalescente, o de transparente a opalescente), o la viscosidad (por ejemplo, de aproximadamente 5 cP a aproximadamente 30 cP (por ejemplo, de aproximadamente 10 cP a aproximadamente 20 cP) cuando se mide a temperatura ambiente, tal como de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C, por ejemplo, aproximadamente 25 °C). La evaluación puede incluir una evaluación de uno o más parámetros de solución. Opcionalmente, se determina si el parámetro de solución satisface un criterio previamente seleccionado, por ejemplo, se determina si el criterio previamente seleccionado está presente, o está presente en un rango previamente seleccionado, analizando de este modo el proceso.
- 25 En un ejemplo, la descripción incluye una medida de la estabilidad de la formulación de anticuerpo anti-VLA-1. La estabilidad de la formulación de anticuerpo puede medirse, por ejemplo, mediante la formación de agregados, que se someten a ensayo, por ejemplo, por high pressure liquid chromatography (cromatografía líquida de alta presión - HPLC) por exclusión de tamaño, por color, transparencia, o viscosidad como se describe en la presente memoria. Se puede determinar que una formulación es estable, y por lo tanto aceptable para un procesamiento o distribución posterior, si el cambio en un parámetro de ensayo es inferior a aproximadamente 10 %, inferior a aproximadamente 5 %, inferior a aproximadamente 3 %, inferior a aproximadamente 2 %, inferior a aproximadamente 1 %, inferior a aproximadamente 0,5 %, inferior a aproximadamente 0,05 %, o inferior a aproximadamente 0,005 %, o menos, durante un período de tiempo previamente establecido y, opcionalmente, a una temperatura determinada. En un ejemplo, una formulación de anticuerpo anti-VLA-1 es estable durante 1 día, 2 días, 3 días, 4 días o 5 días o más a temperatura ambiente, tal como a aproximadamente 18 °C, aproximadamente 19 °C, aproximadamente 20 °C, aproximadamente 21 °C, aproximadamente 22 °C, aproximadamente 23 °C, aproximadamente 24 °C, o aproximadamente 25 °C.
- 30 En un ejemplo, el método además incluye comparar el valor determinado con un valor de referencia, para analizar de este modo el proceso de fabricación.
- 35 En un ejemplo, el método además incluye mantener el proceso de fabricación en función, al menos en parte, del análisis. En un ejemplo, el método además incluye modificar el proceso de fabricación en función del análisis.
- 40 En otro ejemplo, el método incluye evaluar un proceso, tal como un proceso de fabricación, de una formulación acuosa de un anticuerpo anti-VLA-1 fabricado mediante un proceso seleccionado, que incluye realizar una determinación sobre el proceso basándose en un método o análisis descrito en la presente memoria. En un ejemplo, el método además incluye mantener o modificar el proceso de fabricación en función, al menos en parte, del método o análisis. Por lo tanto, en otro ejemplo, el realizar parcialmente la evaluación no supone llevar a cabo el método o análisis descrito en la presente memoria, sino que simplemente se fundamenta en los resultados que se obtienen mediante un método o análisis descrito en la presente memoria.
- 45 En otro ejemplo el método incluye comparar dos o más preparaciones en un método de monitorización o control de la variación entre lotes o para comparar una preparación con un estándar de referencia.
- 50
- 55
- 60
- 65

En otro ejemplo más, el método puede además incluir tomar una decisión, tal como una decisión para clasificar, seleccionar, aceptar o desechar, liberar o retirar, procesar como un producto farmacológico, enviar, mover a una ubicación diferente, formular, etiquetar, envasar, introducir en el mercado, vender o poner a la venta la preparación, en función al menos en parte, de la determinación.

En otro aspecto, la descripción presenta un método de almacenamiento, distribución o uso de una formulación de anticuerpo anti-VLA-1, tal como una formulación de SAN-300, descrita en la presente memoria.

El método incluye:

almacenar la formulación a una temperatura adecuada, tal como a una temperatura de 2 °C a 8 °C; proporcionar la formulación a un receptor, por ejemplo, un usuario final, tal como por ejemplo, un paciente o profesional de la salud;

instruir al receptor que almacene la formulación a una temperatura adecuada, tal como a una temperatura de 2 °C a 8 °C; y

después de la recepción por parte del receptor, almacenar la formulación durante un período de hasta 24 meses, 36 meses, o 48 meses a la temperatura adecuada, tal como a una temperatura de 2 °C a 8 °C.

En otro aspecto, la descripción presenta un método de cumplimiento con un requerimiento normativo, tal como un requerimiento post-autorización de una entidad normativa, tal como la FDA. El método incluye proporcionar una evaluación de una formulación de anticuerpos para un parámetro de solución, tal como el color (por ejemplo, de incoloro a ligeramente amarillo, o de incoloro a amarillo), la transparencia (por ejemplo, de transparente a ligeramente opalescente o de transparente a opalescente), o la viscosidad (por ejemplo, de aproximadamente 5 cP a aproximadamente 30 cP cuando se mide a temperatura ambiente, tal como a una temperatura de 20 °C a 30 °C). El requisito post-autorización puede incluir una medida de uno o más de los parámetros anteriores. El método también incluye, opcionalmente, determinar si el parámetro de solución observado satisface un criterio previamente seleccionado o si el parámetro está en un rango previamente seleccionado; opcionalmente, protocolizar el valor o el resultado del análisis, o comunicarse con la entidad, tal como mediante la transmisión del valor o resultado a la entidad normativa.

En otro aspecto, la descripción presenta un método de preparación de un lote de una formulación acuosa de anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una propiedad previamente seleccionada, por ejemplo, satisfacer una especificación de liberación, requerimiento de etiquetado, o requerimiento de compendio, por ejemplo, una propiedad descrita en la presente memoria. El método incluye proporcionar una preparación de anticuerpo de prueba; analizar la preparación del anticuerpo de prueba según un método descrito en la presente memoria; determinar si la preparación del anticuerpo de prueba satisface un criterio previamente seleccionado, tal como tener una relación previamente seleccionada con un valor de referencia, tal como uno o más valores de referencia descritos en la presente memoria, y seleccionar la preparación del anticuerpo de prueba para preparar un lote de producto.

En otro aspecto, la descripción presenta múltiples lotes de una formulación acuosa de anticuerpo anti-VLA-1, donde uno o más parámetros de solución (por ejemplo, un valor o parámetro de solución determinado por un método descrito en la presente memoria) para cada lote varía menos que un rango previamente seleccionado con respecto a un valor o criterio de referencia deseado previamente seleccionado, por ejemplo, un rango o criterio descrito en la presente memoria. En algunos ejemplos, se determina uno o más parámetros para uno o más lotes de una formulación de anticuerpo y un lote o lotes seleccionados como resultado de la determinación. Algunos ejemplos incluyen comparar los resultados de la determinación con un valor o criterio previamente seleccionado, tal como un estándar de referencia. Otros ejemplos incluyen el ajuste de la dosis del lote que se va a administrar, tal como en función del resultado de la determinación del valor o parámetro.

En otro aspecto, la descripción presenta un método de uno o más de: proporcionar un informe a una entidad receptora de informes, evaluar una muestra de una formulación acuosa de anticuerpo anti-VLA-1 en términos del cumplimiento con un estándar de referencia, tal como un requerimiento de la FDA, buscar indicación por una tercera parte de que una preparación del anticuerpo anti-VLA-1 cumple algún requerimiento predefinido, o enviar información acerca de una preparación de un anticuerpo anti-VLA-1 a una tercera parte. Las entidades receptoras ilustrativas o terceras partes incluyen un gobierno, tal como el gobierno federal de los EE. UU., de un organismo gubernamental, tal como la FDA. El método incluye una o más (o todas) de las siguientes etapas para preparar y/o probar una formulación acuosa de anticuerpo anti-VLA-1 en un primer país, tal como los EE. UU.; enviar al menos una alícuota de la muestra fuera del primer país, por ejemplo, enviarla fuera de los Estados Unidos, a un segundo país; preparar, o recibir, un informe que incluye datos acerca de la estructura de la preparación del anticuerpo anti-VLA-1, por ejemplo, datos relacionados con una estructura y/o cadena descrita en la presente memoria, tales como datos generados por uno o más de los métodos descritos en la presente memoria; y proporcionar dicho informe a una entidad receptora de informes.

En un ejemplo, la entidad receptora de informes puede determinar si los datos cumplen un requisito o valor de referencia predeterminado y, opcionalmente, se recibe una respuesta por parte de la entidad receptora de informes, tal como por parte de un fabricante, distribuidor o vendedor de una formulación acuosa de un anticuerpo anti-VLA-1. En un ejemplo, al recibir la autorización por parte de la entidad receptora de informes, la preparación de anticuerpo anti-VLA-1 se selecciona, envasa, o introduce en el mercado.

5 En un aspecto, la descripción presenta un método para evaluar la calidad de una composición descrita en la presente memoria, donde el método incluye evaluar la composición en términos de un parámetro previamente seleccionado y determinar si el valor satisface un criterio previamente seleccionado. En respuesta a la evaluación, la composición se puede clasificar, seleccionar, aceptar o desechar, liberar o mantener, procesar a modo de producto farmacológico, transportar, desplazar a una ubicación diferente, formular, etiquetar, envasar, introducir en el mercado o vender o poner a la venta. En otro ejemplo, la composición evaluada se proporciona como una forma farmacéutica unitaria.

10 En un ejemplo, el parámetro previamente seleccionado se selecciona de agregación, estabilidad, color, transparencia, viscosidad o fuerza del émbolo.

15 En un ejemplo, el método incluye proporcionar una comparación del valor determinado para un parámetro con un valor, o valores, de referencia, para de este modo evaluar la muestra. La comparación puede incluir, por ejemplo, determinar si el valor de prueba tiene una relación previamente seleccionada con el valor de referencia, por ejemplo, determinar si cumple el valor de referencia. El valor no tiene por qué ser un valor numérico, sino que puede ser simplemente una indicación de si la entidad objeto está presente.

20 En un ejemplo, el método incluye determinar si un valor de prueba es igual o superior a un valor de referencia, si es menor o igual a un valor de referencia, o si pertenece a un rango (tanto si incluye o no uno o ambos extremos).

En algunos ejemplos, el valor de prueba, o una indicación de si se cumple la relación previamente seleccionada, puede ser protocolizada, tal como en un registro que pueda leerse con un ordenador.

25 En algunos ejemplos, se toma una decisión o se lleva a cabo una etapa, por ejemplo, la muestra se clasifica, selecciona, acepta o descarta, libera o mantiene, procesa a modo de producto farmacéutico, transporta, desplaza a una ubicación diferente, formula, etiqueta, envasa, introduce en el mercado, se vende o pone a la venta, dependiendo de si se cumple la relación previamente seleccionada. Por ejemplo, en función del resultado de la determinación, o de la comparación con un estándar de referencia, el lote del cual se toma la muestra se puede procesar, tal como se acaba de describir.

30 En un aspecto, la descripción presenta un método de evaluación de una formulación acuosa de anticuerpo anti-VLA-1. El método incluye recibir datos con respecto a la presencia o nivel de anticuerpo anti-VLA-1; proporcionar un registro que incluye dichos datos y opcionalmente incluye un identificador de un lote de anticuerpo-anti-VLA-1; enviar dicho registro a una entidad decisora, por ejemplo, un organismo gubernamental, tal como la FDA; opcionalmente, recibir una comunicación de la entidad decisora; opcionalmente, decidir si se abandona o comercializar el lote de anticuerpo anti-VLA-1 en función de la comunicación recibida del organismo de decisión. En un ejemplo, el método además incluye liberar la muestra.

Las formulaciones ilustrativas incluyen las siguientes:

40 1. SAN-300 a una concentración de ≥ 100 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, o de aproximadamente 180 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 180 mg/ml; tampón de histidina a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, por ejemplo, de aproximadamente 30 mM;

45 sorbitol a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 290 mM, o de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 280 mM, por ejemplo, de aproximadamente 250 mM;

50 polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,1 %, de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,08 %, o de aproximadamente 0,008 % a aproximadamente 0,04 %, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 %; y pH de aproximadamente 6,0;

55 2. SAN-300 a una concentración de ≥ 100 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, o de aproximadamente 180 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 190 mg/ml;

tampón de acetato a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, por ejemplo, de aproximadamente 30 mM;

60 sorbitol a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 280 mM, o de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 250 mM, por ejemplo, de aproximadamente 220 mM o de aproximadamente 250 mM;

65 polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,1 %, de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,08 %, o de aproximadamente 0,008 % a aproximadamente 0,04 %, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 %; y pH de aproximadamente 5,5;

3. aproximadamente 180 mg/ml de SAN-300;

ES 2 732 243 T3

- tampón de histidina a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, por ejemplo, de aproximadamente 30 mM;
sorbitol 250 mM;
- 5 0,01 % de polisorbato 20, y
pH 6,0;
4. 190 mg/ml de SAN-300;
tampón de acetato a una concentración de 1 mM a 100 mM, de 5 mM a 50 mM, o de 5 mM a 40 mM, por ejemplo, 30 mM;
- 10 aproximadamente sorbitol 220 mM;
aproximadamente 0,01 % de polisorbato 80, y pH 5,5;
5. aproximadamente 180 mg/ml de SAN-300;
aproximadamente tampón de histidina 30 mM;
- 15 sorbitol a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM; de aproximadamente 100 mM a
aproximadamente 290 mM, o de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 280 mM, por ejemplo,
aproximadamente 250 mM;
aproximadamente 0,01 % de polisorbato 20; y pH 6,0;
- 20 6. aproximadamente 190 mg/ml de SAN-300;
aproximadamente tampón de acetato 30 mM;
sorbitol a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente
100 mM a aproximadamente 280 mM, o de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 250 mM, por ejemplo,
de aproximadamente 220 mM;
- 25 aproximadamente 0,01 % de polisorbato 80; y
pH 5,5;
7. aproximadamente 180 mg/ml de SAN-300;
aproximadamente tampón de histidina 30 mM;
- 30 aproximadamente sorbitol 250 mM;
polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,1 %, de aproximadamente
0,005 % a aproximadamente 0,08 %, o de aproximadamente 0,008 % a aproximadamente 0,04 %, por ejemplo, de
aproximadamente 0,01 %; y
pH 6,0;
- 35 8. aproximadamente 190 mg/ml de SAN-300; aproximadamente tampón de acetato 30 mM;
aproximadamente sorbitol 220 mM;
polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,1 %, de aproximadamente
0,005 % a aproximadamente 0,08 %, o de aproximadamente 0,008 % a aproximadamente 0,04 %, por ejemplo,
aproximadamente 0,01 %, y
pH 5,5;
- 40 9. SAN-300 a una concentración de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, o de
aproximadamente 180 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 180 mg/ml;
- 45 Aproximadamente tampón de histidina 30 mM;
aproximadamente sorbitol 250 mM;
aproximadamente 0,01 % de polisorbato 20;
pH 6,0;
- 50 10. SAN-300 a una concentración de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, o de aproximadamente
180 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 190 mg/ml;
aproximadamente tampón de acetato 30 mM;
aproximadamente sorbitol 220 mM;
- 55 aproximadamente 0,01 % de polisorbato 80; y
pH 5,5;
11. aproximadamente 180 mg/ml de SAN-300;
aproximadamente tampón de histidina 30 mM;
aproximadamente sorbitol 250 mM;
- 60 aproximadamente 0,01 % de polisorbato 20; y
pH 6,0;
12. aproximadamente 190 mg/ml de SAN-300;
aproximadamente tampón de acetato 30 mM;
aproximadamente sorbitol 220 mM;
- 65 aproximadamente 0,01 % de polisorbato 80 y

pH 5,5.

13. SAN-300 a una concentración de ≥ 100 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, o de aproximadamente 180 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 180 mg/ml;
 5 tampón de histidina a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, por ejemplo, de aproximadamente 30 mM;
 NaCl a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 140 mM a aproximadamente 160 mM, por ejemplo, de
 10 aproximadamente 150 mM;
 polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,1 %, de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,08 %, o de aproximadamente 0,008 % a aproximadamente 0,04 %, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 %; y
 pH 6,0;
- 15 14. SAN-300 a una concentración de ≥ 100 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, o de aproximadamente 180 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 190 mg/ml;
 tampón de acetato a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, por
 20 ejemplo, de aproximadamente 30 mM;
 NaCl a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 140 mM a aproximadamente 160 mM, por ejemplo, de aproximadamente 150 mM;
 polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,1 %, de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,08 %, o de aproximadamente 0,008 % a aproximadamente 0,04 %, por ejemplo, de
 25 aproximadamente 0,01 %; y
 pH 5,5;
- 30 15. aproximadamente 180 mg/ml de SAN-300;
 tampón de histidina a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, por
 ejemplo, de aproximadamente 30 mM;
 aproximadamente NaCl 150 mM;
 aproximadamente 0,01 % de polisorbato 20 y
 35 pH 6,0;
- 40 16. aproximadamente 190 mg/ml de SAN-300;
 tampón de acetato a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 100 mM, de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM, o de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 40 mM, por
 ejemplo, de aproximadamente 30 mM;
 aproximadamente NaCl 150 mM;
 aproximadamente 0,01 % de polisorbato 80 y
 pH 5,5;
- 45 17. aproximadamente 180 mg/ml de SAN-300;
 aproximadamente tampón de histidina 30 mM;
 NaCl a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 140 mM a aproximadamente 160 mM, por ejemplo, de
 50 aproximadamente 150 mM; aproximadamente 0,01 % de polisorbato 20; y
 pH 6,0;
- 55 18. aproximadamente 190 mg/ml de SAN-300;
 aproximadamente tampón de acetato 30 mM;
 NaCl a una concentración de aproximadamente 50 mM a aproximadamente 300 mM, de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM, o de aproximadamente 140 mM a aproximadamente 160 mM, por ejemplo, de
 aproximadamente 150 mM;
 aproximadamente 0,01 % de polisorbato 80; y
 pH 5,5;
- 60 19. aproximadamente 180 mg/ml de SAN-300;
 aproximadamente tampón de histidina 30 mM;
 aproximadamente NaCl 150 mM;
 polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,1 %, de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,08 %, o de aproximadamente 0,008 % a aproximadamente 0,04 %, por ejemplo, de
 65 aproximadamente 0,01 %, y pH 6,0;

20. aproximadamente 190 mg/ml de SAN-300;
aproximadamente tampón de acetato 30 mM;
aproximadamente NaCl 150 mM;
5 polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,1 %, de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,08 %, o de aproximadamente 0,008 % a aproximadamente 0,04 %, por ejemplo, de aproximadamente 0,01 %; y
pH 5,5;
- 10 21. SAN-300 a una concentración de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, o de aproximadamente 180 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 180 mg/ml;
Aproximadamente de tampón de histidina 30 mM;
aproximadamente NaCl 150 mM;
aproximadamente 0,01 % de polisorbato 20;
15 pH 6,0;
22. SAN-300 a una concentración de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, o de aproximadamente 180 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 190 mg/ml;
aproximadamente tampón de acetato 30 mM;
aproximadamente NaCl 150 mM;
20 aproximadamente 0,01 % de polisorbato 80; y
pH 5,5;
23. aproximadamente 180 mg/ml de SAN-300;
aproximadamente tampón de histidina 30 mM;
25 aproximadamente NaCl 150 mM;
aproximadamente 0,01 % de polisorbato 20; y
pH 6,0;
24. aproximadamente 190 mg/ml de SAN-300;
30 aproximadamente tampón de acetato 30 mM;
aproximadamente NaCl 150 mM;
aproximadamente 0,01 % de polisorbato 80 y
pH 5,5.
- 35 En algunos ejemplos, cualquiera de las formulaciones anteriores 1 a 24 puede estar prácticamente exenta de un aminoácido, tal como arginina.

Los métodos y composiciones que se describen en la presente memoria pueden usarse cuando la presencia, distribución, o cantidad, de una o más estructuras de la mezcla pueden determinar o afectar la actividad biológica. Los métodos son también útiles desde el punto de vista de la actividad de la estructura, para evaluar o garantizar la equivalencia biológica.

Una "formulación de anticuerpos anti-VLA-1" como se utiliza en la presente memoria, se refiere a una formulación acuosa que contiene un anticuerpo anti-VLA-1, tal como SAN-300, a una concentración de ≥ 100 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml, por ejemplo, aproximadamente 110 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 130 mg/ml, 45 aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 170 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 205 mg/ml, aproximadamente 210 mg/ml, aproximadamente 215 mg/ml, aproximadamente 220 mg/ml.

"Adecuada para la administración subcutánea" significa que una composición, proporcionada, por ejemplo, como dosificación unitaria, proporciona anticuerpos a una concentración suficiente para permitir un efecto terapéutico en una cantidad, de forma típica, de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 3 ml, que puede suministrarse mediante inyección subcutánea. Puede estar exenta de componentes, tales como citrato, que causan síntomas del sitio de inyección no deseables, tales como quemazón o escozor.

El término "tratamiento" se refiere a administrar una terapia en una cantidad, forma, y/o a un modo eficaz para mejorar una condición, síntoma, o parámetro asociado con un trastorno o para evitar el avance de un trastorno, a un nivel estadísticamente significativo o a un nivel detectable por el experto en la técnica. Una cantidad, manera o modo eficaz puede variar dependiendo del individuo y puede adaptarse al individuo de forma específica.

Una formulación "estable" de anticuerpo anti-VLA-1 presenta pocos o ningún signo de una cualquiera o más de agregación, precipitación, fragmentación, desamidación, oxidación, desnaturalización, modificación del tamaño, alteración química o cambio en la actividad biológica, tal como la capacidad de unirse a VLA-1, durante un período predeterminado de tiempo. El período de tiempo predeterminado puede ser, por ejemplo, igual o superior a 4 días, 10 días, 14 días, 21 días, 30 días o más, tal como durante 6 meses, 12 meses, 24 meses, 36 meses, 1 año, 2 años, 3 años, 65 por ejemplo, cuando se almacenan en condiciones adecuadas. Las condiciones adecuadas ilustrativas incluyen, por ejemplo, una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, por ejemplo, aproximadamente 4 °C, en

la oscuridad, en un recipiente cerrado. En un ejemplo, el recipiente es el mismo tipo que el que la composición proporcionará al usuario final. En otro ejemplo, una formulación estable cumplirá con los requisitos de liberación o de etiqueta de envase o de inserción del fabricante o de una entidad normativa (tal como la Food and Drug Administration [FDA], o una homóloga extranjera de la FDA), tales como para los tiempos y condiciones mencionados anteriormente.

5 Por ejemplo, en una realización, menos de aproximadamente 1 %, menos de aproximadamente 2 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 10 %, o menos de aproximadamente 15 % de la composición se agrega, fragmenta u oxida al final del período predeterminado o de cualquier otra forma en el momento de la evaluación de la estabilidad. La agregación, precipitación, y/o desnaturalización se puede evaluar mediante métodos conocidos, tales como el examen visual del color y/o la transparencia, o mediante dispersión de luz UV, cromatografía de exclusión por tamaño, dynamic light scattering (dispersión de luz dinámica - DLS), o differential scanning calorimetry (calorimetría diferencial de barrido - DSC). La capacidad de la proteína para conservar su actividad biológica puede evaluarse detectando y cuantificando las formas químicamente alteradas del anticuerpo. La modificación del tamaño, tal como el desgaste, puede evaluarse con el uso de cromatografía de exclusión por tamaño, SDS-PAGE y/o matrix-assisted laser desorption ionization/ time-of-flight mass spectrometry (espectrometría de masas de desorción-ionización láser asistida por matriz con analizador de tiempo de vuelo - MALDI/TOF MS), o mapeo de péptidos de anticuerpos tratados con endoproteinasa, por ejemplo. Otros tipos de alteración química que incluyen la alteración de carga, tal como la que puede ocurrir como resultado de la desamidación, pueden evaluarse por cromatografía de intercambio de iones, por ejemplo. Un anticuerpo “conserva su actividad biológica” en una formulación farmacéutica, si la actividad biológica del anticuerpo en un momento dado está dentro de aproximadamente 1 %, aproximadamente 2 %, de aproximadamente 5 %, aproximadamente 10 %, o de aproximadamente 15 % de la actividad biológica presentada en el momento en que se ha preparado la formulación farmacéutica como se determina, por ejemplo, en un ensayo de unión a antígeno.

“Agregación”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a la formación de estructuras insolubles a partir de polipéptidos completa o parcialmente desplegados, tales como anticuerpos anti-VLA-1. Como se utiliza en la presente memoria, “fragmentación” se refiere a proteínas parcialmente degradadas, tales como anticuerpos anti-VLA-1. “Desamidación” se refiere a la eliminación de un grupo amida de un polipéptido, tal como un anticuerpo anti-VLA-1. La desamidación se produce, de forma típica, en los residuos de aminoácidos glutamínico o asparagínico, y puede causar cambios estructurales en la proteína que afectan la función de la proteína, tal como afinidad de unión para un ligando VLA-1.

Como se utiliza en la presente memoria, “capacidad de aplicación con jeringa” se refiere a la idoneidad de una composición para suministrarla con una jeringa. Uno de los componentes de la capacidad de aplicación con jeringa es la capacidad de una composición, tal como una composición de anticuerpo anti-VLA-1, para ser expulsada desde una jeringa, tal como por un paciente para la autoadministración, o por un profesional de la salud. La autoadministración por parte del paciente puede ser, por ejemplo, mediante la administración subcutánea. La presión o “fuerza del émbolo” puede ser, por ejemplo, tal que un paciente, por ejemplo, un paciente anciano o un paciente débil, puedan autoadministrar la composición. En algunos ejemplos, la fuerza del émbolo es igual o inferior a 4 libras.

En un ejemplo, la fuerza del émbolo permitirá el suministro de una dosificación unitaria en 10 segundos o menos. En otro ejemplo, aproximadamente 1 ml de una composición farmacéutica acuosa, dispuesta en una jeringa que tiene una aguja de un calibre previamente seleccionado, se puede expulsar a una velocidad previamente seleccionada con una fuerza del émbolo no superior a una cantidad previamente seleccionada. En otro ejemplo, aproximadamente 2 ml de una composición farmacéutica acuosa, dispuesta en una jeringa que tiene una aguja de un calibre previamente seleccionado, se puede expulsar a una velocidad previamente seleccionada con una fuerza del émbolo no superior a una cantidad previamente seleccionada. Por ejemplo, se puede expulsar aproximadamente 1 ml de la composición farmacéutica acuosa, dispuesta en una jeringa que tiene una aguja de calibre 25, una aguja de calibre 27, o una aguja de calibre 30 a 10 ml/minuto con una fuerza del émbolo no superior a 4 libras.

En un ejemplo, una fuerza del émbolo adecuada, tal como una fuerza igual o inferior a 4 libras, permitirá el suministro de una dosificación unitaria dentro de un período de tiempo previamente seleccionado, tal como en 10 segundos o menos.

La capacidad de aplicación con jeringa también se refiere a la capacidad de la proteína para sobrevivir el paso a través de una aguja sin experimentar una fragmentación superior a aproximadamente 1 %, superior a aproximadamente 2 %, superior a aproximadamente 5 %, superior a aproximadamente 10 % o superior a aproximadamente 15 %.

Un “anticuerpo anti-VLA-1” se refiere a un anticuerpo que se une a una integrina VLA-1, tal como la subunidad $\alpha 1$ de la integrina VLA-1, e inhibe al menos parcialmente una actividad de VLA-1, particularmente una actividad de unión de una integrina VLA-1 o una actividad de señalización, tal como la capacidad de transducir una señal mediada por VLA-1. Por ejemplo, un anticuerpo anti-VLA-1 puede inhibir la unión de VLA-1 a un ligando cognado de VLA-1, por ejemplo, un componente de la matriz extracelular, tal como colágeno, por ejemplo, colágeno I o colágeno IV, o laminina. Un anticuerpo anti-VLA-1 se puede unir a la subunidad $\alpha 1$ o a la subunidad $\beta 1$, o a ambas. En una realización, el anticuerpo se une a un epítipo en el dominio I de $\alpha 1$. Un anticuerpo anti-VLA-1 se puede unir a VLA-1 con un valor K_d inferior a aproximadamente 10^6 , inferior a aproximadamente 10^7 , inferior a aproximadamente 10^8 , inferior a aproximadamente 10^9 , inferior a aproximadamente 10^{10} , o inferior a aproximadamente 10^{11} M. VLA-1 se conoce también como $\alpha 1/\beta 1$ y CD49a/CD29.

Como se utiliza en la presente memoria, el término “anticuerpo” se refiere a una proteína que incluye al menos una región variable de inmunoglobulina, tal como una secuencia de aminoácidos que proporciona un dominio variable de inmunoglobulina o una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, un anticuerpo puede incluir una región variable de cadena pesada (H) (abreviada en la presente memoria como VH), y una región variable de cadena ligera (L) (abreviada en la presente memoria como VL). En otro ejemplo, un anticuerpo incluye dos regiones variables de cadena pesada (H) y dos regiones variables de cadena ligera (L). El término “anticuerpo” abarca fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos (tales como anticuerpos monocatenarios, fragmentos Fab, fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fd, fragmentos Fv y fragmentos dAb) así como anticuerpos completos, por ejemplo, inmunoglobulinas intactas de los tipos IgA, IgG, Ig E, IgD, IgM (así como subtipos de las mismas). Las cadenas ligeras de la inmunoglobulina pueden ser de los tipos kappa o lambda. En una realización, el anticuerpo es glicosilado. Un anticuerpo puede ser funcional para citotoxicidad dependiente de anticuerpos y/o citotoxicidad mediada por complementos, o puede ser no funcional para una o ambas de dichas actividades.

Una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina es una secuencia de aminoácidos que puede formar la estructura de un dominio variable de inmunoglobulina. Por ejemplo, la secuencia puede incluir la totalidad o parte de la secuencia de aminoácidos de un dominio variable natural. Por ejemplo, la secuencia puede omitir uno, dos o más aminoácidos N-terminales o C-terminales, aminoácidos internos, puede incluir una o más inserciones o aminoácidos terminales adicionales, o puede incluir otras alteraciones. En un ejemplo, un polipéptido que incluye una secuencia de dominio variable de inmunoglobulina puede asociarse con otra secuencia de dominio variable de inmunoglobulina para formar una estructura de unión objetivo (o “sitio de unión al antígeno”), por ejemplo, una estructura que interactúa con VLA-1.

Las regiones VH y VL se pueden además subdividir en regiones de hipervariabilidad, denominadas "complementarity determining regions" (regiones determinantes de la complementariedad - CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas “*framework region*” (región marco - FR). La extensión de las FR y CDR se ha definido con precisión (véase, Kabat, E.A., y col. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, quinta edición, U.S. Department of Health and Human Services, NIH, n.º de publicación 91-3242; y Chothia, de C. y col. (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917). En la presente memoria se usan las definiciones de Kabat. Cada VH y VL está compuesta de forma típica de tres CDR y cuatro FR, dispuestos de extremo amino a extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

La cadena VH o VL del anticuerpo puede además incluir, toda o parte de una región constante de cadena pesada o ligera, para formar de este modo una cadena pesada o ligera de inmunoglobulina, respectivamente. En una realización, el anticuerpo es un tetrámero de dos cadenas de inmunoglobulina pesadas y dos cadenas de inmunoglobulina ligeras. Las cadenas de inmunoglobulina pesada y ligera pueden estar conectadas mediante enlaces disulfuro. La región constante de cadena pesada de forma típica incluye tres dominios constantes, CH1, CH2 y CH3. La región constante de cadena ligera, de forma típica, incluye un dominio CL. La región variable de las cadenas pesada y ligera contiene un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos median, de forma típica, la unión del anticuerpo a tejidos o factores del huésped, incluidas diversas células del sistema inmunológico (tales como células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema de complemento clásico.

Una o más regiones de un anticuerpo pueden ser humanas, eficazmente humanas o humanizadas. Por ejemplo, una o más de las regiones variables pueden ser humanas o eficazmente humanas. Por ejemplo, una o más de las CDR, tal como HC CDR1, HC CDR2, HC CDR3, LC CDR1, LC CDR2, y LC CDR3, pueden ser humanas (HC, cadena pesada; LC, cadena ligera). En una realización, cada una de las CDR de cadena ligera puede ser humana. En una realización, HC CDR3 es humana. Uno o más de las regiones marco pueden ser humanas, tales como FR1, FR2, FR3, y/o FR4 de la HC o LC. En una realización, todas las regiones marco son humanas, por ejemplo, derivadas de una célula somática humana, tal como una célula hematopoyética que produce inmunoglobulinas o una célula no hematopoyética. En una realización, las secuencias humanas son secuencias de línea germinal, por ejemplo, codificadas por un ácido nucleico de línea germinal. Una o más de las regiones constantes pueden ser humanas, eficazmente humanas o humanizadas. En otra realización, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 95 % o al menos aproximadamente 98 % de las regiones marco, tales como FR1, FR2, y FR3, en conjunto, o FR1, FR2, FR3, y FR4, en conjunto, o todo el anticuerpo puede ser humano, eficazmente humano o humanizado. Por ejemplo, FR1, FR2, y FR3, en conjunto, pueden ser idénticas en al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 75 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 85 %, al menos aproximadamente 90 %, al menos aproximadamente 92 %, al menos aproximadamente 95 %, al menos aproximadamente 98 %, o al menos aproximadamente 99 %, a una secuencia humana codificada por un segmento de línea germinal humana.

Una región variable de inmunoglobulina humana efectiva es una región variable de inmunoglobulina que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos de marco humanos de manera que la región variable de inmunoglobulina no provoca ninguna respuesta inmunogénica en un ser humano normal. Un anticuerpo “efectivamente/eficazmente humano” es un anticuerpo que incluye un número suficiente de posiciones de aminoácidos humanos de manera que el anticuerpo no provoca ninguna respuesta inmunogénica en un ser humano normal.

Una región variable de inmunoglobulina humanizada es una región variable de inmunoglobulina que está modificada de modo que la forma modificada provoca una menor respuesta inmunitaria en un ser humano que la forma no modificada. Por

ejemplo, una región variable de inmunoglobulina humanizada se puede modificar de modo que incluye un número suficiente de deposiciones de aminoácido de marco humano de manera que la región variable de inmunoglobulina no provoca ninguna respuesta inmunogénica en un ser humano normal. Las descripciones de inmunoglobulinas humanizadas incluyen, por ejemplo, la patente US-6.407.213 y la patente US-5.693.762. En algunas realizaciones, una inmunoglobulina humanizada incluye un aminoácido no humano en una o más posiciones de aminoácido de marco.

La totalidad o parte de un anticuerpo puede ser codificada por un gen de inmunoglobulina o un segmento del mismo. Los genes de inmunoglobulina humana ilustrativos incluyen los genes de las regiones constantes kappa, lambda, α (IgA1 y IgA2), gamma (IgG 1, IgG2, IgG3, IgG4), delta, épsilon y mu, así como los múltiples genes de región variable de inmunoglobulina. Las “cadenas ligeras” de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 25 Kd o 214 aminoácidos) son codificadas por un gen de región variable en el extremo NH₂-terminal (aproximadamente 110 aminoácidos) y un gen de región constante kappa o lambda en el extremo COOH-terminal. Las “cadenas pesadas” de inmunoglobulina de longitud completa (aproximadamente 50 Kd o 446 aminoácidos) son codificadas de forma similar por un gen de región variable (aproximadamente 116 aminoácidos) y uno de los demás genes de región constante anteriormente mencionados, tales como gamma (que codifica aproximadamente 330 aminoácidos).

La expresión “fragmento de unión a antígenos” de un anticuerpo de longitud completa se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo de longitud completa que conservan la capacidad de unirse específicamente a un objetivo de interés, tal como VLA-1. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión fragmento de unión a antígeno de un anticuerpo de longitud completa incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) un fragmento F(ab')₂, un fragmento bivalente que incluye dos fragmentos Fab unidos por un puente de disulfuro en la región de bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un brazo simple de un anticuerpo, (v) un fragmento dAb (Ward y col., (1989) *Nature* 341:544-546), que consiste en un dominio VH; y (vi) una región determinante de la complementariedad aislada (CDR) que conserva la funcionalidad. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, son codificados por genes distintos, pueden unirse, utilizando métodos recombinantes, mediante un conector sintético que permite obtenerlos como una cadena de proteína simple en la que las regiones VL y VH se unen para formar moléculas monovalentes conocidas como cadena única Fv (scFv). Véase, por ejemplo, Bird y col. (1988) *Science* 242:423-426; y Huston y col. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883.

Los cálculos de homología o identidad de secuencia entre dos secuencias (los términos se utilizan indistintamente en la presente memoria) se realizan del modo siguiente. Las secuencias se alinean con fines de comparación óptima (por ejemplo, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para el alineamiento óptimo y las secuencias no homólogas pueden descartarse para fines de comparación). El alineamiento óptimo se determina como la mejor puntuación utilizando el programa GAP del paquete informático GCG con una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por huecos de 12, una penalización de ampliación por huecos de 4, y una penalización por huecos de cambio de marco de 5. A continuación, se comparan los residuos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones correspondientes de aminoácidos o posiciones de nucleótidos. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se utiliza en la presente memoria, la “identidad” del aminoácido o del ácido nucleico es equivalente a la “homología” del aminoácido o del ácido nucleico). El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias.

Se puede encontrar una guía para realizar reacciones de hibridación en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6. En esta referencia pueden utilizarse métodos acuosos y no acuosos y puede utilizarse cualquiera de los dos. Las condiciones de hibridación muy rigurosas incluyen hibridación en 6X SSC a aproximadamente 45 °C, seguida de uno o más lavados en 0,2X SSC, SDS al 0,1 % a 65 °C, o condiciones sustancialmente similares.

Las realizaciones de la invención proporcionan determinadas ventajas. En algunos casos, es difícil elaborar formulaciones de alta concentración de proteínas, tales como anticuerpos, para usar en composiciones farmacéuticas. En la presente memoria se presentan métodos de preparación de dichas formulaciones. Las composiciones farmacéuticas que contienen concentraciones altas de proteína, tales como anticuerpo anti-VLA-1, pueden ser útiles para la administración en un intervalo de tiempo más corto. Una formulación de, por ejemplo, un anticuerpo anti-VLA-1, también puede administrarse mediante métodos simplificados (por ejemplo, subcutáneamente).

En un aspecto, la descripción proporciona una composición farmacéutica acuosa que comprende

(a) de 150 a 210 mg/ml, de 155 a 205 mg/ml, de 160 a 200 mg/ml, o de 165 a 190 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 1 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 1 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos; y una secuencia de cadena pesada descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 2 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 2 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos;

- (b) acetato de 25 a 35 mM o histidina de 25 a 35 mM;
- (c) sorbitol de 170 a 288 mM; y
- 5 (d) de 0,008 a 0,012 % de polisorbato, por ejemplo, polisorbato 20 o polisorbato 80;
- donde la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5 a 7.
- 10 En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa comprende
- (a) de 150 a 210 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 y una secuencia de cadena pesada de la id. de sec. n.º 2;
- 15 (b) acetato de 25 a 35 mM o histidina de 25 a 35 mM;
- (c) sorbitol de 170 a 288 mM; y
- 20 (d) de 0,008 a 0,012 % de polisorbato, donde el polisorbato es polisorbato 20 o polisorbato 80;
- donde la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5 a 7. En algunos ejemplos, la composición comprende histidina y el polisorbato es polisorbato 20. En algunos ejemplos, la composición comprende acetato y el polisorbato es polisorbato 80.
- 25 En algunos ejemplos, la composición farmacéutica acuosa tiene una osmolalidad de 270 mOsm/kg a 380 mOsm/kg.
- En algunos ejemplos, la composición farmacéutica acuosa tiene una viscosidad inferior a 15 cP o inferior a 14 cP. En algunos ejemplos, la composición farmacéutica acuosa descrita en la presente memoria tiene una viscosidad de 10 a 14 cP, de 11 a 14 cP, de 13 a 14 cP o de 11 a 12 cP.
- 30 En una realización, la composición farmacéutica acuosa comprende
- (a) de 165 a 190 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 1 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 1 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos; y
- 35 una secuencia de cadena pesada descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º: 2 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 2 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos;
- 40 (b) histidina de 25 a 35 mM;
- (c) sorbitol de 170 a 288 mM; y
- 45 (d) de 0,008 a 0,012 % de polisorbato, por ejemplo, polisorbato 20;
- donde la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5 a 7.
- En una determinada realización, la composición farmacéutica acuosa comprende
- 50 (a) 180 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 1 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 1 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos; y
- 55 una secuencia de cadena pesada descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 2 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 2 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos;
- (b) histidina 30 mM;
- 60 (c) sorbitol 250 mM; y
- (d) 0,01 % de polisorbato, por ejemplo, polisorbato 20;
- donde la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5 a 7.
- 65

En algunos ejemplos, se permite una variabilidad, por ejemplo, una variabilidad de 1 a 5 %, de 5 a 10 %, de 10 a 15 %, o de 15 a 20 %, en las cantidades de uno o más componentes de la realización anterior. En algunos de dichos ejemplos, la composición farmacéutica acuosa comprende

5 (a) 180 mg/ml \pm 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % del anticuerpo;

(b) 30 mM \pm 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % de histidina;

10 (c) 250 mM \pm 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % de sorbitol; y

15 (d) 0,01 % \pm 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % de polisorbato, por ejemplo, polisorbato 20;

donde la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5 a 7. La variabilidad permitida en los componentes individuales se selecciona independientemente (por ejemplo, el anticuerpo puede estar presente a una concentración de 180 mg/ml \pm 10 %, la histidina a una concentración de 30 mM \pm 5 %, el sorbitol a una concentración de 250 mM \pm 7 % y el polisorbato 20 a 0,01 \pm 2 %). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5,5 a 6,5. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5,6 a 6,4, de 5,7 a 6,3, de 5,8 a 6,2, o de 5,9 a 6,1. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 6,0.

En otro ejemplo, la composición farmacéutica acuosa comprende

25 (a) de 165 a 200 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 1 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 1 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos; y

30 una secuencia de cadena pesada descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 2 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 2 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos;

(b) acetato de 25 a 35 mM;

35 (c) sorbitol de 170 a 253 mM; y

(d) 0,008 a 0,012 % de polisorbato, por ejemplo, polisorbato 80;

donde la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 4,5 a 6,5.

40 En un ejemplo determinado, la composición farmacéutica acuosa comprende

190 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 1 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 1 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, o 10 residuos de aminoácidos; y

45 una secuencia de cadena pesada descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 2 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 2 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos;

50 (b) acetato 30 mM;

(c) sorbitol 220 mM; y

55 (d) 0,01 % de polisorbato, por ejemplo, polisorbato 80;

donde la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 4,5 a 6,5.

En algunos ejemplos, se permite una variabilidad, por ejemplo, una variabilidad de 1 a 5 %, de 5 a 10 %, de 10 a 15 %, o de 15 a 20 %, en las cantidades de uno o más componentes de la realización anterior. En algunos de dichos ejemplos, la composición farmacéutica acuosa comprende

60 (a) 190 mg/ml \pm 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % del anticuerpo;

65

- (b) 30 mM \pm 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % de acetato;
- 5 (c) 220 mM \pm 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % de sorbitol; y
- (d) 0,01 % \pm 11 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % de polisorbato, por ejemplo, polisorbato 80;
- 10 donde la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 4,5 a 6,5. La variabilidad permitida en los componentes individuales se selecciona independientemente (por ejemplo, el anticuerpo puede estar presente a una concentración de 180 mg/ml \pm 10 %, el acetato a una concentración de 30 mM \pm 5 %, el sorbitol a una concentración de 220 mM \pm 7 % y el polisorbato 80 a 0,01 \pm 2 %). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5,0 a 6,0. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5,1 a 5,9, de 5,2 a 5,8, de 5,3 a 5,7, o de 5,4 a 5,6. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5,5.
- 15 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención tiene una viscosidad inferior a 15 cP o inferior a 14 cP. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención tiene una viscosidad de 10 cP a 14 cP.
- 20 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (por ejemplo, una composición farmacéutica acuosa descrita en la presente memoria que comprende histidina, sorbitol y polisorbato, por ejemplo, polisorbato 20) tiene una viscosidad de 13 a 14 cP. En algunas realizaciones, tal composición farmacéutica acuosa tiene una viscosidad inferior a 12 cP. En algunas realizaciones, tal composición farmacéutica acuosa tiene una viscosidad de 11 a 12 cP.
- 25 En algunas realizaciones, 1 ml de una composición farmacéutica acuosa de la invención tiene \leq 6.000 partículas que son \geq 10 μ M y/o tiene \leq 600 partículas que son \geq 25 μ M.
- 30 En algunas realizaciones, el anticuerpo que se incluye en una composición farmacéutica acuosa de la invención demuestra la unión al dominio I de integrina α 1, según lo evaluado con el uso de ELISA. En algunas realizaciones, el anticuerpo que se incluye en una composición farmacéutica acuosa de la invención demuestra una potencia de 80 % - 125 % de un estándar de referencia (por ejemplo, un anticuerpo que es del mismo lote (por ejemplo, lote de producción) pero que no está formulado en la composición farmacéutica acuosa).
- 35 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención muestra $<$ 15 % de impurezas mediante CE-SDS de reducción.
- 40 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención muestra \leq 10 % de agregación total cuando se evalúa mediante cromatografía de exclusión por tamaño.
- En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención tiene \leq 90,0 UE/ml de endotoxina.
- 45 En algunas realizaciones, 1 ml de una composición farmacéutica acuosa de la invención tiene \leq 6.000 partículas que son \geq 10 μ M. En algunas realizaciones, 1 ml de una composición farmacéutica acuosa de la invención tiene \leq 600 partículas que son \geq 25 μ M. En algunas realizaciones, 1 ml de una composición farmacéutica acuosa de la invención tiene \leq 6.000 partículas que son \geq 10 μ M y/o \leq 600 partículas que son \geq 25 μ M. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención cumple USP $<$ 71 $>$.
- 50 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (por ejemplo, una formulación de histidina) satisface uno o más de los criterios descritos en la tabla 32.
- 55 En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa comprende (a) de 165 a 190 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene
- una secuencia de cadena ligera descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 1 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 1 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos; y
- 60 una secuencia de cadena pesada descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 2 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 2 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos;
- (b) histidina de 25 a 35 mM;
- 65 (c) sorbitol de 170 a 288 mM; y

(d) 0,008 a 0,012 % de polisorbato, por ejemplo, polisorbato 20;

donde la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5 a 7.

5 En una determinada realización, la composición farmacéutica acuosa comprende

(a) 180 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 1 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 1 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos; y una secuencia de cadena pesada descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 2 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 2 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos;

15 (b) histidina 30 mM;

(c) sorbitol 250 mM; y

(d) 0,01 % de polisorbato, por ejemplo, polisorbato 20;

20 donde la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5 a 7.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención se dispone en un recipiente con un volumen de llenado final de 1 ml. En algunas realizaciones, el recipiente es un vial de vidrio de borosilicato de USP de tipo 1 de 2 ml con un tapón a base de clorobutilo de 13 mm con recubrimiento de flourotech en el tapón y un recubrimiento de B2 en la parte superior y un sello superior de aluminio con tapa abatible.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio (véase la tabla 32) para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 de las propiedades A a M, bien inmediatamente después de la producción o después de almacenarla en las condiciones descritas en la presente memoria (por ejemplo, como se describe en los ejemplos de la presente memoria, por ejemplo, después de almacenarla durante un período de hasta 12 meses [por ejemplo, después de almacenarla durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses, o 12 meses], por ejemplo, almacenamiento a -75 °C, a una temperatura de 2 a 8 °C, a 30 °C y a una HR de 65 %, o a 40 °C y una HR de 75 %). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio para todos las propiedades de A a M. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio para al menos una propiedad en cada uno de los grupos 1 a 4. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio para al menos dos propiedades en cada uno de los grupos 1 a 4.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio para las propiedades G y/o H, K, e I y/o J. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio para las propiedades G, K e I; para las propiedades H, K e I; para las propiedades G, K y J; o para las propiedades H, K y J. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio para las propiedades G, H, K e I; para las propiedades G, H, K y J; para las propiedades G, K, I y J; o para las propiedades H, K, I y J. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio para las propiedades G, H, K, I y J.

Tabla 32: Criterios para formulaciones líquidas, por ejemplo, formulaciones de histidina

| Propiedad | | Criterio | |
|---------------------|---|--|--|
| General (grupo 1) | A | Aspecto | De transparente a opalescente ligeramente amarillo a amarillo esencialmente exento de materia en forma de partículas visible |
| | B | pH | 5 - 7 |
| | C | Partículas | partículas ≥ 10 µms: ≤ 6.000 partículas por recipiente partículas ≥ 25 µm: ≤ 600 partículas por recipiente |
| | D | Osmolalidad ¹ | 270 - 380 mOsm/kg |
| | E | Concentración de proteína (A280) | 165 - 190 mg/ml |
| Identidad (grupo 2) | F | Perfil de carga mediante toma de Imaging Capillary Isoelectric Focusing (Imagen de isoelectroenfoco capilar - icIEF) | pI del pico principal es ± 0,1 con respecto al patrón de referencia |
| | G | Potencia (ELISA) | Demuestra la unión al dominio I de integrina α1 |

| | | | |
|------------------------------|---|---|---------------------------------------|
| Potencia biológica (Grupo 3) | H | Potencia (ELISA) | 80 % - 125 % del patrón de referencia |
| Pureza e impurezas (Grupo 4) | I | Impurezas mediante CE-SDS de reducción | Impurezas totales < 15,0 % |
| | J | Impurezas mediante CE-SDS sin reducción | Impurezas totales < 15,0 % |
| | K | Agregación mediante size exclusion chromatography (cromatografía de exclusión por tamaño - SEC) | ≤ 10,0 % Agregación total |
| Seguridad (grupo 5) | L | Endotoxina | ≤ 90,0 UE/ml |
| | M | Esterilidad | Cumple con los requisitos de USP |

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (p. ej., una formulación de acetato) satisface uno o más de los criterios descritos en la tabla 33.

5 En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa comprende

(a) de 165 a 200 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 1 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 1 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos; y
 10 una secuencia de cadena pesada descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 2 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 2 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos;

15 (b) acetato de 25 a 35 mM;

(c) sorbitol de 170 a 253 mM; y

20 (d) 0,008 a 0,012 % de polisorbato, por ejemplo, polisorbato 80;

donde la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 4,5 a 6,5.

En un ejemplo determinado, la composición farmacéutica acuosa comprende

25 (a) 190 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 1 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 2 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos; y
 30 una secuencia de cadena pesada descrita en la presente memoria, por ejemplo, una secuencia de la id. de sec. n.º 2 o una secuencia que difiere de la id. de sec. n.º 2 en al menos uno, pero no más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9 o 10 residuos de aminoácidos;

(b) acetato 30 mM;

35 (c) sorbitol 220 mM; y

(d) 0,01 % de polisorbato, por ejemplo, polisorbato 80;

40 donde la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 4,5 a 6,5.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención se dispone en un recipiente con un volumen de llenado final de 1 ml. En algunas realizaciones, el recipiente es un vial de vidrio de borosilicato de USP de tipo 1 de 2 ml con un tapón a base de clorobutilo de 13 mm con recubrimiento de flourotech en el tapón y un recubrimiento de B2 en la parte superior y un sello superior de aluminio con tapa abatible.

45 En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio (véase tabla 33) para 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, o 14 de las propiedades A a M. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio para todas las propiedades A a M. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio para al menos una propiedad
 50 en cada uno de los grupos 1 a 4. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio para al menos dos propiedades en cada uno de los grupos 1 a 4.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio para las propiedades G y/o H, K, e I y/o J. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio para las propiedades G, K e I; para las propiedades H, K e I; para las propiedades G, K y J; o para las propiedades H, K y J. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio para las propiedades G, H, K e I; para las propiedades G, H, K y J; para las propiedades G, K, I y J; o para las propiedades H, K, I y J. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención satisface el criterio para las propiedades G, H, K, I y J.

Tabla 33: Criterios para formulaciones líquidas, por ejemplo, formulaciones de acetato

| Propiedad | | Criterio | |
|------------------------------|---|---|---|
| General (grupo 1) | A | Aspecto | De transparente a opalescente ligeramente amarillo a amarillo esencialmente exento de materia en forma de partículas visible |
| | B | pH | 4,5 - 6,5 |
| | C | Partículas | partículas $\geq 10 \mu\text{ms}$: ≤ 6.000 partículas por recipiente partículas $\geq 25 \mu\text{m}$: ≤ 600 partículas por recipiente |
| | D | Osmolalidad ^l | 270 - 380 mOsm/kg |
| | E | Concentración de proteína (A280) | 165 - 200 mg/ml |
| Identidad (grupo 2) | F | Perfil de carga mediante toma de Imaging Capillary Isoelectric Focusing (Imagen de isoelectroenfoque capilar - icIEF) | pI del pico principal es $\pm 0,1$ con respecto al patrón de referencia |
| | G | Potencia (ELISA) | Demuestra la unión al dominio I de integrina $\alpha 1$ |
| Potencia biológica (Grupo 3) | H | Potencia (ELISA) | 80 % - 125 % del patrón de referencia |
| Pureza e impurezas (Grupo 4) | I | Impurezas mediante CE-SDS de reducción | Impurezas totales < 15,0 % |
| | J | Impurezas sin reducción | Impurezas totales < 15,0 % |
| | | CE-SDS | |
| | K | Agregación mediante size exclusion chromatography (cromatografía de exclusión por tamaño - SEC) | $\leq 10,0$ % Agregación total |
| Seguridad (grupo 5) | L | Endotoxina | $\leq 90,0$ UE/ml |
| | M | Esterilidad | Cumple con los requisitos de USP |

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención es estable. En algunas realizaciones, la estabilidad se establece en función del análisis de la composición farmacéutica acuosa después del almacenamiento en condiciones controladas durante un período de tiempo previamente seleccionado, por ejemplo, 1 mes, 3 meses, 6, meses, 9 meses o 12 meses. Las condiciones controladas se describen en los ejemplos de la presente memoria. Por ejemplo, las condiciones controladas pueden incluir almacenamiento a una temperatura fija o intervalo de temperatura fijo, condiciones de humedad controladas, niveles de luz controlados (p. ej., almacenamiento en la oscuridad), y/o almacenamiento en viales sellados estériles, por ejemplo, viales de vidrio de borosilicato de tipo I despirogenado (p. ej., a un volumen de 1 ml), que se sellan con tapones de FluroTec®, por ejemplo tapones de FluroTec® de 13 mm. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención se almacena a - 75 °C, de 2 a 8 °C, 30 °C y 65 % de HR, o 40 °C y 75 % de HR, por ejemplo, como se describe en los ejemplos de la presente memoria.

En algunas realizaciones, la estabilidad se establece a partir de la prueba de parámetros, tales como, por ejemplo, el aspecto, contenido de proteína, pH, recuento de partículas, % de cadena pesada, % de cadena ligera, % de IgG, % de pérdida de IgG intacta.

En algunas realizaciones, la estabilidad se establece en función del aspecto. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención es de transparente a opalescente. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención es de ligeramente amarilla a amarilla. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención está esencialmente exenta de materia en forma de partículas visibles.

En algunas realizaciones, la estabilidad se establece en base a los recuentos de partícula, por ejemplo, recuentos de partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ y/o partículas $\geq 25 \mu\text{M}$, determinados utilizando un contador de partículas líquido, por ejemplo, un contador de partículas como se describe en los ejemplos de la presente memoria.

En algunas realizaciones, la estabilidad se establece en función del contenido de proteína. En algunas realizaciones, no hay pérdida detectable en el contenido de proteína después de almacenar durante un período de tiempo

- previamente seleccionado, por ejemplo, 1 mes, 3 meses, 6, meses, 9 meses o 12 meses. En algunas realizaciones, la estabilidad se evalúa en función de la pureza. En algunas realizaciones, la pureza se determina en función del % de cadena pesada, % de cadena ligera, % de IgG, y/o % de pérdida de IgG, evaluada utilizando SDS-PAGE de reducción, por ejemplo, como se describe en los ejemplos de la presente memoria. En algunas realizaciones, la pureza se determina en función del % de área promedio del monómero, el % de fragmentación (es el % de área promedio de 100 monómeros), el % de área promedio de 3 agregados, el % de área promedio de 2 agregados, el % de área promedio de 1 agregado, el % de área promedio de LMWI 1 y/o el % de área promedio de LMWI 2, evaluada utilizando SEC, por ejemplo, como se describe en los ejemplos de la presente memoria.
- 5
- 10 En algunas realizaciones, la estabilidad se evalúa a partir de la heterogeneidad de carga, evaluada con el uso de CEX, por ejemplo, como se describe en los ejemplos de la presente memoria. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable si el recuento de partículas satisface los límites de partícula para la inyección establecidos por USP<788>. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable si los recuentos de partículas para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ es inferior a 6.000 o los recuentos de partícula para las partículas $\geq 25 \mu\text{M}$ es inferior a 600. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable si los recuentos de partículas para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ es inferior a 6.000 y los recuentos de partícula para las partículas $\geq 25 \mu\text{M}$ es inferior a 600.
- 15
- 20 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable después de almacenarla a -75°C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., hasta 12 meses [p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses]), como se indica mediante la presencia de menos de 1.600, 1.700, 1.800, 1.900, 2.000, 2.100, 2.200, 2.300, 2.400, 2.500, 2.600, 2.700, 2.800, 2.900, o 3.000 partículas/ml, evaluado mediante recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ usando un contador líquido de partículas. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a -75°C durante 12 meses, según lo indicado por la presencia de menos de 1.600 partículas/ml, evaluado mediante recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ utilizando un contador de partículas líquido.
- 25
- 30 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (p. ej., una composición farmacéutica acuosa que comprende histidina, sorbitol, y polisorbato, p. ej., polisorbato 20) es estable después de almacenarla a -75°C durante un período de hasta 12 meses [p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses]), indicado mediante la presencia de menos de 600, 700, 800, 900, 1.000, 1.100, 1.200, 1.300, 1.400, o 1.500 partículas/ml, evaluado por recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ usando un contador de partículas líquido; en una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a -75°C durante 12 meses, indicado mediante la presencia de menos de 600 ml/partículas, evaluado por recuentos acumulativos/ml para partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ usando un contador de partículas líquido.
- 35
- 40 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable después de almacenarla a -75°C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., hasta 12 meses [p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses]), como se indica mediante la presencia de menos de 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 500, o 600 partículas/ml, evaluado por recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 25 \mu\text{M}$ usando un contador líquido de partículas. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a -75°C durante 12 meses, según lo indicado por la presencia de menos de 250 partículas/ml, evaluado mediante recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 25 \mu\text{M}$ utilizando un contador de partículas líquido.
- 45
- 50 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (p. ej., una composición farmacéutica acuosa descrita en la presente memoria que comprende histidina, sorbitol y polisorbato, p. ej., polisorbato 20) es estable después de almacenarla a -75°C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., hasta 12 meses [p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses]), como se indica mediante la presencia de menos de 100, 90, 80, 70, 50, 40, o 30 partículas/ml, evaluado por recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 25 \mu\text{M}$ usando un contador líquido de partículas. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a -75°C durante 12 meses, según lo indicado por la presencia de menos de 100 partículas/ml, evaluado mediante recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 25 \mu\text{M}$ utilizando un contador de partículas líquido.
- 55
- 60 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable después de almacenarla a una temperatura de 2 a 8°C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., hasta 12 meses [p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses]), como se indica mediante la presencia de menos de 2.600, 2.700, 2.800, 2.900, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, o 6.000 partículas/ml, evaluado por recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ usando un contador líquido de partículas. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a una temperatura de 2 a 8°C durante 12 meses, según lo indicado por la presencia de menos de 2.600 partículas/ml, evaluado mediante recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ utilizando un contador de partículas líquido.
- 65
- En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (p. ej., una composición farmacéutica acuosa que comprende histidina, sorbitol y polisorbato, p. ej., polisorbato 20) es estable después de almacenarla a una temperatura de 2 a 8°C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., hasta 12 meses [p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses]), como se indica mediante la presencia de menos de 1.500, 1.600, 1.700,

1.800, 1.900, 2.000, 2.100, 2.200, 2.300, 2.400, o 2.500 partículas/ml, evaluado por recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ usando un contador líquido de partículas. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a una temperatura de 2 a 8 °C durante 12 meses, según lo indicado por la presencia de menos de 1.500 partículas/ml, evaluado mediante recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$, utilizando un contador de partículas líquido.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable después de almacenarla a una temperatura de 2 a 8 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., hasta 12 meses [p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses]), como se indica mediante la presencia de menos de 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 500, 5.500, o 600 partículas/ml, evaluado por recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 25 \mu\text{M}$, usando un contador líquido de partículas. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a una temperatura de 2 a 8 °C durante 12 meses, según lo indicado por la presencia de menos de 250 partículas/ml, evaluado mediante recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 25 \mu\text{M}$, utilizando un contador de partículas líquido.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (p. ej., una composición farmacéutica acuosa que comprende histidina, sorbitol y polisorbato, p. ej., polisorbato 20) es estable después de almacenarla a una temperatura de 2 a 8 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., hasta 12 meses [p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses]), como se indica mediante la presencia de menos de 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, o 180 partículas/ml, evaluado por recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 25 \mu\text{M}$ usando un contador líquido de partículas. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a una temperatura de 2 a 8 °C durante 12 meses, según lo indicado por la presencia de menos de 50 partículas/ml, evaluado mediante recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 25 \mu\text{M}$ utilizando un contador de partículas líquido.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable después de almacenarla a 30 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), como se indica mediante la presencia de menos de 2.600, 2.700, 2.800, 2.900, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, o 6.000 partículas/ml, evaluado por recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ usando un contador líquido de partículas. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a una temperatura de 30 °C durante 12 meses, según lo indicado por la presencia de menos de 2.600 partículas/ml, evaluado mediante recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ utilizando un contador de partículas líquido.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (p. ej., una composición farmacéutica acuosa que comprende histidina, sorbitol y polisorbato, p. ej., polisorbato 20) es estable después de almacenarla a 30 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), como se indica mediante la presencia de menos de 2.500, 2.400, o 2.300 partículas/ml, evaluado por recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ usando un contador líquido de partículas. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a una temperatura 30 °C durante 12 meses, según lo indicado por la presencia de menos de 2.300 partículas/ml, evaluado mediante recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ utilizando un contador de partículas líquido.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable después de almacenarla a 30 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), como se indica mediante la presencia de menos de 210, 220, 230, 240, 250, 300, 350, 400, 500, 5.500, o 600 partículas/ml, evaluado por recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 25 \mu\text{M}$ usando un contador líquido de partículas. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a una temperatura de 30 °C durante 12 meses, según lo indicado por la presencia de menos de 250 partículas/ml, evaluado mediante recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 25 \mu\text{M}$ utilizando un contador de partículas líquido.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (p. ej., una composición farmacéutica acuosa que comprende histidina, sorbitol y polisorbato, p. ej., polisorbato 20) es estable después de almacenarla a 30 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), como se indica mediante la presencia de menos de 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, o 190 partículas/ml, evaluado por recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 25 \mu\text{M}$ usando un contador líquido de partículas. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a una temperatura de 30 °C durante 12 meses, según lo indicado por la presencia de menos de 120 partículas/ml, evaluado mediante recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 25 \mu\text{M}$ utilizando un contador de partículas líquido.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable después de almacenarla a 40 °C durante un período de hasta 6 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses o 6 meses), como se indica mediante la presencia de menos de 2.600, 2.700, 2.800, 2.900, 3.000, 3.500, 4.000, 4.500, 5.000, 5.500, o 6.000 partículas/ml, evaluado por recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ usando un contador líquido de partículas. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a una temperatura de 2 a 40 °C durante 6 meses, según lo indicado por la presencia de menos de 2.600 partículas/ml, evaluado mediante recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ utilizando un contador de partículas líquido.

- 5 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (p. ej., una composición farmacéutica acuosa que comprende histidina, sorbitol y polisorbato, p. ej., polisorbato 20) es estable después de almacenarla a 40 °C durante un período de hasta 6 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses o 6 meses), como se indica mediante la presencia de menos de 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, o 190 partículas/ml, evaluado por recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ usando un contador líquido de partículas. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a una temperatura de 40 °C durante 6 meses, según lo indicado por la presencia de menos de 120 partículas/ml, evaluado mediante recuentos acumulativos/ml para las partículas $\geq 10 \mu\text{M}$ utilizando un contador de partículas líquido.
- 10 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable tras el almacenamiento a -75 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), según se indica por menos de 1 %, 2 %, o 3 % de pérdida relativa de IgG intacta, evaluado utilizando SDS-PAGE en estado reducido. Como se usa en este contexto, “pérdida relativa” se refiere a la pérdida en comparación con un estándar de referencia, por ejemplo, un anticuerpo que es del mismo lote (p. ej., lote de producción) pero que no se formula en la composición farmacéutica acuosa. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable tras el almacenamiento a -75 °C durante 12 meses, según se indica por menos de 1 % de pérdida relativa de IgG intacta, evaluado utilizando SDS-PAGE en estado reducido.
- 15 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (p. ej., una composición farmacéutica acuosa que comprende histidina, sorbitol y polisorbato, p. ej., polisorbato 20) es estable después de almacenarla a -75 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), como se indica por menos de 0,5 %, 0,6 %, 0,7 %, o 0,8 % de pérdida relativa de IgG, evaluado utilizando SDS-PAGE en estado reducido. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla durante 12 meses a -75 °C, como se indica por menos de 0,5 % de pérdida relativa de IgG, evaluado utilizando SDS-PAGE en estado reducido.
- 20 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable tras el almacenamiento a 2-8 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), según se indica por menos de 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, o 15 % de pérdida relativa de IgG intacta, evaluado utilizando SDS-PAGE en estado reducido. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable tras el almacenamiento a 2-8 °C durante 12 meses, según se indica por menos de 10 % de pérdida relativa de IgG intacta, evaluado utilizando SDS-PAGE en estado reducido.
- 25 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (p. ej., una composición farmacéutica acuosa que comprende histidina, sorbitol y polisorbato, p. ej., polisorbato 20) es estable después de almacenarla a 2-8 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), como se indica por menos de 3 %, 4 %, 5 %, o 6 % de pérdida relativa de IgG intacta, evaluado utilizando SDS-PAGE en estado reducido. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable tras el almacenamiento a 2-8 °C durante 12 meses, según se indica por menos de 3 % de pérdida relativa de IgG intacta, evaluado utilizando SDS-PAGE en estado reducido.
- 30 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable tras el almacenamiento a 30 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), según se indica por menos de 23 %, 24 %, 25 %, 26 %, 27 %, 28 %, 29 %, o 30 % de pérdida relativa de IgG intacta, evaluado utilizando SDS-PAGE en estado reducido. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable tras el almacenamiento a 30 °C durante 12 meses, según se indica por menos de 25 % de pérdida relativa de IgG intacta, evaluado utilizando SDS-PAGE en estado reducido.
- 35 En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a 40 °C durante 6 meses (p. ej., 1 mes, 3 meses o 6 meses), como se indica por menos de 30 % de pérdida relativa de IgG intacta, evaluado utilizando SDS-PAGE en estado reducido. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable tras el almacenamiento a 40 °C durante 6 meses, según se indica por menos de 30 % de pérdida relativa de IgG intacta, evaluado utilizando SDS-PAGE en estado reducido.
- 40 En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable después de almacenarla a 40 °C durante un período de hasta 6 meses (p. ej., 1 mes, 3 meses o 6 meses), como se indica por menos de 25 % de pérdida relativa de IgG, evaluado utilizando SDS-PAGE en estado reducido. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable tras el almacenamiento a 40 °C durante 6 meses, según se indica por menos de 25 % de pérdida relativa de IgG intacta, evaluado utilizando SDS-PAGE en estado reducido.
- 45 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable tras el almacenamiento a -75 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), según se indica por menos de 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, o 10 % de fragmentación, evaluado utilizando cromatografía de exclusión por tamaño. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable tras el
- 50
- 55
- 60
- 65

almacenamiento a -75 °C durante 12 meses, según se indica por menos de 4 % de fragmentación, evaluado utilizando cromatografía de exclusión por tamaño.

5 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable tras el almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), según se indica por menos de 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, o 10 % de fragmentación, evaluado utilizando cromatografía de exclusión por tamaño. En una realización, la composición farmacéutica acuosa es estable tras el almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C durante 12 meses, según se indica por menos de 5 % de fragmentación, evaluado utilizando cromatografía de exclusión por tamaño.

10 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable tras el almacenamiento a 30 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), según se indica por menos de 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, o 20 % de fragmentación, evaluado utilizando cromatografía de exclusión por tamaño.

15 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (p. ej., una composición farmacéutica acuosa que comprende histidina, sorbitol y polisorbato, p. ej., polisorbato 20) es estable después de almacenarla a 30 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), como se indica por menos de 12 % de fragmentación, evaluado utilizando cromatografía de exclusión por tamaño.

20 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable tras el almacenamiento a 40 °C durante un período de hasta 6 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses o 6 meses), según lo indicado por menos de 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, o 25 % de fragmentación, evaluado utilizando cromatografía de exclusión por tamaño.

25 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable tras el almacenamiento a 40 °C durante un período de hasta 6 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses o 6 meses), según lo indicado por menos de 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 o 30 % de fragmentación, evaluado utilizando cromatografía de exclusión por tamaño.

30 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (p. ej., una composición farmacéutica acuosa que comprende histidina, sorbitol y polisorbato, p. ej., polisorbato 20) es estable después de almacenarla a 40 °C durante un período de hasta 6 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses o 6 meses), como se indica por menos de 17, 18, 19 o 20 % de fragmentación, evaluado utilizando cromatografía de exclusión por tamaño.

35 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable tras el almacenamiento a 30 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), según lo indicado por menos de 5, 6, 7, 8, 9 o 10 % de área promedio de LMWI 1, evaluado utilizando cromatografía de exclusión por tamaño.

40 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención (p. ej., una composición farmacéutica acuosa que comprende histidina, sorbitol y polisorbato, p. ej., polisorbato 20) es estable después de almacenarla a 30 °C durante un período de hasta 12 meses (p. ej., durante 1 mes, 3 meses, 6 meses, 9 meses o 12 meses), como se indica por menos de 3, 4 o 5 % de área promedio de LMWI 1, evaluado utilizando cromatografía de exclusión por tamaño.

45 En algunas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es adecuada para la administración subcutánea.

50 La presente memoria también proporciona una forma farmacéutica unitaria de una composición farmacéutica acuosa, por ejemplo, una composición farmacéutica acuosa descrita en la presente memoria. En algunos ejemplos, la forma farmacéutica unitaria, cuando se administra a un ser humano, suministrará anticuerpo a un nivel de aproximadamente 2,0 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 4,0 mg por kg de peso corporal al ser humano.

55 En algunos ejemplos, se proporciona una pluralidad de formas farmacéuticas unitarias de una composición farmacéutica acuosa (p. ej., una composición farmacéutica acuosa descrita en la presente memoria).

En algunos ejemplos, se proporciona un kit que comprende la forma farmacéutica unitaria o la pluralidad de formas farmacéuticas unitarias.

60 En algunos ejemplos, una composición farmacéutica acuosa descrita en la presente memoria se dispone en un recipiente. En algunos ejemplos, el recipiente tiene dispuesto en él una forma farmacéutica unitaria de la composición farmacéutica. En algunos ejemplos, el recipiente es un dispositivo de suministro. En algunos ejemplos, el recipiente es adecuado para administrar la composición farmacéutica subcutáneamente. En algunos ejemplos, el recipiente es una jeringa, por ejemplo, una jeringa previamente cargada. En algunas realizaciones, el recipiente es un vial sellado.

65 En un aspecto, la descripción proporciona un método para tratar un paciente que necesita una terapia anti-VLA-1, que comprende administrar al paciente una cantidad eficaz de una composición farmacéutica acuosa descrita en la presente

- 5 memoria. En algunos ejemplos, el paciente tiene un trastorno inflamatorio. En algunos ejemplos, el paciente tiene un trastorno seleccionado del grupo que consiste en artritis, inflamación intestinal, lupus, rechazo de trasplante, psoriasis y sarcoidosis. En algunos ejemplos, el paciente tiene sarcoidosis. En algunos ejemplos, el paciente tiene artritis. En algunos ejemplos, el paciente tiene artritis reumatoide. En algunos ejemplos, el paciente tiene artritis reumatoide con una actividad de moderada a grave. En algunos ejemplos, el paciente tiene inflamación intestinal. En algunos ejemplos, el paciente tiene la enfermedad de Crohn. En algunos ejemplos, el paciente tiene colitis ulcerosa. En algunos ejemplos, el paciente tiene nefropatía lúpica. En algunos ejemplos, el método es eficaz para tratar el trastorno que padece paciente que requiere la terapia de anti-VLA-1 (p. ej., el trastorno inflamatorio o el trastorno seleccionado del grupo que consiste en artritis, inflamación intestinal, lupus, rechazo de trasplante, psoriasis, y sarcoidosis).
- 10 En algunos ejemplos, el paciente tiene artritis reumatoide con una actividad de moderada a grave.
- 15 En algunos ejemplos, el paciente es un adulto. En algunos ejemplos, el paciente es un adulto con artritis reumatoide con una actividad de moderada a grave.
- 20 En algunos ejemplos, la composición farmacéutica acuosa se administra subcutáneamente. En algunos ejemplos, la composición se administra semanalmente. En algunos ejemplos, la composición se administra cada 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días. En algunos ejemplos, la composición se administra cada dos semanas. En algunos ejemplos, la composición se administra cada tres semanas o cada cuatro semanas.
- 25 En algunos ejemplos, la composición se administra durante al menos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 semanas. En algunos ejemplos, la composición se administra semanalmente durante al menos 6 semanas.
- 30 En algunos ejemplos, la composición se administra a una dosis de 0,5 mg/kg a 6 mg/kg. En algunos ejemplos, la composición se administra a una dosis de 0,5 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, o 6,0 mg/kg. En algunos ejemplos, la composición se administra a una dosis de 2,0 mg/kg a 6,0 mg/kg. En algunos ejemplos, la composición se administra a una dosis de 2,0 mg/kg, 4,0 mg/kg, o 6,0 mg/kg.
- 35 En algunos ejemplos, el método reduce un signo o síntoma (p. ej., un signo o síntoma del trastorno que padece el paciente, por ejemplo, un signo o síntoma de artritis reumatoide), ralentiza el avance del daño estructural (por ejemplo, el daño estructural asociado con el trastorno que el paciente padece, por ejemplo, daño estructural asociado con la artritis reumatoide) o mejora la función física. En algunos ejemplos, tratar al paciente según el método durante al menos 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas, 5 semanas, 6 semanas, 7 semanas u 8 semanas reduce un signo o síntoma, ralentiza el avance del daño estructural o mejora la función física.
- 40 La eficacia del método (p. ej., la eficacia para reducir un signo o un síntoma, la ralentización del avance del daño estructural o la mejora la función física) se puede evaluar con las medidas conocidas en la técnica. En algunos ejemplos, la eficacia se evalúa con el uso de los resultados de ACR20, ACR50, ACR70, DAS28 CRP, HAQ-DI y/o MRI.
- 45 En algunos ejemplos, el método no está asociado con ningún evento adverso en el paciente o en un estudio clínico de pacientes que tienen la misma enfermedad que el paciente que se va a tratar. En algunos ejemplos, el método no está asociado con ningún evento adverso grave o moderado en el paciente o en un estudio clínico de pacientes que tienen la misma enfermedad que el paciente que se va a tratar.
- 50 En algunos ejemplos, el individuo tiene artritis reumatoide. En algunos ejemplos, el paciente es un adulto. En algunos ejemplos, el paciente se ha sometido a un tratamiento alternativo previo (p. ej., un tratamiento alternativo previo para el trastorno que el paciente padece). Un "tratamiento alternativo previo", como se utiliza en la presente memoria, se refiere a cualquier tratamiento que no sea un tratamiento que comprenda un anticuerpo anti-VLA-1 como se describe en la presente memoria. En algunos ejemplos, el paciente tiene una respuesta inadecuada al tratamiento alternativo previo.
- 55 En algunos ejemplos, el paciente tiene artritis reumatoide y ha experimentado un tratamiento alternativo previo para la artritis reumatoide. En algunos ejemplos, el paciente tiene una respuesta inadecuada al tratamiento alternativo previo.
- 60 En un aspecto, la descripción proporciona un método para tratar un paciente (p. ej., un paciente adulto) con artritis reumatoide (p. ej., artritis reumatoide con una actividad de moderada a grave) que ha tenido un tratamiento alternativo previo (p. ej., un tratamiento alternativo previo para la artritis reumatoide), comprendiendo dicho método administrar subcutáneamente a dicho paciente una formulación líquida (p. ej., una composición farmacéutica acuosa) que comprende
- 65 (a) de 150 a 210 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 y una secuencia de cadena pesada de la id. de sec. n.º 2;
- (b) acetato de 25 a 35 mM o histidina de 25 a 35 mM;
- (c) sorbitol de 170 a 288 mM; y

(d) de 0,008 a 0,012 % de polisorbato, donde el polisorbato es polisorbato 20 o polisorbato 80;

y donde la composición tiene un pH de 5 a 7.

5 En algunos ejemplos, el método reduce un signo o síntoma de artritis reumatoide, ralentiza el avance del daño estructural asociado con la artritis reumatoide o mejora la función física.

En algunos ejemplos, la formulación líquida (p. ej., la composición farmacéutica acuosa) comprende

10 (a) 180 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 y una secuencia de cadena pesada de la id. de sec. n.º 2;

(b) histidina 30 mM; (c) sorbitol 250 mM; y

15 (d) 0,01 % de polisorbato 20; y

donde la composición tiene un pH de 6,0.

20 En algunos ejemplos, la formulación líquida se administra al paciente a una dosis de 0,5 a 6,0 mg/kg. En algunos ejemplos, la formulación líquida se administra al paciente a una dosis de 2 a 6 mg/kg. En algunos ejemplos, la formulación líquida se administra al paciente a una dosis de 2 mg/kg, 4 mg/kg, o 6 mg/kg.

25 En algunos ejemplos, la formulación líquida o composición farmacéutica acuosa se administra repetidamente, por ejemplo, semanalmente. En algunos ejemplos, la formulación líquida o composición farmacéutica acuosa se administra cada 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 días. En algunos ejemplos, la composición se administra cada dos semanas. En algunos ejemplos, la composición se administra cada tres semanas o cada cuatro semanas.

30 En algunos ejemplos, la formulación líquida o composición farmacéutica acuosa se administra repetidamente (p. ej., semanalmente) durante al menos 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 o más semanas. En algunos ejemplos, la formulación líquida o composición farmacéutica acuosa se administra durante 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más semanas.

35 En algunos ejemplos, la formulación líquida se administra semanalmente. En algunos ejemplos, la formulación líquida se administra durante al menos 6 semanas. En algunos ejemplos, la formulación líquida se administra durante al menos 6 semanas.

40 En algunos ejemplos, el tratamiento alternativo previo comprende un inhibidor de tipo DMARD (fármaco antirreumático modificador de la enfermedad) o un inhibidor de TNF- α (factor de necrosis tumoral- α).

En algunos ejemplos, el DMARD es metotrexato, leflunomida, sulfasalazina o hidroxicloroquina.

45 En algunos ejemplos, el tratamiento alternativo previo comprende un agente biológico, por ejemplo, un inhibidor de TNF- α . En algunos ejemplos, el inhibidor de TNF- α es infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab o etanercept.

En algunos ejemplos, el tratamiento alternativo previo comprende un agente seleccionado de infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab, etanercept, abatacept, rituximab, tocilizumab, tofacitinib, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, e hidroxicloroquina.

50 En algunos ejemplos, el tratamiento alternativo previo comprende un agente seleccionado de abatacept, rituximab, tocilizumab, golimumab, y tofacitinib.

55 En algunos ejemplos, el individuo ha tenido una respuesta inadecuada al tratamiento alternativo previo. En algunos ejemplos, la respuesta es inadecuada si se evalúa atendiendo a criterios de ACR. En algunos ejemplos, el paciente no alcanza ACR20 después del tratamiento alternativo previo. En algunos ejemplos, el paciente no alcanza ACR50 después del tratamiento alternativo previo. En algunos ejemplos, el paciente no alcanza ACR70 después del tratamiento alternativo previo. En algunos ejemplos, se determina que el tratamiento alternativo previo es inadecuado tras 6 meses de tratamiento, o tras 6 o más meses de tratamiento. En algunos ejemplos, se determina que el tratamiento alternativo previo es inadecuado tras 1 o más, 2 o más, 3 o más, 4 o más, 5 o más, 6 o más, 7 o más, 8 o más, 9 o más, 10 o más, 11 o más, o 12 o más meses de tratamiento.

60 En algunos ejemplos, el método además comprende administrar al paciente un segundo agente terapéutico, p. ej., un corticosteroide o un antiinflamatorio.

En algunos ejemplos, el método se asocia con un riesgo de infección ≤ 10 %.

65 En algunos ejemplos, el método se asocia con reacciones del sitio de inyección más que moderadas en ≤ 10 % de pacientes, p. ej., ≤ 10 % de pacientes en un estudio clínico.

- 5 En un ejemplo, el método comprende tratar un paciente adulto con artritis reumatoide activa con intensidad moderada a fuerte que ha tenido una respuesta inadecuada a un tratamiento alternativo previo, p. ej., un tratamiento alternativo previo que comprende un agente biológico, comprendiendo dicho método administrar subcutáneamente una vez a la semana a dicho paciente una formulación líquida (p. ej., una composición farmacéutica acuosa) que comprende
- (a) de 165 a 190 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 y una secuencia de cadena pesada de la id. de sec. n.º 2;
- 10 (b) histidina de 25 a 35 mM;
- (c) sorbitol de 170 a 288 mM; y
- 15 (d) de 0,008 a 0,012 % de polisorbato 20; y
- donde la formulación líquida (por ejemplo, la composición farmacéutica acuosa) tiene un pH de 5 a 7. En algunos ejemplos, el método reduce un signo o síntoma de artritis reumatoide, ralentiza el avance del daño estructural asociado con la artritis reumatoide o mejora la función física. En algunos ejemplos, la formulación líquida se administra a una dosis de 2 a 6 mg/kg.
- 20 Un aspecto proporcionado en la presente memoria es un método de preparación de una composición farmacéutica acuosa que comprende de 150 a 210 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 y una secuencia de cadena pesada de la id. de sec. n.º 2; comprendiendo el método combinar dicho anticuerpo con un tampón seleccionado de histidina y acetato, un tensioactivo seleccionado de polisorbato 20 y polisorbato 80, y sorbitol para obtener una composición farmacéutica acuosa que comprende
- 25 (a) de 150 a 210 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 y una secuencia de cadena pesada de la id. de sec. n.º 2;
- 30 (b) acetato de 25 a 35 mM o histidina de 25 a 35 mM;
- (c) sorbitol de 170 a 288 mM; y
- 35 (d) de 0,008 a 0,012 % de polisorbato, donde el polisorbato es polisorbato 20 o polisorbato 80;
- donde la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 4,5 a 7.
- En algunos ejemplos, el tampón es histidina. En algunos ejemplos, el polisorbato es polisorbato 20. En algunos ejemplos, el tampón es histidina y el polisorbato es polisorbato 20.
- 40 En algunos ejemplos, el tampón es acetato. En algunos ejemplos, el polisorbato es polisorbato 80. En algunos ejemplos, el tampón es acetato y el polisorbato es polisorbato 80.
- En algunos ejemplos, la composición farmacéutica acuosa comprende
- 45 (a) de 165 a 190 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 y una secuencia de cadena pesada de la id. de sec. n.º 2;
- 50 (b) histidina de 25 a 35 mM;
- (c) sorbitol de 170 a 288 mM; y
- (d) de 0,008 a 0,012 % de polisorbato 20; y
- 55 la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5 a 7.
- En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa comprende
- 60 (a) 180 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 y una secuencia de cadena pesada de la id. de sec. n.º 2;
- (b) histidina 30 mM;
- (c) sorbitol 250 mM; y
- 65 (d) 0,01 % de polisorbato 20; y

la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 6,0.

En algunos ejemplos, la composición farmacéutica acuosa comprende

(a) de 165 a 200 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 y una secuencia de cadena pesada de la id. de sec. n.º 2;

(b) acetato de 25 a 35 mM;

(c) sorbitol de 170 a 253 mM; y

(d) de 0,008 a 0,012 % de polisorbato 80; y la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 4,5 a 6,5.

En un ejemplo, la composición farmacéutica acuosa comprende

(a) 190 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que tiene una secuencia de cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 y una secuencia de cadena pesada de la id. de sec. n.º 2;

(b) acetato 30 mM;

(c) sorbitol 220 mM; y

(d) 0,01 % de polisorbato 80; y

donde la composición farmacéutica acuosa tiene un pH de 5,5.

A continuación se describen aspectos específicos.

Aspecto 1: Una composición farmacéutica acuosa que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 (*Very Late Antigen-1*) a una concentración superior a aproximadamente 100 mg/ml.

Aspecto 2: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde dicho anticuerpo anti-VLA-1 es un anticuerpo monoclonal.

Aspecto 3: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde dicho anticuerpo anti-VLA-1 es un anticuerpo injertado en CDR.

Aspecto 4: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde dicho anticuerpo anti-VLA-1 es un anticuerpo humanizado.

Aspecto 5: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde dicho anticuerpo anti-VLA-1 comprende una cadena ligera que es al menos idéntica en un 80 % a la cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que es idéntica en al menos un 80 % a la cadena pesada de la id. de sec. n.º 2.

Aspecto 6: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde dicho anticuerpo anti-VLA-1 comprende una cadena ligera que tiene no más de 5 diferencias de aminoácidos con respecto a la cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene no más de 5 diferencias de aminoácidos con respecto a la cadena pesada de la id. de sec. n.º 2.

Aspecto 7: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde dicho anticuerpo anti-VLA-1 comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2.

Aspecto 8: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde dicha concentración de anticuerpos es al menos aproximadamente 160 mg/ml, al menos aproximadamente 170 mg/ml, al menos aproximadamente 180 mg/ml, al menos aproximadamente 190 mg/ml, o al menos aproximadamente 200 mg/ml.

Aspecto 9: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde dicha concentración de anticuerpos es inferior a aproximadamente 200 mg/ml, inferior a aproximadamente 205 mg/ml, inferior a aproximadamente 210 mg/ml, inferior a aproximadamente 215 mg/ml, inferior a aproximadamente 220 mg/ml o inferior a aproximadamente 225 mg/ml.

Aspecto 10: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde dicho anticuerpo está a una concentración de aproximadamente 155 mg/ml a aproximadamente 165 mg/ml, de aproximadamente 165 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml, de aproximadamente 175 mg/ml a aproximadamente 185 mg/ml, de aproximadamente 185 mg/ml a aproximadamente 195 mg/ml, de aproximadamente 195 mg/ml a aproximadamente 205 mg/ml, de aproximadamente 205 mg/ml a aproximadamente 215 mg/ml o de aproximadamente 215 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml.

- Aspecto 11: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde dicho anticuerpo está a una concentración de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml.
- 5 Aspecto 12: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la formulación es estable durante al menos 6 meses, al menos un año, al menos dos años o al menos tres años.
- Aspecto 13: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde al cabo de 6 meses, un año, dos años, o tres años, menos de aproximadamente 1 %, menos de aproximadamente 2 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 10 %, o menos de aproximadamente 15 % del anticuerpo en la formulación ha experimentado agregación.
- 10 Aspecto 14: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 13, donde la agregación se determina por dispersión de luz dinámica.
- 15 Aspecto 15: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde al cabo de 6 meses, un año, dos años, o tres años, menos de aproximadamente 1 %, menos de aproximadamente 2 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 10 %, o menos de aproximadamente 15 % del anticuerpo en la formulación ha experimentado fragmentación.
- 20 Aspecto 16: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 15, donde la fragmentación se determina por dispersión de luz dinámica.
- Aspecto 17: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde al cabo de 6 meses, un año, dos años, o tres años, menos de aproximadamente 1 %, menos de aproximadamente 2 %, menos de aproximadamente 5 %, menos de aproximadamente 10 %, o menos de aproximadamente 15 % del anticuerpo en la formulación ha experimentado desamidación.
- 25 Aspecto 18: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 17, donde la desamidación se determina mediante la pérdida de proteínas medida por espectroscopía.
- 30 Aspecto 19: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde, cuando se almacena en un recipiente cerrado, a 4 °C, durante un período de tiempo previamente seleccionado, dicho anticuerpo anti-VLA-1 presenta un nivel de agregación inferior al previamente seleccionado.
- 35 Aspecto 20: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 19, donde dicho nivel previamente seleccionado es inferior a un valor de referencia previamente seleccionado para el nivel de agregación.
- Aspecto 21: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 19, donde dicho nivel previamente seleccionado es inferior a 35 %.
- 40 Aspecto 22: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 19, donde dicho período previamente seleccionado es de 30 días, 60 días, 90 días, 180 días, 1 año, 1,5 años, 2 años, 2,5 años o 3 años.
- 45 Aspecto 23: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 19, donde la agregación se determina mediante DLS.
- Aspecto 24: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde, cuando se somete a un número previamente seleccionado de ciclos de congelación/descongelación, dicho anticuerpo anti-VLA-1 presenta un nivel de pérdida de proteína inferior al nivel previamente seleccionado.
- 50 Aspecto 25: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 24, donde dicho nivel previamente seleccionado es inferior a un valor de referencia previamente seleccionado de 35 %.
- Aspecto 26: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 25, donde dicho nivel previamente seleccionado es inferior a 10 % de pérdida de proteína.
- 55 Aspecto 27: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 24, donde dicho número previamente seleccionado de ciclos de congelación/descongelación es 3, 4, 5, 6, 7 u 8.
- 60 Aspecto 28: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 24, donde dicho número previamente seleccionado de ciclos de congelación/descongelación es 5.
- Aspecto 29: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 24, donde un ciclo de congelación/descongelación comprende incubación a -80 °C durante 2 horas seguido de descongelación a 20 °C hasta fusión.
- 65 Aspecto 30: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 24, donde la pérdida de proteína se determina mediante espectroscopía

- 5 Aspecto 31: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde, cuando se almacena en un recipiente cerrado a 4 °C, y se expone a 1,2 lux horas de luz blanca y a 200 W/m² de energía UV, dicho anticuerpo anti-VLA-1 presenta un nivel de pérdida de proteína inferior a un nivel previamente seleccionado.
- Aspecto 32: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde, cuando se somete a agitación a 650 rpm, durante un período de tiempo previamente seleccionado a temperatura ambiente, dicha composición presenta un nivel de pérdida de proteína inferior a un nivel previamente seleccionado.
- 10 Aspecto 33: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 32, donde dicho nivel previamente seleccionado es inferior a 5 %.
- Aspecto 34: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 32, donde dicho período de tiempo previamente seleccionado es de 24 horas, 48 horas, 72 horas o 96 horas.
- 15 Aspecto 35: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 32, donde dicho período de tiempo previamente seleccionado es de 72 horas.
- Aspecto 36: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 32, donde la pérdida de proteína se determina mediante espectroscopía.
- 20 Aspecto 37: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde, cuando se somete a un nivel previamente seleccionado de estrés oxidativo, dicha composición presenta un nivel de pérdida de proteína previamente seleccionado.
- 25 Aspecto 38: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 37, donde dicho nivel previamente seleccionado es inferior a 35 %.
- Aspecto 39: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 37, donde dicho nivel previamente seleccionado de estrés oxidativo se proporciona mediante la presencia de peróxido de hidrógeno a una concentración final de 0,04 % (v/v) con incubación a 37 °C, durante un período de tiempo previamente seleccionado.
- 30 Aspecto 40: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 39, donde dicho período de tiempo previamente seleccionado es de 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas o 6 horas.
- 35 Aspecto 41: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 39, donde dicho período de tiempo previamente seleccionado es de 4 horas.
- Aspecto 42: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 39, donde la pérdida de proteína se determina mediante espectroscopía.
- 40 Aspecto 43: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que tiene una capacidad de aplicación con jeringa adecuada para la autoadministración por parte del paciente en un sitio subcutáneo.
- 45 Aspecto 44: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, cuando se dispone en una jeringa adecuada para el suministro subcutáneo a un paciente, se puede expulsar y, de este modo, inyectar en un sitio subcutáneo del paciente, con una fuerza del émbolo igual o inferior a 4 libras.
- Aspecto 45: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, en una forma adecuada para la autoadministración por parte del paciente.
- 50 Aspecto 46: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 44, donde dicha presión permitirá el suministro de una dosificación unitaria en 10 segundos o menos.
- 55 Aspecto 47: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde, cuando se dispone en una jeringa de 1 ml que tiene una aguja de calibre previamente seleccionado, se puede expulsar a una velocidad previamente seleccionada con una fuerza del émbolo no superior a una cantidad previamente seleccionada.
- Aspecto 48: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende, además, un
- 60 Aspecto 49: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende, además, uno o más de histidina, acetato, succinato o fosfato.
- Aspecto 50: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende, además, uno o más de histidina o acetato.
- 65 Aspecto 51: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende, además, histidina.

- Aspecto 52: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 51, donde dicha histidina está a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM.
- 5 Aspecto 53: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 51, donde dicha histidina está a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM.
- Aspecto 54: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 51, donde dicha histidina está a una concentración de aproximadamente 30 mM.
- 10 Aspecto 55: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende, además, acetato.
- Aspecto 56: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 55, donde dicho acetato está a una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 50 mM.
- 15 Aspecto 57: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 55, donde dicho acetato está a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM.
- Aspecto 58: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 55, donde dicho acetato está a una concentración de aproximadamente 30 mM.
- 20 Aspecto 59: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende, además, un excipiente.
- Aspecto 60: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 59, donde dicho excipiente se selecciona de sorbitol, cloruro de sodio, sacarosa, trehalosa, y manitol.
- 25 Aspecto 61: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 60, donde dicho sorbitol está a una concentración de aproximadamente 180 mM a aproximadamente 300 mM.
- Aspecto 62: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 60, donde dicho sorbitol está a una concentración de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 270 mM.
- 30 Aspecto 63: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 60, donde dicho sorbitol está a una concentración de aproximadamente 200 mM a aproximadamente 240 mM.
- 35 Aspecto 64: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 60, donde dicho sorbitol está a una concentración de aproximadamente 230 mM a aproximadamente 270 mM.
- Aspecto 65: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 60, donde dicho sorbitol está a una concentración de aproximadamente 230 mM a aproximadamente 270 mM.
- 40 Aspecto 66: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 60, donde dicho sorbitol está a una concentración de aproximadamente 240 mM a aproximadamente 260 mM.
- Aspecto 67: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 60, donde dicho cloruro de sodio está a una concentración de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 200 mM.
- 45 Aspecto 68: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 60, donde dicha sacarosa está a una concentración de aproximadamente 230 mM a aproximadamente 270 mM.
- 50 Aspecto 69: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 60, donde dicha trehalosa está a una concentración de aproximadamente 230 mM a aproximadamente 270 mM.
- Aspecto 70: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 60, donde dicho manitol está a una concentración de aproximadamente 230 mM a aproximadamente 270 mM.
- 55 Aspecto 71: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la osmolalidad es de aproximadamente 280 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg.
- Aspecto 72: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la osmolalidad es de aproximadamente 455 mOsm/kg.
- 60 Aspecto 73: La composición farmacéutica de cualquiera de los aspectos 1 a 72, que comprende, además, un tensioactivo.
- 65 Aspecto 74: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende, además, un tampón y un tensioactivo.

ES 2 732 243 T3

- Aspecto 75: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 74, donde el tensioactivo es polisorbato 20 o polisorbato 80.
- Aspecto 76: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende, además, polisorbato 80.
- 5 Aspecto 77: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende, además, polisorbato 20.
- Aspecto 78: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 74, 75, 76 o 77, donde la concentración de tensioactivo es de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,1 %.
- 10 Aspecto 79: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 74, 75, 76 o 77, donde la concentración de tensioactivo es de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %.
- Aspecto 80: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 74, 75, 76 o 77, donde la concentración de tensioactivo es de aproximadamente 0,01 %.
- 15 Aspecto 81: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición tiene un pH de 5 a 7.
- Aspecto 82: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición tiene un pH de 5 a 6.
- 20 Aspecto 83: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición tiene un pH de 5,5 a 6,5.
- Aspecto 84: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición tiene un pH de 5,5.
- Aspecto 85: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición tiene un pH de 6.
- 25 Aspecto 86: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición tiene un pH de 6,5.
- Aspecto 87: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición tiene un pH de 7,0.
- 30 Aspecto 88: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que tiene una viscosidad adecuada para el suministro subcutáneo con una jeringa.
- Aspecto 89: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición tiene una viscosidad de menos de 21 cP.
- 35 Aspecto 90: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición tiene una viscosidad de menos de 18 cP.
- Aspecto 91: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición tiene una viscosidad de menos de 15 cP.
- 40 Aspecto 92: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición tiene una viscosidad de menos de 14 cP.
- 45 Aspecto 93: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición tiene una viscosidad de 10 cP a 14 cP.
- Aspecto 94: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición tiene una viscosidad de 10 cP a 13 cP.
- 50 Aspecto 95: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende, además, un tampón, un excipiente y un tensioactivo.
- Aspecto 96: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende, además, un tampón, donde el tampón es histidina, acetato, succinato o fosfato.
- 55 Aspecto 97: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende, además, un excipiente, donde el excipiente es sorbitol, cloruro de sodio, sacarosa, trehalosa o manitol.
- 60 Aspecto 98: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende, además, un tensioactivo, donde el tensioactivo es polisorbato 20 o polisorbato 80.
- Aspecto 99: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende acetato, sorbitol y polisorbato 80.
- 65 Aspecto 100: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde dicho acetato está a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, dicho sorbitol está a una concentración de aproximadamente

ES 2 732 243 T3

200 mM a aproximadamente 300 mM, dicho polisorbato 80 está en una concentración de aproximadamente 0,0055 % a aproximadamente 0,05 %, y tiene un pH de 4,5 a 5,5.

- 5 Aspecto 101: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 100, donde el pH es de 4,5.
- Aspecto 102: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 100, donde el pH es de 5.
- Aspecto 103: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 100, donde el pH es de 5,5.
- 10 Aspecto 104: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde dicho acetato está a una concentración de aproximadamente 30 mM, dicho sorbitol está a una concentración de aproximadamente 250 mM, y dicho polisorbato 80 está en una concentración de aproximadamente 0,01 % y que tiene un pH de 5,5.
- 15 Aspecto 105: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende histidina, sorbitol y polisorbato 80 o polisorbato 20.
- Aspecto 106: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende acetato, cloruro de sodio y polisorbato 80 o polisorbato 20.
- 20 Aspecto 107: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, que comprende histidina, cloruro de sodio y polisorbato 80 o polisorbato 20.
- 25 Aspecto 108: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde dicha histidina está a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, dicho sorbitol está a una concentración de aproximadamente 230 mM a aproximadamente 270 mM y dicho polisorbato 20 está a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %, y que tiene un pH de 6 a 7.
- 30 Aspecto 109: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 108, donde el pH es de 6. Aspecto 110: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 108, donde el pH es de 6,5.
- Aspecto 111: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 108, donde el pH es de 7.
- 35 Aspecto 112: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde dicha histidina está a una concentración de aproximadamente 30 mM, dicho sorbitol está a una concentración de aproximadamente 250 mM, dicho polisorbato 20 está en una concentración de aproximadamente 0,01 % y que tiene un pH de 6,0.
- Aspecto 113: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición es adecuada para su administración subcutánea.
- 40 Aspecto 114: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición es adecuada para el tratamiento de la artritis, la inflamación intestinal, el lupus, rechazo de trasplantes o soriasis.
- 45 Aspecto 115: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición es adecuada para el tratamiento de la artritis.
- 50 Aspecto 116: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición es adecuada para el tratamiento de la artritis reumatoide.
- Aspecto 117: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición es adecuada para una inflamación intestinal.
- Aspecto 118: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición se dispone en una jeringa.
- 55 Aspecto 119: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición es adecuada para su administración por parte de un profesional sanitario.
- Aspecto 120: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición es adecuada para su autoadministración por parte del paciente.
- 60 Aspecto 121: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición no comprende arginina, ni citrato.
- Aspecto 122: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición está sustancialmente exenta de arginina.
- 65 Aspecto 123: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición no comprende arginina.

- Aspecto 124: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición comprende menos de citrato 20 mM.
- 5 Aspecto 125: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición está sustancialmente exenta de citrato.
- Aspecto 126: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 1, donde la composición no comprende citrato.
- 10 Aspecto 127: Una composición farmacéutica acuosa que comprende:
un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2;
- 15 acetato a una concentración de 10 mM a 50 mM;
sorbitol a una concentración de 180 mM a 300 mM; polisorbato 80 a una concentración de 0,005 % a 0,05 %; y
que tiene un pH de 4,5 a 6,0.
- 20 Aspecto 128: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde dicha concentración de anticuerpo es al menos aproximadamente 160 mg/ml, al menos aproximadamente 165 mg/ml, al menos aproximadamente 175 mg/ml, al menos aproximadamente 180 mg/ml, al menos aproximadamente 190 mg/ml, o al menos aproximadamente 200 mg/ml.
- 25 Aspecto 129: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde, dicho anticuerpo está a una concentración de aproximadamente 155 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, o de aproximadamente 170 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml.
- 30 Aspecto 130: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde dicha concentración de dicho anticuerpo es de aproximadamente 180 mg/ml.
- 35 Aspecto 131: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde dicho acetato está a una concentración de 20 mM a 40 mM.
- Aspecto 132: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde dicho acetato está a una concentración de aproximadamente 30 mM.
- 40 Aspecto 133: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde dicho sorbitol está a una concentración de 200 mM a 300 mM.
- 45 Aspecto 134: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde dicho sorbitol está a una concentración de 200 mM a 275 mM.
- Aspecto 135: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde dicho sorbitol está a una concentración de 225 mM a 275 mM.
- 50 Aspecto 136: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde dicho sorbitol está a una concentración de aproximadamente 250 mM.
- Aspecto 137: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde dicho polisorbato 80 está a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %.
- 55 Aspecto 138: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde dicho polisorbato 80 está a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,05 %.
- Aspecto 139: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde dicho polisorbato 80 está a una concentración de aproximadamente 0,01 %.
- 60 Aspecto 140: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, que tiene un pH de 5,5.
- 65 Aspecto 141: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde la osmolalidad es de aproximadamente 280 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg.
- Aspecto 142: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2 a una concentración de aproximadamente 170 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml,

acetato a una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 35 mM,

sorbitol a una concentración de aproximadamente 210 mM a 250 mM, y

5 polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,02 %, a pH 5,5.

Aspecto 143: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, que comprende:

10 un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2 a una concentración de 185 a 195 mg/ml; acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM;

sorbitol a una concentración de aproximadamente 250 mM;

15 polisorbato 80 a aproximadamente 0,01 %; y

que tiene un pH de aproximadamente 5,5.

20 Aspecto 144: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde dicho anticuerpo está a aproximadamente 190 mg/ml.

Aspecto 145: Una composición farmacéutica acuosa que comprende:

25 un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2;

histidina a una concentración de 10 mM a 50 mM;

30 sorbitol a una concentración de 180 mM a 300 mM;

polisorbato 20 o polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %; y

que tiene un pH de 5,5 a 7,0.

35 Aspecto 146: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, que comprende:

un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2 a una concentración de 185 a 195 mg/ml;

40 histidina a una concentración de aproximadamente 30 mM;

sorbitol a una concentración de aproximadamente 250 mM;

45 polisorbato 80 o polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,01 %; y

que tiene un pH de aproximadamente 5,5.

50 Aspecto 147: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, que comprende polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %.

Aspecto 148: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, que comprende polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %.

55 Aspecto 149: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, donde dicha concentración de anticuerpo es de al menos aproximadamente 160 mg/ml, al menos aproximadamente 165 mg/ml, al menos aproximadamente 175 mg/ml, al menos aproximadamente 180 mg/ml, al menos aproximadamente 190 mg/ml, o al menos aproximadamente 200 mg/ml.

60 Aspecto 150: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, donde, dicho anticuerpo está a una concentración de aproximadamente 155 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, o de aproximadamente 170 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml.

Aspecto 151: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, donde dicha concentración de anticuerpo es de aproximadamente 180 mg/ml.

ES 2 732 243 T3

- Aspecto 152: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2 a una concentración de 185 mg/ml a 195 mg/ml,
- 5 acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM;
- cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 150 mM; polisorbato 80 o polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,01 %; y que tiene un pH de aproximadamente 5 a 7.
- 10 Aspecto 153: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 127, donde dicha concentración de anticuerpo es de al menos aproximadamente 160 mg/ml, al menos aproximadamente 165 mg/ml, al menos aproximadamente 175 mg/ml, al menos aproximadamente 180 mg/ml, al menos aproximadamente 190 mg/ml, o al menos aproximadamente 200 mg/ml.
- Aspecto 154: Una composición farmacéutica acuosa que comprende: un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2;
- 15 histidina a una concentración de aproximadamente 30 mM;
- 20 cloruro de sodio a una concentración de aproximadamente 150 mM;
- polisorbato 20 o polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente 0,01 %; y
- que tiene un pH de aproximadamente 5 a 7.
- 25 Aspecto 155: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 154, donde dicha concentración de anticuerpo es de al menos aproximadamente 160 mg/ml, al menos aproximadamente 165 mg/ml, al menos aproximadamente 175 mg/ml, al menos aproximadamente 180 mg/ml, al menos aproximadamente 190 mg/ml, o al menos aproximadamente 200 mg/ml.
- 30 Aspecto 156: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, donde dicha histidina está a una concentración de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM.
- Aspecto 157: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, donde dicha histidina está a una concentración de aproximadamente 30 mM.
- 35 Aspecto 158: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, donde dicho sorbitol está a una concentración de aproximadamente 220 mM a aproximadamente 280 mM.
- Aspecto 159: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, donde dicho sorbitol está a una concentración de aproximadamente 240 mM a aproximadamente 260 mM.
- 40 Aspecto 160: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, donde dicho sorbitol está a una concentración de aproximadamente 250 mM.
- 45 Aspecto 161: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, donde dicho polisorbato 20 está a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %.
- Aspecto 162: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, donde dicho polisorbato 20 está a una concentración de aproximadamente 0,01 %.
- 50 Aspecto 163: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, que tiene un pH de 6,0.
- Aspecto 164: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, donde la osmolalidad es de aproximadamente 280 mOsm/kg a aproximadamente 350 mOsm/kg.
- 55 Aspecto 165: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2 a una concentración de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml,
- 60 histidina a una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 35 mM;
- sorbitol a una concentración de aproximadamente 240 mM a 260 mM, y
- polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,02 % a pH 6.
- 65 Aspecto 166: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, que comprende:

un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2 a una concentración de 170 a 180 mg/ml;

5 histidina a una concentración de aproximadamente 30 mM;

sorbitol a una concentración de aproximadamente 250 mM;

10 polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0,01 %; y

que tiene un pH de aproximadamente 6.

Aspecto 167: La composición farmacéutica acuosa del aspecto 145, donde dicho anticuerpo está a una concentración de aproximadamente 180 mg/ml.

15 Aspecto 168: Una forma farmacéutica unitaria de una composición farmacéutica acuosa de cualquiera de los aspectos 1, 127, 142, 143, 145, 166 o 167.

20 Aspecto 169: La forma farmacéutica unitaria del aspecto 168, que comprende al menos aproximadamente 160 mg de dicho anticuerpo, al menos aproximadamente 170 mg de dicho anticuerpo, al menos aproximadamente 180 mg de dicho anticuerpo, al menos aproximadamente 190 mg de dicho anticuerpo, o al menos aproximadamente 200 mg de dicho anticuerpo.

25 Aspecto 170: La forma farmacéutica unitaria del aspecto 168, que comprende dicho anticuerpo a una concentración de aproximadamente 155 mg/ml a aproximadamente 165 mg/ml, de aproximadamente 165 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml, de aproximadamente 175 mg/ml a aproximadamente 185 mg/ml, de aproximadamente 185 mg/ml a aproximadamente 195 mg/ml, de aproximadamente 195 mg/ml a aproximadamente 205 mg/ml, de aproximadamente 205 mg/ml a aproximadamente 215 mg/ml o de aproximadamente 215 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml.

30 Aspecto 171: La forma farmacéutica unitaria del aspecto 168, que comprende dicho anticuerpo a un nivel de aproximadamente 160 mg a aproximadamente 210 mg.

Aspecto 172: La forma farmacéutica unitaria del aspecto 168, que comprende aproximadamente 180 mg de dicho anticuerpo.

35 Aspecto 173: La forma farmacéutica unitaria del aspecto 168, que comprende aproximadamente 190 mg de dicho anticuerpo.

40 Aspecto 174: La forma farmacéutica unitaria de aspecto 168, que, cuando se administra a un ser humano suministrará de aproximadamente 2,0 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 4,0 mg por kg de peso corporal al ser humano.

Aspecto 175: La forma farmacéutica unitaria del aspecto 168, que tiene un volumen de aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 1,5 ml.

45 Aspecto 176: La forma farmacéutica unitaria del aspecto 168, que tiene un volumen de aproximadamente 1 ml.

Aspecto 177: Un kit que comprende la forma farmacéutica unitaria del aspecto 168.

50 Aspecto 178: Una pluralidad de formas farmacéuticas unitarias de una composición farmacéutica acuosa de cualquiera de los aspectos 1, 127, 142, 143, 145, 166 o 167.

Aspecto 179: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 178, donde dicha pluralidad es dos.

55 Aspecto 180: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 179, donde dichas formas de dosificación, en conjunto, comprenden al menos aproximadamente 160 mg de dicho anticuerpo, al menos aproximadamente 170 mg de dicho anticuerpo, al menos aproximadamente 180 mg de dicho anticuerpo, al menos aproximadamente 190 mg de dicho anticuerpo, o al menos aproximadamente 200 mg de dicho anticuerpo.

60 Aspecto 181: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 178, donde cada forma de dosificación contiene una misma cantidad de anticuerpo.

65 Aspecto 182: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 179, donde dichas formas de dosificación, en conjunto, comprenden dicho anticuerpo a una concentración de aproximadamente 155 mg/ml a aproximadamente 165 mg/ml, de aproximadamente 165 mg/ml a aproximadamente 175 mg/ml, de aproximadamente 175 mg/ml a aproximadamente 185 mg/ml, de aproximadamente 185 mg/ml a aproximadamente 195 mg/ml, de aproximadamente

ES 2 732 243 T3

195 mg/ml a aproximadamente 205 mg/ml, de aproximadamente 205 mg/ml a aproximadamente 215 mg/ml o de aproximadamente 215 mg/ml a aproximadamente 225 mg/ml.

5 Aspecto 183: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 182, donde cada forma de dosificación contiene una misma cantidad de anticuerpo.

Aspecto 184: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 179, donde dichas formas de dosificación, en conjunto, comprenden dicho anticuerpo en aproximadamente 160 mg a aproximadamente 210 mg.

10 Aspecto 185: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 184, donde cada forma de dosificación contiene una misma cantidad de anticuerpo.

Aspecto 186: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 179, donde dichas formas de dosificación, en conjunto, comprenden aproximadamente 180 mg de dicho anticuerpo.

15 Aspecto 187: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 186, donde cada forma de dosificación contiene una misma cantidad de anticuerpo.

20 Aspecto 188: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 179, donde dichas formas de dosificación, en conjunto, comprenden aproximadamente 190 mg de dicho anticuerpo.

Aspecto 189: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 188, donde cada forma de dosificación contiene una misma cantidad de anticuerpo.

25 Aspecto 190: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 179, donde dichas formas de dosificación, en conjunto, cuando se administran a un ser humano suministrarán aproximadamente 2 mg y aproximadamente 4 mg de anticuerpo por kg de peso corporal al ser humano.

30 Aspecto 191: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 190, donde cada forma de dosificación contiene una misma cantidad de anticuerpo.

Aspecto 192: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 179, donde dichas formas de dosificación tienen cada una un volumen de aproximadamente 0,25 ml a aproximadamente 1,5 ml.

35 Aspecto 193: La pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 178, donde dichas formas de dosificación tienen cada una un volumen de aproximadamente 1 ml.

Aspecto 194: Un kit que comprende la pluralidad de formas farmacéuticas unitarias del aspecto 178.

40 Aspecto 195: Un recipiente, que tiene dispuesto en él una composición farmacéutica acuosa de cualquiera de los aspectos 1, 127, 142, 143, 145, 166 o 167.

Aspecto 196: El recipiente del aspecto 195, que tiene dispuesto en él, una formulación de dosificación unitaria de cualquiera de los aspectos 127 o 145.

45 Aspecto 197: El recipiente del aspecto 195, donde dicho recipiente es un dispositivo de suministro.

Aspecto 198: El recipiente del aspecto 195, donde dicho recipiente es adecuado para su administración subcutánea.

50 Aspecto 199: El recipiente del aspecto 195, donde dicho recipiente es una jeringa.

Aspecto 200: Un método de administración de una composición farmacéutica acuosa de los aspectos 1, 127 o 145 a un paciente, que comprende uno o ambos de:

55 i) activar un dispositivo de suministro; y

ii) administrar dicho anticuerpo dispuesto en dicho dispositivo de suministro a dicho paciente, para administrar de este modo dicha composición.

60 Aspecto 201: El método del aspecto 200, donde la activación comprende uno o más de retirar dicho dispositivo del envase, retirar una cubierta de la aguja u orificio de dicho dispositivo, o agitar dicho dispositivo.

Aspecto 202: El método del aspecto 200, que comprende, además, inspeccionar dicho dispositivo para determinar la presencia de precipitado, material coloreado, o turbidez, u opalescencia.

65 Aspecto 203: El método del aspecto 200, donde dicho paciente realiza una o ambas de las etapas i y ii.

- Aspecto 204: El método de los aspectos 200, donde el paciente tiene un trastorno inflamatorio.
- 5 Aspecto 205: El método del aspecto 200, donde el paciente tiene un trastorno seleccionado del grupo que consiste en artritis, inflamación intestinal, lupus, rechazo de trasplantes y soriasis.
- Aspecto 206: Un método de tratamiento de un paciente que necesita una terapia anti-VLA-1, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de la composición del aspecto 1.
- 10 Aspecto 207: El método del aspecto 206, donde el paciente tiene un trastorno inflamatorio.
- Aspecto 208: El método del aspecto 206, donde el paciente tiene un trastorno seleccionado del grupo que consiste en artritis, inflamación intestinal, lupus, rechazo de trasplantes y soriasis.
- 15 Aspecto 209: El método del aspecto 206, donde la composición se administra como régimen.
- Aspecto 210: El método del aspecto 206, que comprende, además, seleccionar dicho paciente para dicho tratamiento.
- 20 Aspecto 211: El método del aspecto 210, donde el paciente tiene artritis reumatoide, y ha demostrado una respuesta inadecuada a un tratamiento alternativo previo para la artritis reumatoide.
- Aspecto 212: El método del aspecto 210, donde el paciente tiene artritis reumatoide, y se selecciona por haber demostrado una respuesta inadecuada a un tratamiento alternativo previo para la artritis reumatoide.
- 25 Aspecto 213: El método del aspecto 211, donde el tratamiento alternativo previo para la artritis reumatoide es un DMARD (fármaco antireumático modificador de la enfermedad) o un inhibidor de TNF- α (factor de necrosis tumoral- α).
- Aspecto 214: El método del aspecto 213, donde el DMARD es metotrexato, leflunomida, sulfasalazina o hidroxicloroquina.
- 30 Aspecto 215: El método del aspecto 213, donde el inhibidor de TNF- α es infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab o etanercept.
- Aspecto 216: El método de aspecto 206, que comprende, además, administrar al paciente un segundo agente terapéutico, donde el segundo agente terapéutico es un corticosteroide o un antiinflamatorio.
- 35 Aspecto 217: Un método de tratamiento de un paciente que necesita una terapia anti-VLA-1, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de una composición que comprende
- 40 180 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1,
- 40 histidina 30 mM,
- sorbitol 250 mM,
- 45 0,1 % de polisorbato 20, y
- que tiene pH 6.
- 50 Aspecto 218: Un método de tratamiento de un paciente que necesita una terapia anti-VLA-1, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de una composición que comprende
- 180 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1,
- 55 histidina 30 mM,
- 55 cloruro de sodio 150 mM,
- 0,1 % de polisorbato 20, y
- 60 que tiene pH 6.
- Aspecto 219: Un método de tratamiento de un paciente que necesita una terapia anti-VLA-1, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de una composición que comprende
- 65 190 mg/ml de anticuerpo anti-VLA-1,

acetato 30 mM,

sorbitol 250 mM;

5 0,1 % de polisorbato 80, y

que tiene pH 5,5.

10 Aspecto 220: Un método de tratamiento de un paciente que necesita una terapia anti-VLA-1, que comprende administrar a dicho paciente una cantidad eficaz de una composición que comprende

190 mg/ml de anticuerpo anti-VLA-1,

15 acetato 30 mM,

cloruro de sodio 250 mM,

0,1 % de polisorbato 80, y

20 que tiene pH 5,5.

Aspecto 221: Un método de evaluación de un paciente que comprende (i) determinar si el paciente cumple con un criterio previamente seleccionado, y (ii), si el paciente cumple el criterio previamente seleccionado, aprobar, proporcionar, prescribir, o administrar una composición del aspecto 1.

25 Aspecto 222: El método del aspecto 221, donde el paciente tiene artritis reumatoide, y el paciente ha tenido una respuesta inadecuada a un tratamiento alternativo previo para la artritis reumatoide.

30 Aspecto 223: Un método de evaluación de un paciente que comprende (i) determinar si el paciente cumple con un criterio previamente seleccionado, y (ii), si el paciente cumple el criterio previamente seleccionado, aprobar, proporcionar, prescribir, o administrar una composición que comprende

180 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1,

35 histidina 30 mM,

sorbitol 250 mM,

0,1 % de polisorbato 20, y

40 que tiene pH 6.

45 Aspecto 224: Un método de evaluación de un paciente que comprende (i) determinar si el paciente cumple con un criterio previamente seleccionado, y (ii), si el paciente cumple el criterio previamente seleccionado, aprobar, proporcionar, prescribir, o administrar una composición que comprende

180 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1,

50 histidina 30 mM,

cloruro de sodio 150 mM,

0,1 % de polisorbato 20, y

55 que tiene pH 6.

Aspecto 225: Un método de evaluación de un paciente que comprende (i) determinar si el paciente cumple con un criterio previamente seleccionado, y (ii), si el paciente cumple el criterio previamente seleccionado, aprobar, proporcionar, prescribir, o administrar una composición que comprende

60 190 mg/ml de anticuerpo anti-VLA-1,

acetato 30 mM,

65 sorbitol 250 mM,

- 0,1 % de polisorbato 80, y
que tiene pH 5,5.
- 5 Aspecto 226: Un método de evaluación de un paciente que comprende (i) determinar si el paciente cumple con un criterio previamente seleccionado, y (ii), si el paciente cumple el criterio previamente seleccionado, aprobar, proporcionar, prescribir, o administrar una composición que comprende
- 10 190 mg/ml de anticuerpo anti-VLA-1,
acetato 30 mM,
cloruro de sodio 250 mM,
- 15 0,1 % de polisorbato 80, y
que tiene pH 5,5.
- 20 Aspecto 227: Un método de preparación de una composición acuosa que comprende de 160 mg/ml a 210 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 que comprende, combinar dicho anticuerpo, un tampón, un excipiente, y un tensioactivo en proporción para obtener una composición acuosa estable que comprende de 160 mg/ml a 210 mg/ml de dicho anticuerpo anti-VLA-1.
- 25 Aspecto 228: El método del aspecto 227, donde dicho tampón es histidina.
Aspecto 229: El método del aspecto 227, donde dicho tampón es acetato.
Aspecto 230: El método del aspecto 227, donde dicho tensioactivo es polisorbato 80.
- 30 Aspecto 231: El método del aspecto 227, donde dicho tensioactivo es polisorbato 20.
Aspecto 232: El método del aspecto 227, donde dicho anticuerpo anti-VLA-1 comprende una cadena ligera que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 1 y una cadena pesada que tiene la secuencia de la id. de sec. n.º 2.
- 35 Aspecto 233: El método del aspecto 227, donde la composición comprende una viscosidad de aproximadamente 10 cP a aproximadamente 20 cP.
Aspecto 234: El método del aspecto 227, donde la composición comprende una viscosidad de aproximadamente 10 cP a aproximadamente 15 cP.
- 40 Aspecto 235: El método del aspecto 227, donde la composición comprende una viscosidad de aproximadamente 10 cP a aproximadamente 14 cP.
Aspecto 236: El método del aspecto 227, donde dicha composición es la composición del aspecto 1.
- 45 Aspecto 237: El método del aspecto 227, donde dicha composición comprende
- 50 180 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1,
histidina 30 mM,
sorbitol 250 mM,
- 55 0,1 % de polisorbato 20, y
que tiene pH 6.
- 60 Aspecto 238: El método del aspecto 227, donde dicha composición comprende
- 65 180 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1,
histidina 30 mM,
cloruro de sodio 150 mM,
0,1 % de polisorbato 20, y

que tiene pH 6.

5 Aspecto 239: El método de aspecto 227, donde dicha composición comprende 190 mg/ml de anticuerpo anti-VLA-1, acetato 30 mM,

sorbitol 250 mM,

10 0,1 % de polisorbato 80, y

que tiene pH 5,5.

15 Aspecto 240: El método de aspecto 227, donde dicha composición comprende 190 mg/ml de anticuerpo anti-VLA-1, acetato 30 mM,

cloruro de sodio 250 mM,

20 0,1 % de polisorbato 80, y

que tiene pH 5,5.

Aspecto 241: Un método de evaluación de la calidad de una composición del aspecto 1, que comprende:

25 evaluar la composición para determinar un parámetro previamente seleccionado, y

determinar si dicho valor satisface un criterio previamente seleccionado,

30 evaluar de este modo la calidad de una composición.

Aspecto 242: El método del aspecto 241, donde, además, en respuesta a dicha evaluación, dicha composición es: clasificada, seleccionada, aceptada o descartada, liberada o mantenida, procesada a modo de producto farmacológico, transportada, desplazada a una ubicación diferente, formulada, etiquetada, envasada, introducida en el mercado o vendida o puesta a la venta.

Aspecto 243: El método del aspecto 241, donde dicho parámetro previamente seleccionado se selecciona de agregación, estabilidad, color, transparencia, viscosidad o fuerza del émbolo.

40 Aspecto 244: El método del aspecto 241, donde la composición evaluada se proporciona como una forma farmacéutica unitaria.

Aspecto 245: Una composición farmacéutica acuosa que comprende:

45 (i) un anticuerpo anti-VLA-1 en una cantidad eficaz para el tratamiento de la enfermedad inflamatoria; y

(ii) un medio de suministro de dicha cantidad eficaz de dicho anticuerpo anti-VLA-1 en una formulación subcutánea.

50 Los detalles de una o más realizaciones de la invención se exponen en las reivindicaciones adjuntas. Otras características, objetos, y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la descripción y los dibujos.

Descripción de los dibujos

55 Las figuras 1A a 1D, es el ADNc (id. de sec. n.º 6) y secuencia de aminoácidos de VLA-1 humano (ref. de sec. n.º NP_852478; id. de sec. n.º 3). El dominio I aparece subrayado (véase las figuras 1A y 1B).

Las figuras 2A y 2B son los fragmentos de secuencia de un polipéptido de cadena ligera (id. de sec. n.º 4) y un polipéptido de cadena pesada (id. de sec. n.º 5), respectivamente, para un anticuerpo anti-VLA-1. Estos fragmentos de secuencias incluyen los CDR de cadena ligera y cadena pesada, respectivamente.

60 La figura 3 es la secuencia del polipéptido de cadena ligera (id. de sec. n.º 1) de SAN-300. La figura 4 es la secuencia del polipéptido de cadena pesada (id. de sec. n.º 2) de SAN-300.

65 La figura 5 muestra gráficas superpuestas de cromatograma representativas para formulaciones de SAN-300 de alta concentración. El panel superior muestra NB1206p86A (línea continua) y NB1206p86B (línea discontinua) en

el momento inicial. El panel inferior muestra NB1206p86A (línea continua) y NB1206p86B (línea discontinua) al cabo de 12 meses a 2-8 °C.

La figura 6 muestra gráficas superpuestas de cromatograma de SEC representativas para muestras de NB1206p86B de alta concentración. En el panel superior se proporcionan muestras de NB1206p86B a los 6 meses. Las muestras se conservaron a -75 °C, 2-8 °C, se invirtieron a 2-8 °C, 30 °C, y 40 °C. En el panel inferior se proporcionan muestras de NB1206p86B a los 12 meses. Las muestras se conservaron a -75 °C, 2-8 °C, se invirtieron a 2-8 °C y 30 °C.

Descripción detallada

En la presente memoria se proporcionan formulaciones estables de un anticuerpo anti-VLA-1 especialmente adecuado para la administración subcutánea (SC). Las formulaciones presentadas en la descripción contienen de aproximadamente ≥ 100 a aproximadamente 225 mg/ml de anticuerpo anti-VLA-1 humanizado, tal como SAN-300.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones descritas en la presente memoria se formulan como composiciones farmacéuticas. Se puede proporcionar un anticuerpo anti-VLA-1, tal como SAN-300, por ejemplo, en una solución tamponada a una concentración de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, por ejemplo, de aproximadamente 160 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, de aproximadamente 170 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml; por ejemplo, aproximadamente 165 mg/ml, aproximadamente 170 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 185 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, aproximadamente 195 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 205 mg/ml. En un ejemplo, el anticuerpo anti-VLA-1, tal como SAN-300, se proporciona en una solución tamponada a una concentración superior a aproximadamente 100 mg/ml e inferior a aproximadamente 225 mg/ml. En otro ejemplo, la formulación se prepara a una concentración superior, por ejemplo, de aproximadamente 200 mg/ml a aproximadamente 210 mg/ml, y a continuación se diluye de nuevo hasta la concentración deseada, tal como a aproximadamente 180 mg/ml a aproximadamente 190 mg/ml. En un ejemplo, la formulación se administra a la concentración de disolución madre (por ejemplo, a aproximadamente 110 mg/ml, aproximadamente 120 mg/ml, aproximadamente 130 mg/ml, aproximadamente 140 mg/ml, aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 160 mg/ml, aproximadamente 165 mg/ml, aproximadamente 170 mg/ml, aproximadamente 175 mg/ml, aproximadamente 180 mg/ml, aproximadamente 185 mg/ml, aproximadamente 190 mg/ml, aproximadamente 195 mg/ml, aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 205 mg/ml, aproximadamente 210 mg/ml).

La composición puede almacenarse a una temperatura adecuada, tal como a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, por ejemplo, a aproximadamente 4 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 6 °C o aproximadamente 7 °C.

En un ejemplo, el anticuerpo anti-VLA-1 puede formularse con un excipiente tal como sorbitol o NaCl, un tampón de histidina y un tensioactivo, tal como polisorbato 20 o polisorbato 80.

Los tampones de acetato son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas de acetato de sodio, tampón de acetato de trietilamonio, y tampón tris-acetato-EDTA, llevado al pH adecuado.

Los tampones de histidina también son conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, soluciones acuosas de D-histidina, monoclóruo de D-histidina monohidratado, DL-histidina, monoclóruo de DL-histidina monohidratado, L-histidina, o monoclóruo de L-histidina monohidratado, llevado al pH adecuado con ácido clorhídrico o hidróxido de sodio, u otro ácido o base conocido en la técnica.

En un ejemplo, la formulación de anticuerpo anti-VLA-1 puede estar prácticamente exenta de citrato. En otro ejemplo, la formulación de anticuerpo anti-VLA está prácticamente exenta de arginina.

Una composición farmacéutica también puede incluir disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción, y lo similar, que sean fisiológicamente compatibles. Una formulación "isotónica" tiene una presión osmótica igual, tal como la causada por la misma concentración de soluto dentro y fuera de una célula.

Una "sal farmacéuticamente aceptable" se refiere a una sal que conserva la actividad biológica deseada del anticuerpo y no transmite efectos toxicológicos no deseables (véase, por ejemplo, Berge, S.M., y col. (1977) *J. Pharm. Sci.* 66:1-19). Los ejemplos de estas sales incluyen sales de adición de ácido y sales de adición de base. Las sales de adición de ácido incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como ácidos clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico y lo similar, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos alifáticos monocarboxílicos y dicarboxílicos, ácidos alcanóicos sustituidos con fenilo, ácidos hidroxialcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos, aminoácidos libres y lo similar. Las sales de adición de base incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tal como sodio, potasio, magnesio, calcio y lo similar, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaina, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaina y lo similar.

5 Las formulaciones presentadas en la presente memoria pueden incluir un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como un tensioactivo, tal como polisorbato 80 o polisorbato 20. En un ejemplo, las formulaciones presentadas en la presente memoria incluyen un tensioactivo a una concentración de aproximadamente 0,001 % a aproximadamente 0,8 %, por ejemplo, de aproximadamente 0,005 % a aproximadamente 0,05 %; por ejemplo, de aproximadamente 0,01 % a aproximadamente 0,01 %. Como se utiliza en la presente memoria, la concentración de tensioactivo se proporciona como un porcentaje de peso a volumen (p/v)

10 Las composiciones farmacéuticas que contienen anticuerpos anti-VLA-1 se encuentran en forma de solución líquida, tal como una solución apta para inyección e infusión. Estas composiciones pueden administrarse por vía parenteral, por ejemplo, mediante administración subcutánea. Las formulaciones también son adecuadas para la administración intravenosa (IV), por ejemplo, cuando se diluyen en una matriz de infusión aceptable, tal como una solución salina normal. Las expresiones “administración parenteral” y “administrado por vía parenteral”, como se utilizan en la presente memoria, significan modos de administración diferentes de la administración entérica y tópica, usualmente mediante inyección, e incluyen administración subcutánea, así como mediante inyección e infusión intramuscular, intravenosa, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcuticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. En un ejemplo, las formulaciones descritas en la presente memoria se administran subcutáneamente.

20 Las composiciones farmacéuticas son estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. Una composición farmacéutica también puede probarse para asegurar que cumple las normativas legales e industriales para su administración.

25 Se pueden preparar soluciones inyectables estériles incorporando un anticuerpo anti-VLA-1 descrito en la presente memoria en la cantidad necesaria con una formulación adecuada como se ha descrito anteriormente, seguido de esterilización filtrada.

30 En un ejemplo, la formulación de anticuerpo anti-VLA-1 final se envasa como un líquido en un vial de llenado de 3,0 ml con un volumen mínimo extraíble de 1 ml. Por ejemplo, el vial de llenado puede incluir de aproximadamente 1,1 ml a aproximadamente 1,5 ml (por ejemplo, aproximadamente 1,1 ml, aproximadamente 1,2 ml, aproximadamente 1,3 ml, aproximadamente 1,4 ml) de formulación de anticuerpo. En otro ejemplo, esa formulación de anticuerpo se envasa en una jeringa previamente llenada, en una cantidad tal que se inyecta 1 ml de solución a un paciente durante el uso, y la solución de 1 ml suministra la cantidad deseada de anticuerpo, por ejemplo, \geq de 100 mg de SAN-300 a 225 mg de SAN-300, por ejemplo, 180 mg de SAN-300 o 190 mg de SAN-300.

35 En algunos ejemplos, se caracterizan los parámetros que describen las formulaciones, por ejemplo, los parámetros que pueden aparecer en la etiqueta del producto. Dichos parámetros incluyen, por ejemplo, color (de forma típica de incolora a ligeramente amarilla, o de incolora a amarillo), la transparencia (de forma típica de transparente a ligeramente opalescente, o de transparente a opalescente) y la viscosidad (de forma típica de aproximadamente 5 cP a aproximadamente 30 cP cuando se mide a temperatura ambiente, tal como a una temperatura de aproximadamente 20 °C a aproximadamente 30 °C). Dichos parámetros se pueden medir mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, la transparencia se puede medir usando estándares de opalescencia comercialmente disponibles (comercializados, por ejemplo, por HunterLab Associates, Inc., Reston, VA).

45 En algunos ejemplos, se estudia la estabilidad de las formulaciones de anticuerpos. Los métodos ilustrativos incluyen, por ejemplo, estudios de agregación, estudios de oxidación, estudios de fragmentación, estudios de sialilación, estudios de punto isoeléctrico, estudios de semianticuerpo, estudios de paridad de cadena pesada y ligera, y análisis de estructura secundaria, tal como dicroísmo circular; desnaturalización térmica, tal como dicroísmo circular de calorimetría diferencial de barrido; ambiente de triptófano, tal como por fluorescencia; pliegue de IgG, tal como dicroísmo circular del UV lejano; y un ambiente de residuo aromático, tal como mediante espectroscopía de UV-visible (“UV-Vis”).

SAN-300 y otros anticuerpos anti-VLA-1

55 Los anticuerpos adecuados para una formulación de anticuerpo anti-VLA-1 descrita en la presente memoria incluyen SAN-300, un anticuerpo de unión a integrina $\alpha 1$ humanizado. La secuencia de aminoácidos de la cadena ligera y la cadena pesada de SAN-300 antes de cualquier modificación in vivo (tal como truncamiento de aminoácidos) se muestra en la figura 3 y la figura 4, respectivamente. La secuencia de aminoácidos de los dominios variables de cadena ligera y pesada se muestra en las figuras 2A y 2B, respectivamente.

60 VLA-1 es un receptor principal de colágeno I, colágeno IV y laminina. Se expresa en muchos tipos diferentes de células incluidos las de origen hematopoyético, neuronal y mesenquimal. La integrina VLA-1 desempeña un papel importante en los procesos de inflamación crónica y fibrosis. La cadena α de VLA-1 contiene un dominio I insertado (también conocido como dominio A) que desempeña un papel central en la unión a ligandos. El dominio I de VLA-1 humano está ubicado en aproximadamente los aminoácidos Thr145-Glu336 de VLA-1 (ref. de sec. n.º NP_852478; figuras 1A-1D). El dominio I tiene un pliegue de unión a dinucleótido caracterizado por una lámina β rodeada de hélices α . El dominio I contiene un metal ion-dependent-adhesion site (sitio de adhesión dependiente de ion de metal conservado - MIDAS) que ha sido

identificado como parte del sitio de unión a ligandos. Las cadenas laterales residuales ácidas de un ligando de integrina unido, tal como colágeno, coordina el ion metálico del sitio MIDAS de dominio I. Los estudios de estructura cristalina han indicado que SAN-300 utiliza un ácido aspártico para coordinar el ion metálico del dominio I de VLA-1. SAN-300 inhibe VLA-1 al menos evitando estéricamente la unión del dominio I a colágeno (Karpuses y col., J. Mol. Biol. 327:1031-1041, 2003).

Los anticuerpos anti-VLA-1 pueden bloquear la interacción de los leucocitos proinflamatorios con los componentes de la matriz extracelular que incluyen, aunque no de forma limitativa, colágenos, por ejemplo, colágeno I y IV, laminina y fibronectina. VLA-1 se expresa, por ejemplo, en los linfocitos, y el dominio I de VLA-1 es importante para la unión de linfocitos a proteínas de la matriz extracelular, tales como fibronectina (Fabbri y col., Tissue Antigens 48:47-51, 1996).

SAN-300 se une al dominio I de $\alpha 1$ de VLA-1 (véase, por ejemplo, la patente US-7.358.054). SAN-300 se une además a un dominio $\alpha 1$ -I humano, pero no de rata (id.).

SAN-300 y los anticuerpos anti VLA-1 relacionados se describen, por ejemplo, en la patente US-6.955.810 y la patente US-7.462.353 y la patente US-7.358.054 y la patente US-7.723.073 y la patente US-7.910.099. SAN-300 es una versión humanizada de anticuerpo monoclonal murino AQC2 (véase, por ejemplo, US-6.955.810, y US-7.358.054). Varios anticuerpos monoclonales anti-VLA-1 adicionales incluyen 1B3.1 (Chess y col. US-5.788.966), TS2/7 y FB12 (Fabbri y col., Tissue Antigens 48:47-51, 1996), 5E8D9 (Luque y col., FEBS Letters 346:278-284, 1994), y SR-84 (Rikkonen y col., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209:205-212, 1995).

Algunos anticuerpos anti-VLA-1 reconocen epítomos de la subunidad $\alpha 1$ que participan en la unión a un ligando cognado, tal como colágeno y laminina. Muchos de dichos anticuerpos inhiben la unión de VLA-1 a los ligandos cognados.

Un anticuerpo anti-VLA-1 ilustrativo tiene una o más CDR, por ejemplo, las tres CDR HC y/o las tres CDR LC de un anticuerpo específico descrito en la presente memoria, o las CDR que son, en suma, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 94 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 %, o al menos 99 %, idénticas a dicho anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo SAN-300. En un ejemplo, los bucles hipervariables H1 y H2 tienen la misma estructura canónica que las de un anticuerpo descrito en la presente memoria. En un ejemplo, los bucles hipervariables L1 y L2 tienen la misma estructura canónica que las de un anticuerpo descrito en la presente memoria.

En un ejemplo, la secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable de HC y/o LC es al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos del dominio variable de HC y/o LC de un anticuerpo descrito en la presente memoria, tal como un anticuerpo SAN-300. La secuencia de aminoácidos de la secuencia de dominio variable de HC y/o LC puede diferir en al menos un aminoácido, pero no más de diez, ocho, seis, cinco, cuatro, tres o dos aminoácidos de la secuencia correspondiente de un anticuerpo descrito en la presente memoria, tal como un anticuerpo SAN-300. Por ejemplo, las diferencias pueden estar principalmente o totalmente en las regiones marco.

Las secuencias de aminoácidos de las secuencias de dominio variable HC y LC pueden ser codificadas por una secuencia de ácidos nucleicos que se hibrida en condiciones muy rigurosas a una secuencia de ácidos nucleicos descrita en la presente memoria o una que codifica un dominio variable o una secuencia de aminoácidos descrita en la presente memoria. En un ejemplo, las secuencias de aminoácidos de una o más regiones marco (por ejemplo, FR1, FR2, FR3, y/o FR4) del dominio variable de HC y/o LC son al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 92 %, al menos 95 %, al menos 97 %, al menos 98 %, al menos 99 % o al menos 100 % idénticas a las regiones marco correspondientes de los dominios variables de HC y/o LC de un anticuerpo descrito en la presente memoria. En un ejemplo, una o más regiones marco de cadena pesada o ligera (por ejemplo, HC FR1, FR2 y FR3) son al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 96 %, al menos 97 %, al menos 98 % o al menos 100 % idénticas a la secuencia de regiones marco correspondientes de un anticuerpo de línea germinal humana.

Los anticuerpos adecuados para usar en los métodos descritos en la presente memoria incluyen: anticuerpos que tienen una, dos, o tres CDR de light chain (cadena ligera - LC) y una, dos o tres CDR de heavy chain (cadena pesada - HC), y en un ejemplo las seis CDR, que tienen la secuencia de un anticuerpo descritos en la patente US-7.358.054; anticuerpos donde cada una de las CDR difiere en no más de 1 o 2 aminoácidos con respecto a las CDR de un anticuerpo descrito en la patente US-7.358.054 (los aminoácidos variantes, cuando se usa en este contexto, pueden ser independientemente, o como grupo, cambios conservativos o no conservativos).

En un ejemplo, un anticuerpo anti-VLA-1 útil para los métodos descritos en la presente memoria incluye una región variable de LC, una región variable de HC, o ambas, de un anticuerpo descrito en la patente US-7.358.054; un anticuerpo que se une a un epítomo que se solapa con, o compite por la unión con un anticuerpo descrito en la patente US-7.358.054; un anticuerpo que tiene una región variable de LC, una región variable de HC, o ambas, que tiene al menos 90 %, al menos 95 %, o al menos 99 % de homología de aminoácido con las partes correspondientes de un anticuerpo descrito en la patente US-7.358.054; un anticuerpo que tiene una región variable de LC que difiere en no más de 10 residuos de aminoácidos, 5 residuos de aminoácidos o 1 residuo de aminoácidos, una región variable de HC que difiere en no más

de 10 residuos de aminoácidos, 5 residuos de aminoácidos o 1 residuo de aminoácido, o ambos, con respecto a las partes correspondientes de un anticuerpo descrito en la patente US-7.358.054.

5 En un ejemplo, un anticuerpo anti-VLA-1 útil para los métodos descritos en la presente memoria incluye una región variable de cadena ligera que es la misma o difiere en no más de 10 aminoácidos, 5 aminoácidos, 3 aminoácidos, o 1 aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácidos de id. de sec. n.º 4 (figura 2A), y una región variable de cadena pesada que es la misma o difiere en no más de 10 aminoácidos, 5 aminoácidos, 3 aminoácidos, o 1 aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácidos de id. de sec. n.º 5 (figura 2B).

10 En un ejemplo, un anticuerpo anti-VLA-1 tiene una secuencia de cadena ligera que es la misma o difiere en no más de 10 aminoácidos, 5 aminoácidos, 3 aminoácidos, o 1 aminoácido con respecto a la secuencia de aminoácidos de id. de sec. n.º 1 (figura 3), y una secuencia de cadena pesada que es la misma o difiere en no más de 10 aminoácidos, 5 aminoácidos, 3 aminoácidos, o 1 aminoácido con respecto a la secuencia de id. de sec. n.º 2 (figura 4).

15 Como se describe en la presente memoria, los anticuerpos anti-VLA-1 ilustrativos útiles en los métodos descritos en la presente memoria incluyen los anticuerpos descritos en la patente US-7.358.054. Los anticuerpos descritos en la patente US-7.358.054 incluyen, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal AJH10 (ATCC PTA-3580; depositada el 2 de agosto de 2001 en la colección de cultivos tipo americana, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209), hAQC2 (ATCC PTA-3275; depositada el 18 de abril de 2001), haAQC2 (ATCC PTA-3274; depositada el 18 de abril de 2001), hsAQC2 (ATCC PTA-3356; depositada el 4 de mayo de 2001) y mAQC2 (ATCC PTA-3273). Todos estos anticuerpos se depositaron en cumplimiento del tratado de Budapest.

20 En un ejemplo, un anticuerpo anti-VLA-1 útil para los métodos descritos en la presente memoria incluye un polipéptido de cadena ligera que comprende la secuencia de la id. de sec. n.º 4 (figura 2A) y un polipéptido de cadena pesada que comprende la secuencia de la id. de sec. n.º 5 (figura 2B).

25 En un ejemplo, un anticuerpo anti-VLA-1 tiene una secuencia de cadena ligera que comprende la secuencia de la id. de sec. n.º 1 (figura 3) y una secuencia de cadena pesada que comprende la secuencia de la id. de sec. n.º 2 (figura 4). Otros anticuerpos anti-VLA-1 incluyen, por ejemplo, el anticuerpo monoclonal 1B3 (ATCC HB-10536) descrito en las patentes US-5.391.481 y US-5.788.966, y Ha31/8.

30 En un ejemplo, un anticuerpo anti-VLA-1 inhibe la interacción entre VLA-1 y un ligando VLA-1 (p. ej., colágeno), por ejemplo bloqueando físicamente la interacción, disminuyendo la afinidad de VLA-1 por su parte correspondiente, interrumpiendo o desestabilizando complejos de VLA-1, secuestrando VLA-1 o dirigiéndose a VLA-1 para la degradación. En un ejemplo, el anticuerpo puede unirse a VLA-1 en uno o más residuos de aminoácidos que participan en la interconexión de la unión VLA-1/ligando. Dichos residuos de aminoácidos se pueden identificar, p. ej., mediante rastreo de alanina. En otro ejemplo, el anticuerpo puede unirse a residuos que no participan en la unión VLA-1/ligando. Por ejemplo, el anticuerpo puede alterar una conformación de VLA-1 y, de este modo, reducir la afinidad de unión, o el anticuerpo puede impedir estéricamente la unión VLA-1/ligando. En un ejemplo, el anticuerpo puede reducir la activación de un evento o actividad mediada por VLA-1.

Administración

35 Las formulaciones de anticuerpos anti-VLA-1 descritas en la presente memoria pueden administrarse a un individuo, tal como un individuo humano, mediante diversos métodos. De forma típica, la administración es mediante inyección subcutánea.

40 La formulación puede administrarse a una dosis fija, o en una dosis de mg/kg. Por lo general, la administración es a una dosis fija. Por ejemplo, la formulación se administra a una dosis unitaria fija de anticuerpo anti-VLA-1 de aproximadamente 80 mg a aproximadamente 315 mg (por ejemplo, aproximadamente 100 mg, aproximadamente 110 mg, aproximadamente 120 mg, aproximadamente 130 mg, aproximadamente 140 mg, aproximadamente 150 mg, aproximadamente 160 mg, aproximadamente 180 mg, aproximadamente 190 mg, aproximadamente 210 mg, aproximadamente 250 mg o aproximadamente 300 mg) de anticuerpo anti-VLA-1 diariamente, dos veces por semanas, semanalmente, cada dos semanas, cada 4 semanas (por ejemplo, mensualmente).

45 La formulación también puede administrarse a un individuo, tal como un ser humano, en un bolo a una dosis de anticuerpo anti-VLA-1 de aproximadamente 2,0 mg por kg de peso corporal a aproximadamente 4,0 mg por kg de peso corporal (por ejemplo, aproximadamente 2,1 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 2,2 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 2,3 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 2,5 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 2,8 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 3,0 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 3,1 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 3,2 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 3,3 mg por kg de peso corporal, aproximadamente 3,4 mg por kg de peso corporal, o aproximadamente 3,6 mg por kg de peso corporal).

50 Los rangos de dosis modificados incluyen una dosis de anticuerpo anti-VLA-1 que es inferior a aproximadamente 400 mg/individuo, inferior a aproximadamente 300 mg/individuo, inferior a aproximadamente 250 mg/individuo, inferior a aproximadamente 200 mg/individuo, inferior a aproximadamente 150 mg/individuo, inferior a

aproximadamente 100 mg/individuo, de forma típica para la administración cada cuatro semanas o una vez al mes. El anticuerpo anti-VLA-1 puede administrarse, por ejemplo, de cada tres a cada cinco semanas, por ejemplo, cada cuatro semanas, o mensualmente.

5 Los regímenes de dosificación pueden ajustarse para proporcionar la respuesta deseada, tal como una respuesta terapéutica. Como se utiliza en la presente memoria, un “régimen” es un período de terapia regulado por un período establecido de administración del fármaco. Por ejemplo, el período de terapia puede incluir la administración de una cantidad específica de fármaco determinados días en intervalos definidos. Las dosificaciones pueden ser consistentes o variadas y el período de administración puede ser en intervalos regulares (tal como diariamente o cada dos o tres días), o el período de administración puede variar (por ejemplo, cada día durante una semana, a continuación no administrar fármaco durante una semana, a continuación fármaco cada dos días, según sea necesario por el dolor).

15 Una “respuesta terapéutica” es una mejora en una condición, síntoma, o parámetro asociado con un trastorno, en un grado estadísticamente significativo o bien un grado detectable por el experto en la técnica.

20 La dosis de anticuerpo anti-VLA-1 puede escogerse para reducir o evitar la producción de anticuerpos contra el anticuerpo anti-VLA-1, para conseguir más de 40 %, más de 50 %, más de 70 %, más de 75 % o más de 80 % de saturación de la subunidad $\alpha 1$, para conseguir menos de 80 %, menos de 70 %, menos de 60 %, menos de 50 %, o menos de 40 % de saturación de la subunidad $\alpha 1$, o para impedir que aumente el nivel de glóbulos blancos en circulación.

25 Forma farmacéutica unitaria o “dosis fija”, como se utiliza en la presente memoria, se refiere a unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para los individuos a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de anticuerpo activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado asociado con el portador farmacéutico requerido y, opcionalmente, asociado con el otro agente.

30 Una composición farmacéutica puede incluir una “cantidad terapéuticamente eficaz” de un anticuerpo anti-VLA-1 descrito en la presente memoria, tal como SAN-300. Dichas cantidades eficaces se pueden determinar en función del efecto del agente administrado, o el efecto combinado de un agente y agente secundario si se utiliza más de un agente. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente puede también variar según factores tales como la patología, edad, sexo, y peso del individuo, y la capacidad del anticuerpo para provocar una respuesta deseada en el individuo, tal como la mejora de al menos un parámetro de trastorno, por ejemplo, un parámetro de artritis reumatoide o la mejora de al menos un síntoma del trastorno, por ejemplo, artritis reumatoide. Una cantidad terapéuticamente eficaz también es aquella en la que cualquier efecto tóxico o perjudicial de la composición es compensado por los efectos terapéuticamente beneficiosos.

35 Dispositivos y kits

40 Las formulaciones que tienen una alta concentración de un anticuerpo anti-VLA-1 (por ejemplo, SAN-300) se pueden administrar con un dispositivo médico. El dispositivo puede estar diseñado con o tener características tales como portabilidad, almacenamiento a temperatura ambiente y facilidad de uso de modo que pueda ser usado en situaciones de emergencia, tales como por un individuo no capacitado o por personal que intervenga en situaciones de emergencia en el campo, retirado para instalaciones médicas y otros equipos médicos. El dispositivo puede ser un recipiente que incluye, por ejemplo, uno o más alojamientos para almacenar preparaciones farmacéuticas que incluyen un anticuerpo anti-VLA-1 (p. ej., SAN-300), y se pueden configurar para suministrar una o más dosis unitarias del agente.

45 Un recipiente, tal como un dispositivo de suministro, puede contener una formulación de dosificación unitaria de anticuerpo anti-VLA-1. El recipiente puede ser adecuado para la administración subcutánea. Por ejemplo, el recipiente puede ser una jeringa.

50 Una composición farmacéutica que comprende un anticuerpo anti-VLA-1 puede administrarse con un dispositivo de suministro, tal como una jeringa, por ejemplo, una jeringa hipodérmica o multicámara. En un ejemplo, el dispositivo es una jeringa previamente llena con una aguja unida o integrada. En otros ejemplos, el dispositivo es una jeringa previamente llena que no tiene una aguja unida. La aguja se puede envasar con la jeringa previamente llena. En un ejemplo, el dispositivo es un dispositivo de autoinyección, tal como una jeringa autoinyectora. En otro ejemplo, el dispositivo de inyección es un inyector de tipo boli. En otro ejemplo más, la jeringa es una jeringa de aguja encajada, jeringa luer lock, o jeringa de deslizamiento luer. Otros dispositivos de suministro adecuados incluyen stents, catéteres, microagujas y dispositivos de liberación controlada implantables. La composición puede administrarse por vía intravenosa con equipos IV estándar, incluyendo, por ejemplo, tubos IV, con o sin filtros en línea. En determinados ejemplos, el dispositivo será una jeringa para usar en administración SC o IM.

60 Un anticuerpo anti-VLA-1, tal como SAN-300, puede proporcionarse en un kit. En un ejemplo, el kit incluye uno o más de: un recipiente, tal como en un dispositivo de inyección, tal como una jeringa que contiene una composición de anticuerpo descrita en la presente memoria; material de envasado que encierra el recipiente y, opcionalmente, otros elementos del kit; un recipiente que contiene una composición que incluye un segundo agente; y material de información. El material de información puede ser descriptivo, instructivo, de marketing u otro material que se refiera a los métodos descritos en la presente memoria y/o al uso de los agentes para el beneficio terapéutico. En un ejemplo, el kit también incluye un segundo agente. Por ejemplo, el kit incluye un primer recipiente que contiene una composición que incluye el anticuerpo anti-VLA-1 y

un segundo recipiente que incluye el segundo agente. En un ejemplo, el kit incluye una o más jeringas de un solo uso previamente llenas de una formulación de anticuerpo líquida de alta concentración descrita en la presente memoria.

5 El material de información de los kits no está limitado en su forma. En un ejemplo, el material de información puede incluir información acerca de la producción del anticuerpo, concentración, la fecha de caducidad, información acerca del sitio de producción o del lote, etc. En un ejemplo, el material de información se refiere a métodos para administración del anticuerpo anti-VLA-1, tal como SAN-300, tal como en una dosis, forma de dosificación o modo de administración adecuados, por ejemplo, una dosis, forma de dosificación, o modo de administración descritos en la presente memoria, para tratar un individuo que tiene una enfermedad inflamatoria, tal como AR, o que está en riesgo de padecer un episodio asociado con una enfermedad inflamatoria. La información puede proporcionarse en diversos formatos, incluido texto impreso, material legible por ordenador, grabación en vídeo, o grabación de audio o información que proporciona un enlace o dirección para el material en cuestión.

15 El kit puede incluir uno o más recipientes para la composición o composiciones que contienen los agentes. En algunos ejemplos, el kit contiene recipientes, divisores o compartimientos aparte para la composición y el material de información. Por ejemplo, la composición puede estar contenida en una botella, vial o jeringa, y el material de información puede estar contenido en una manga o paquete de plástico. En otros ejemplos, los elementos aparte del kit están contenidos dentro de un recipiente único y no dividido. Por ejemplo, la composición está contenida en una botella, vial o jeringa que tiene unido el material de información en forma de etiqueta. En algunos ejemplos, el kit incluye una pluralidad, por ejemplo, un 20 envase, de recipientes individuales, conteniendo cada uno una o más formas farmacéuticas unitarias, tales como una forma farmacéutica unitaria descrita en la presente memoria, de los agentes. Los recipientes pueden incluir una dosificación unitaria combinada, por ejemplo, una unidad que incluye el anticuerpo anti-VLA-1, tal como el SAN-300, y el segundo agente, tal como en una relación deseada. Por ejemplo, el kit incluye una pluralidad de jeringas, ampollas, paquetes de aluminio, envases de burbuja o blíster, o dispositivos médicos, por ejemplo, conteniendo cada uno una 25 combinación única de dosis unitaria. Los recipientes de los kits pueden ser herméticos al aire, al agua, por ejemplo, impermeables a los cambios de humedad o evaporación y/o a la luz.

El kit incluye opcionalmente un dispositivo adecuado para administrar la composición, por ejemplo, una jeringa u otro dispositivo de suministro adecuado. El dispositivo puede disponerse previamente cargado con uno o ambos de los agentes o puede estar vacío, pero adecuado para su carga.

Artritis reumatoide

35 Las formulaciones que tienen anticuerpo anti-VLA-1 adecuadas para la administración subcutánea son útiles para el tratamiento de enfermedades inflamatorias, tales como artritis autoinmune, por ejemplo, la artritis reumatoide o la artritis psoriásica; u otras formas de artritis inflamatoria, tales como la artritis asociada con la inflamación intestinal. La artritis autoinmune es causada por anomalías en el sistema inmunológico que hacen que el cuerpo empiece a atacar sus propias articulaciones y tejido conectivo. Los ejemplos de artritis autoinmune incluyen artritis reumatoide, artritis reumatoide, artritis psoriásica y espondilitis anquilosante. La artritis reumatoide es un síndrome crónico caracterizado por inflamación no específica, usualmente simétrica, de las articulaciones periféricas, dando lugar a una destrucción progresiva de las estructuras articular y periarticular, con o sin manifestaciones generalizadas. La artritis juvenil (artritis que comienza a la edad de 16 años, o antes) es similar a la artritis reumatoide de los adultos y tiende a afectar a articulaciones grandes y pequeñas, y puede afectar al crecimiento y el desarrollo. La artritis psoriásica, que se produce en aproximadamente 7 % de los pacientes con psoriasis, es una artritis inflamatoria asociada con la psoriasis de la piel o las uñas; y una prueba negativa para el RF (factor reumatoide). La espondilitis anquilosante es un trastorno reumático sistémico, caracterizado por inflamación del esqueleto axial y articulaciones periféricas grandes.

Otros tipos de artritis, especialmente la artritis inflamatoria, son adecuados para ser tratados mediante los métodos presentados en la descripción. Por ejemplo, la artritis asociada con la inflamación intestinal puede ser tratada con un anticuerpo anti-VLA-1, tal como cuando una primera terapia falla o deja de aliviar los síntomas artríticos.

55 La eficacia de un agente para el tratamiento de la artritis puede medirse mediante un número de instrumentos de diagnóstico disponibles, incluyendo, aunque no de forma limitativa, por ejemplo, examen físico, incluyendo la prueba del número de recuentos de articulaciones sensibles o inflamadas, rayos x de articulaciones, análisis de sangre, o el examen de fluido extraído de articulaciones afectadas. Los rayos x pueden revelar erosiones, quistes y estrechamiento del espacio de articulaciones que pueden producirse en la artritis reumatoide crónica. Las pruebas de sangre que indican niveles elevados de ESR (Erythrocyte Sedimentation Rate - Índice de sedimentación de eritrocitos) o la presencia de anticuerpos contra γ -globulina alterada (es decir, [rheumatic factors - factores reumáticos - "RF"]) son indicativos de la artritis reumatoide. El líquido sinovial de las articulaciones de pacientes con artritis reumatoide es de forma típica turbio pero estéril con una viscosidad reducida y usualmente de 3.000 a 60 50.000 glóbulos blancos (WBC)/ μ l.

Los síntomas de la artritis, incluida la artritis reumatoide, incluyen dolor en las articulaciones, inflamación de las articulaciones, deformaciones de las articulaciones, reducción de la capacidad de mover una articulación, enrojecimiento de la piel alrededor de una articulación, rigidez, calor alrededor de una articulación, la rigidez matinal, y efusión (acumulación de líquido en las articulaciones). Los criterios para el diagnóstico de la artritis reumatoide se exponen, por ejemplo, en Aletaha y col., "2010

- 5 Rheumatoid Arthritis Classification Criteria,” Arthritis and Rheumatism 62:2569-2581, 2010, e implica la evaluación del número de grandes y pequeñas articulaciones afectadas en un individuo, los niveles de RF (rheumatoid factor - factor reumatoide) y ACPA (anti-citrullinated protein antibody - anticuerpo antiproteínas citrulinadas) en suero, CRP (C-reactive protein - proteína C reactiva) y niveles de ESR (erythrocyte sedimentation rate - Índice de sedimentación de eritrocitos), y si los síntomas del individuo han persistido durante al menos seis semanas, o durante menos de seis semanas. La duración de los síntomas se determina por las indicaciones del propio paciente en cuanto a la duración de los signos y síntomas de la sinovitis (dolor, hinchazón y tacto blando o sensibilidad) de cualquier articulación clínicamente implicada en el momento de la evaluación. Cada uno de estos factores proporciona una puntuación, y una puntuación total ≥ 6 (en una escala de 0-10) es indicativa de la artritis reumatoide.
- 10 “Las articulaciones grandes” incluyen hombros, codos, caderas, rodillas y tobillos y las “articulaciones pequeñas” incluyen las articulaciones metacarpofalángica, proximal interphalangeal (interfalángica proximal - PIP), metatarsophalangeal (metatarsfalángica - MTP) segunda a quinta, e interphalangeal (interfalángica - IP) de pulgar, y las muñecas.
- 15 Los niveles de RF y ACPA se indican usualmente en UI (unidades internacionales). A partir del límite superior de la normalidad (ULN) se pueden obtener las siguientes definiciones para la prueba y ensayo de laboratorio respectivos: negativo=inferior que o igual al ULN para la prueba y ensayo de laboratorio; positivo de bajo nivel=más alto que el ULN pero ≤ 3 veces el ULN para la prueba y ensayo de laboratorio; positivo de alto nivel= > 3 veces superior al LSN para la prueba y ensayo de laboratorio.
- 20 Los niveles de CRP y ESR se puntúan como normales o anormales según las normas de laboratorio locales. Si los resultados de al menos una de estas dos pruebas son anormales, la puntuación del paciente es la correspondiente a una respuesta aguda anormal.
- 25 Los pacientes que tienen artritis, tal como artritis reumatoide, suelen tener, frecuentemente, un nivel incrementado de células VLA-1+, tales como células de VLA-1+ T o monocitos.
- 30 Una “cantidad eficaz” de una terapia, tal como una primera o segunda terapia de línea, es una cantidad suficiente para proporcionar resultados clínicos beneficiosos o deseados. Se puede suministrar una cantidad eficaz en una o más administraciones. Una “cantidad eficaz” de una primera terapia de línea producirá una “respuesta adecuada”. Una “respuesta adecuada” se manifiesta como una mejoría de los síntomas, tal como una disminución en el número de articulaciones inflamadas y/o recuento de articulaciones sensibles, o una reducción del dolor en las articulaciones. Una “cantidad eficaz” de un anticuerpo anti-VLA-1 es una cantidad suficiente para paliar, mejorar, estabilizar, revertir, ralentizar o retrasar el avance de la artritis, o un síntoma de la artritis, según estándares clínicamente aceptables.
- 35 Un individuo puede ser monitorizado para determinar mejoras en los síntomas artríticos tras el tratamiento con un anticuerpo anti-VLA-1 como una primera terapia de línea o como una segunda terapia de línea. En un ejemplo, se administra a un paciente una formulación de alta concentración de anticuerpo anti-VLA-1, tras no haber respondido o haber tenido una respuesta inadecuada a una primera terapia de línea. Una “respuesta inadecuada” se manifiesta cuando no se logra una mejoría de los síntomas, tal como la incapacidad de experimentar una disminución en el recuento de articulaciones inflamadas y/o recuento de articulaciones sensibles, o una reducción del dolor en las articulaciones.
- 40 Un individuo puede ser monitorizado para determinar mejoras en los síntomas artríticos tras el tratamiento con una primera terapia de línea o con una segunda terapia de línea. Por ejemplo, un individuo se puede monitorizar evaluando una puntuación de ACR (American College of Rheumatology). Por ejemplo, una puntuación de ACR20 indica que existe al menos una reducción del 20 % en el número total de articulaciones sensibles e inflamadas y una reducción del 20 % en tres de los siguientes cinco parámetros: evaluación global de la enfermedad por parte del médico, evaluación global de la enfermedad del paciente, evaluación del dolor del paciente, velocidad de sedimentación de proteína C reactiva o eritrocitos, y grado de discapacidad en el Health Assessment Questionnaire (Cuestionario de evaluación de salud - HAQ). De forma típica, una puntuación de ACR20 indica que un paciente tiene una mejora significativa de los síntomas de la artritis después de la administración de un agente terapéutico, tal como un anticuerpo anti-VLA-1 o una primera terapia de línea que es un fármaco distinto de un anticuerpo anti-VLA-1. Un paciente puede presentar mejoras más significativas con puntuaciones de ACR50 o ACR70, por ejemplo.
- 45 Si un paciente no presenta una puntuación de al menos ACR20, por ejemplo, ACR20, ACR50 o ACR70, después de la administración de una terapia, entonces el paciente puede recibir una evaluación negativa o puede determinarse que tiene una respuesta inadecuada a la terapia. En algunos ejemplos, la puntuación de ACR del paciente se monitoriza en el transcurso de una o dos semanas, o uno o dos meses, o más. En algunos ejemplos, un paciente no cumplirá un criterio previamente determinado que requiera una puntuación de ACR de ACR20, ARC50 o ACR70 después del tratamiento con una primera terapia de línea y el paciente se seleccionará para el tratamiento con un anticuerpo anti-VLA-1.
- 50 El HAQ es un cuestionario validado, autoadministrado por el paciente, que incluye veinte artículos relacionados con la función y cuatro artículos relacionados con medios de ayuda y dispositivos. Las preguntas incluyen ocho subescalas: vestirse y arreglarse, levantarse, higiene, alcanzar, comer, caminar, sujetar y actividades. Los artículos se califican de 0 (capaz de funcionar sin dificultad) a 3 (incapaz de funcionar). El índice de enfermedad HAQ es una
- 55
- 60
- 65

suma ponderada de las puntuaciones de escala, indicando una puntuación más alta una función más deficiente. Las disminuciones del índice de enfermedad HAQ superiores a un valor de -0,19 a -0,22 (por ejemplo, -0,2 o -0,21) se consideran clínicamente importantes.

5 Si un paciente no presenta una mejora (un aumento) en la puntuación de HAQ de al menos 0,19, por ejemplo, en al menos 0,22 o más, después de la administración de una terapia, entonces el paciente puede recibir una evaluación negativa o puede determinarse que tiene una respuesta inadecuada a la terapia. En algunos ejemplos, se monitoriza el paciente para determinar si se ha producido una mejora en la HAQ en el transcurso de una o dos semanas, o de uno o dos meses, o más. En algunos ejemplos, un paciente no cumplirá un criterio predeterminado que requiera una mejora en la puntuación de HAQ de al menos 0,19 o al menos 0,22, o más, y el paciente se seleccionará para el tratamiento con un anticuerpo anti-VLA-1.

15 También se puede monitorizar a un paciente para determinar mejoras en los síntomas artríticos tras el tratamiento con una primera o segunda terapia de línea mediante el análisis correspondiente a una mejora en DAS (Disease Activity Score [Puntuación de la actividad de la enfermedad]). La DAS es una medida de la actividad de la artritis reumatoide que incorpora los siguientes parámetros: el número total de articulaciones sensibles e inflamadas, ESR, y la evaluación de la actividad de la enfermedad del paciente (Van der Heijde y col., "Development of disease activity score based on judgment in clinical practice by rheumatologists" *J. Rheumatol.* 20:579-81, 1993). Si un paciente no presenta una mejora en DAS, por ejemplo, una disminución de DAS de al menos 1,6, al menos 1,8, al menos 2,0, al menos 2,5, al menos 3,0, al menos 3,2, al menos 3,6, o más, después de la administración de una terapia, entonces el paciente puede recibir una evaluación negativa o puede determinarse que tiene una respuesta inadecuada a la terapia. En algunos ejemplos, se monitoriza el paciente para determinar si se ha producido una mejora en la DAS en el transcurso de una o dos semanas, o de uno o dos meses, o más. En algunos ejemplos, un paciente no cumplirá un criterio predeterminado que requiera una mejora en la DAS (una disminución de la DAS) de al menos 1,6, al menos 2,0, al menos 2,2, al menos 2,8, al menos 3,2, al menos 3,6, o más, y el paciente se seleccionará para el tratamiento con un anticuerpo anti-VLA-1. De forma típica, una puntuación de DAS de 2,6 o menos indica la remisión de la AR, y una puntuación de DAS de 3,2 o menos indica baja actividad de la enfermedad. En un ejemplo, el paciente no cumplirá un criterio predeterminado que es una DAS de 2,6 o menos, o un paciente no cumplirá un criterio predeterminado que es una DAS de 3,2 o menos.

20 La DAS para 28 recuentos de articulaciones (medida DAS28-CRP) incluye un conjunto de 4 variables: número de articulaciones sensibles de entre 28 articulaciones, número de articulaciones inflamadas de entre 28 articulaciones, CRP (en mg/l), y evaluación de la actividad de la enfermedad por parte del individuo medida en una escala análoga visual (VAS) de 100 milímetros (mm). Los valores de CRP varían de 0 a 9,31, indicando puntuaciones más altas una mayor actividad de la enfermedad. De forma típica, una puntuación de DAS28-CRP de 2,6 o inferior indica la remisión de la AR, y una puntuación de DAS de 3,2 o inferior indica baja actividad de la enfermedad. En un ejemplo, el paciente no cumplirá un criterio predeterminado que es una DAS de 2,6 o menos, o un paciente no cumplirá un criterio predeterminado que es una DAS28 de 3,2 o inferior.

30 Un paciente también se puede monitorizar para determinar las mejoras en los síntomas artríticos mediante un recuento del número total de articulaciones sensibles e inflamadas. Si la cantidad total de articulaciones sensibles e inflamadas no disminuye, por ejemplo, más de 1, 2, 3 o más después de la administración de una terapia, entonces el paciente puede recibir una evaluación negativa o puede determinarse que tiene una respuesta inadecuada a la terapia. En algunos ejemplos, se monitoriza el paciente para determinar una disminución de los recuentos de articulaciones inflamadas o sensibles en el transcurso de una o dos semanas, o de uno o dos meses, o más. En algunos ejemplos, un paciente no cumplirá un criterio predeterminado que requiera una disminución del recuento de articulaciones inflamadas o sensibles de 1, 2, 3, o más, y el paciente se seleccionará para el tratamiento con un anticuerpo anti-VLA-1. En algunos ejemplos, un paciente no cumplirá un criterio predeterminado que requiera una disminución del recuento de articulaciones inflamadas o sensibles de 15 %, 20 %, o 30 % o más, y el paciente se seleccionará para el tratamiento con un anticuerpo anti-VLA-1.

35 Un paciente también se puede monitorizar para determinar mejoras en los síntomas artríticos mediante métodos radiográficos, tales como IRM, ultrasonidos o de rayos x. Estos métodos proporcionan imágenes que pueden revelar el grado de sinovitis, cambios erosivos y edema. Que no se produzca una disminución en el grado de la sinovitis, una disminución en la velocidad de erosión en la articulación, o una disminución del edema, tal como durante el transcurso de una o dos semanas o uno o dos meses, o más, por ejemplo, puede indicar que el paciente tiene una respuesta inadecuada para una terapia. En algunos ejemplos, un paciente no cumplirá un criterio predeterminado que requiere una disminución en el grado de sinovitis, una disminución en la velocidad de erosión en la articulación, o una disminución del "edema óseo" u "osteitis" de 15 %, 20 %, 30 % o más, y el paciente se seleccionará para el tratamiento con un anticuerpo anti-VLA-1.

40 También se puede monitorizar para determinar mejoras de los síntomas artríticos tras el tratamiento con una primera o segunda terapia de línea evaluando el número de células VLA-1⁺, por ejemplo, células VLA-1⁺ T o monocitos, en sangre o fluido sinovial. Si el número total de células VLA-1⁺ no disminuye, por ejemplo, en más de 15 %, más de 20 % o más de 30 % o más después de la administración de una terapia, entonces el paciente puede recibir una evaluación negativa o puede determinarse que tiene una respuesta inadecuada a la terapia. En algunos ejemplos, se monitoriza el paciente para determinar una disminución en las células VLA-1⁺ en el transcurso de una o dos semanas, o uno o dos meses, o más. En

algunos ejemplos, un paciente no cumplirá un criterio predeterminado que requiera una disminución de las células VLA-1+ de 15 %, 20 %, o 30 % o más, y el paciente se seleccionará para el tratamiento con un anticuerpo anti-VLA-1.

5 En algunos ejemplos, un paciente no cumplirá un criterio predeterminado que requiere una mejora tanto en los recuentos de articulaciones sensibles e inflamadas de al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 30 % o más, y una mejora de al menos 15 %, al menos 20 %, o al menos 30 % o más en tres de las cinco mediciones clave: evaluación del dolor del paciente (según una escala análogo-visual que varía de 1 a 100, indicando las puntuaciones más altas una mayor intensidad del dolor); niveles de reactivos de fase aguda, tales como el nivel de CRP; puntuación HAQ; y evaluación global del paciente y del médico (valorada cada una en una escala de 0 a 100, indicando los números más altos una enfermedad más grave).

15 La información relativa a la respuesta de un paciente a una primera terapia de línea se puede adquirir directa o indirectamente. Por ejemplo, la información relacionada con la respuesta del paciente puede ser evaluada por un profesional médico o cuidador que examine directamente al paciente para determinar mejoras de los síntomas después de la administración de una primera terapia de línea. Alternativamente, la información puede ser adquirida indirectamente, por ejemplo a partir de los registros del paciente obtenidos de los registros de un hospital o clínica, o profesional médico o cuidador, o de una base de datos, tal como una base de datos en línea.

20 “Adquirir” o “que adquiere”, como se utilizan los términos en la presente memoria, se refieren a la obtención de una entidad física, o un valor, tal como un valor numérico, “que adquiere directamente” o “que adquiere indirectamente” la entidad física o valor. “Que adquiere directamente” significa realizar un proceso (por ejemplo, examinar el paciente o una muestra de paciente) para obtener la entidad física o valor. “Que adquiere indirectamente” se refiere a recibir la entidad física o valor de otra parte o fuente (por ejemplo, un laboratorio de terceros que adquirió directamente la entidad física o valor).

25 Que adquiere directamente una entidad física incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una sustancia física, tal como material de partida. Los cambios ilustrativos incluyen hacer una entidad física a partir de dos o más materiales de partida, someter una sustancia a cizalla o fragmentación, separar o purificar una sustancia, combinar dos o más entidades aparte en una mezcla, realizar una reacción química que incluye romper o formar un enlace covalente o no covalente.

35 Que adquiere directamente un valor incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una muestra u otra sustancia, por ejemplo, realizar un cambio físico en una sustancia, lo que incluye un cambio físico en una sustancia, tal como una muestra, un analito, o un reactivo (algunas veces denominado en la presente memoria “análisis físico”), realizar un método analítico, tal como un método que incluye uno o más de los siguientes: separar o purificar una sustancia, tal como un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, a partir de otra sustancia; combinar un analito, o fragmento u otro derivado del mismo, con otra sustancia, tal como un tampón, un disolvente o un reactivo; o cambiar la estructura de un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, tal como mediante ruptura o formación de un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del analito; o cambiar la estructura de un reactivo, o un fragmento u otro derivado de este, tal como mediante ruptura o formación de un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del reactivo.

45 “Analizar” una muestra incluye realizar un proceso que incluye un cambio físico en una muestra o en otra sustancia, tal como un material de partida. Los cambios ilustrativos incluyen hacer una entidad física a partir de dos o más materiales de partida, someter una sustancia a cizalla o fragmentación, separar o purificar una sustancia, combinar dos o más entidades aparte en una mezcla, realizar una reacción química que incluye romper o formar un enlace covalente o no covalente. Analizar una muestra puede incluir realizar un proceso analítico, lo que incluye un cambio físico en una sustancia, tal como una muestra, un analito, o un reactivo (algunas veces denominado en la presente memoria “análisis físico”), realizar un método analítico, tal como un método que incluye uno o más de los siguientes: separar o purificar una sustancia, tal como un analito, o un fragmento u otro derivado de la misma, a partir de otra sustancia; combinar un analito, o fragmento u otro derivado del mismo, con otra sustancia, tal como un tampón, un disolvente o un reactivo; o cambiar la estructura de un analito, o un fragmento u otro derivado del mismo, tal como mediante ruptura o formación de un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del analito; o cambiar la estructura de un reactivo, o un fragmento u otro derivado de este, tal como mediante ruptura o formación de un enlace covalente o no covalente, entre un primer y un segundo átomo del reactivo.

60 En un ejemplo, determinar si un paciente tiene mejoras en los síntomas artríticos, incluye uno o más de la evaluación del paciente, o analizar una muestra del paciente, solicitar la evaluación del paciente o análisis de la muestra, solicitar resultados de la evaluación del paciente o análisis de la muestra, o recibir los resultados de la evaluación del paciente o análisis de la muestra. Generalmente, el análisis puede incluir uno o ambos de realizar el método de base, por ejemplo, realizar un análisis del número de células de VLA-1+ o monocitos en una muestra del paciente, o recibir datos de otra persona que ha realizado el método de base.

65 Además de, o antes de los estudios humanos, se puede usar un modelo animal para evaluar la eficacia del uso de los dos agentes. Un modelo animal ilustrativo de AR se describe en US-7.358.054. Por ejemplo, en un modelo de artritis

en ratones, se administran anticuerpos de tipo II anticolágeno por inyección i.p., seguido de inyección i.p. de LPS (lipopolisacárido). Los ratones desarrollan síntomas, tales como muñecas, tobillos y dígitos inflamados.

5 Otros trastornos

Las formulaciones y métodos descritos en la presente memoria pueden usarse, además, para tratar otros trastornos inflamatorios, inmunológicos o autoinmunes, tales como rechazo de injerto de tejido u órgano o enfermedad de injerto contra huésped; lesiones agudas del SNC, tales como accidente cerebrovascular o lesión de la médula espinal; enfermedad renal crónica; una alergia, tal como asma alérgico; diabetes de tipo 1; enfermedad inflamatoria intestinal, tal como la enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa; miastenia gravis; fibromialgia; un trastorno artrítico, tal como la artritis psoriásica; trastornos inflamatorios de la piel, tal como psoriasis, vitiligo, dermatitis, y liquen plano; lupus eritematoso sistémico; síndrome de Sjögren; cáncer hematológico, tal como mieloma múltiple, leucemia y linfoma; un cáncer sólido, tal como un sarcoma o un carcinoma, tal como el de pulmón, pecho, próstata o cerebro; y un trastorno fibrótico, tal como fibrosis pulmonar, mielofibrosis, cirrosis hepática, glomerulonefritis mesangial proliferativa, glomerulonefritis crescénica, nefropatía diabética y fibrosis intersticial renal.

Por ejemplo, una formulación que contiene una alta concentración de anticuerpo anti-VLA-1, tal como SAN-300, se puede administrar subcutáneamente para tratar estos y otros trastornos inflamatorios, inmunológicos o autoinmunes.

20 Segundos agentes ilustrativos

En algunos ejemplos, las formulaciones descritas en la presente memoria, por ejemplo, las formulaciones que contienen un anticuerpo anti-VLA-1 adecuado para la administración SC, se administran en combinación con una formulación que contiene un segundo agente. De forma típica, la formulación de anticuerpo anti-VLA-1, y la formulación que contiene el segundo agente son formulaciones aparte.

En una implementación, el anticuerpo y el segundo agente se proporcionan como formulaciones aparte, y la etapa de administración incluye administrar de forma secuencial el anticuerpo y el segundo agente. Las administraciones secuenciales se pueden proporcionar el mismo día, por ejemplo, con un intervalo de una hora o un intervalo de al menos 3 horas, al menos 6 horas, o al menos 12 horas, o en diferentes días. El segundo agente puede administrarse antes de la administración de un anticuerpo anti-VLA-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, después de la administración de un anticuerpo anti-VLA-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo, o al mismo tiempo que la administración de un anticuerpo anti-VLA-1 o fragmento de unión a antígeno del mismo.

Generalmente, el anticuerpo y el segundo agente se administran cada uno como una pluralidad de dosis espaciadas en el tiempo. El anticuerpo y el segundo agente se administran cada uno generalmente según un régimen. El régimen para uno o ambos puede tener una periodicidad regular. El régimen para el anticuerpo puede tener una periodicidad diferente del régimen para el segundo agente, por ejemplo, uno puede administrarse más frecuentemente que el otro. En una implementación, uno del anticuerpo y el segundo agente se administran una vez a la semana y el otro se administra una vez al mes. El anticuerpo y el segundo agente pueden administrarse mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, subcutáneamente.

En algunos ejemplos, cada uno del anticuerpo y el segundo agente se administra en la misma dosis puesto que cada uno está prescrito para la monoterapia. En otros ejemplos, el anticuerpo se administra en una dosificación que es igual o inferior a la cantidad requerida para la eficacia si se administra solo. Asimismo, el segundo agente se administra en una dosificación que es igual o inferior a una cantidad requerida para la eficacia si se administra solo.

El segundo agente puede ser, por ejemplo, un antiinflamatorio, un antihistamínico, un analgésico, tal como acetaminofén, o un corticosteroide.

Ejemplos no limitativos de segundos agentes para tratar la artritis reumatoide en combinación con un anticuerpo anti-VLA-1 incluyen un DMARD, tales como sales de oro; hidroxicloroquina; un antifolato, tal como el metotrexato; un inhibidor de la síntesis de pirimidina, como la leflunomida; o un fármaco de sulfamida, tal como la sulfasalazina. En otro ejemplo, el segundo agente para tratar la artritis reumatoide es un inhibidor de TNF- α , tal como un anticuerpo de TNF- α , por ejemplo, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol o golimumab; o etanercept.

Otros segundos agentes ilustrativos incluyen un inhibidor de JAK (Jano quinasa) (por ejemplo, un inhibidor de JAK1, JAK2 JAK3 o TYK2), un inhibidor de SYK (tirosina quinasa del bazo) (por ejemplo, un inhibidor de SYK o ZAP-70), un inhibidor de VLA-2, un inhibidor de IL-6, un inhibidor de IL-17, un inhibidor de IL-12/IL-23, un inhibidor de MAdCAM-1, un inhibidor de CD20 u otro agente biológico. Por ejemplo, el segundo agente terapéutico puede ser metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, o hidroxicloroquina, infliximab, adalimumab, certolizumab pegol, golimumab, etanercept, rituximab, tozilizumab o abatacept.

El segundo agente puede ser, por ejemplo, un inhibidor de JAK3, tal como el inhibidor de molécula pequeña CP-690.550 (tofacitinib), o el segundo agente puede ser el inhibidor R406 de SYK, o su profármaco 788.

El segundo agente puede ser de forma alternativa un agente de agotamiento de células B, tal como un anticuerpo anti-CD20, por ejemplo, rituximab (Rituxan, Genentech, Inc., South San Francisco, CA; e IDEC Pharmaceutical, San Diego, CA), un anticuerpo anti-VLA-2, tal como GBR 500; o un anticuerpo anti-MAdCAM 1, tales como velodizumab.

5 Ejemplos no limitativos de segundos agentes para el tratamiento de la IBD junto con un anticuerpo anti-VLA-1 incluyen, por ejemplo, un anticuerpo MAdCAM-1, tal como velodizumab.

10 En un ejemplo, el segundo agente terapéutico es metotrexato, administrado en una dosis de aproximadamente 35 mg/semana, aproximadamente 30 mg/semana, aproximadamente 25 mg/semana, aproximadamente 20 mg/semana o aproximadamente 15 mg/semana o menos. En otro caso, el segundo agente terapéutico es leflunomida, administrada a una dosis de aproximadamente 30 mg/día, aproximadamente 25 mg/día, aproximadamente 20 mg/día, aproximadamente 15 mg/día o aproximadamente 10 mg/día o menos. En otro caso, el segundo agente terapéutico es sulfasalazina, administrada a una dosis de aproximadamente 4.000 mg/día, aproximadamente 3.500 mg/día, aproximadamente 3.000 mg/día, aproximadamente 2.500 mg/día o aproximadamente 2.000 mg/día o menos. En otro caso, el segundo agente terapéutico es hidroxicloroquina, administrada a una dosis de aproximadamente 500 mg/día, aproximadamente 450 mg/día, aproximadamente 400 mg/día, aproximadamente 350 mg/día o aproximadamente 300 mg/día o menos.

20 En un ejemplo, se administra al paciente un tercer agente terapéutico, que puede ser, por ejemplo, metotrexato, leflunomida, sulfasalazina, hidroxicloroquina, infliximab, adalimumab, ertolizumab pegol, golimumab, etanercept, rituximab, tozilizumab o abatacept.

25 En un ejemplo, la administración de los agentes terapéuticos primero y segundo, y opcionalmente tercero, da como resultado una mayor mejora de los síntomas observada tras la administración de los agentes terapéuticos primero o segundo (o tercero) solos.

30 En algunos realización, un individuo se trata con uno o más agentes terapéuticos antes de recibir un tratamiento con anticuerpos anti-VLA-1, tal como una infusión de una terapia anti-VLA-1, por ejemplo, para prevenir o aliviar las reacciones adversas a la administración de anticuerpos anti-VLA-1, por ejemplo, para prevenir o mejorar los efectos adversos asociados con la infusión de un anticuerpo anti-VLA-1. Los regímenes de pretratamiento ilustrativos incluyen, por ejemplo, el tratamiento con uno o más de un analgésico, tal como acetaminofén, una antihistamina o un esteroide, tal como un corticosteroide, tal como metilprednisolona. En un ejemplo, se administra a un individuo, tal como a un paciente de AR, acetaminofén o un antihistamínico antes de la administración de un anticuerpo anti-VLA-1, tal como antes de la infusión con un anticuerpo anti-VLA-1. En un ejemplo, se administra a un paciente con AR un corticosteroide (también llamado un glucocorticoide), tal como metilprednisolona, antes del tratamiento con un anticuerpo anti-VLA-1.

40 En un ejemplo, el pretratamiento, tal como el corticosteroide, tal como la metilprednisolona, se administra a una dosis de aproximadamente 50 mg/75 kg de ser humano, aproximadamente 75 mg/75 kg de ser humano, aproximadamente 100 mg/75 kg de ser humano, aproximadamente 125 mg/75 kg de ser humano, o aproximadamente 150 mg/75 kg de ser humano.

45 En otro caso, el pretratamiento se administra de aproximadamente 15 minutos a aproximadamente una hora o más, por ejemplo, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 45 minutos, o aproximadamente una hora o más, antes de la administración del anticuerpo anti-VLA-1, tal como antes de la infusión del anticuerpo anti-VLA-1.

El pretratamiento se puede administrar, por ejemplo, mediante suministro intravenoso, tal como mediante infusión.

50 En algunos casos, puede usarse un segundo agente para tratar uno o más síntomas o efectos secundarios de la AR.

55 Además de un segundo agente, también es posible suministrar al individuo otros agentes. Sin embargo, en algunos ejemplos, no se administra ninguna proteína o agente biológico, diferente del anticuerpo anti-VLA-1 y el segundo agente, al individuo como composición farmacéutica. El anticuerpo anti-VLA-1 y el segundo agente pueden ser los únicos agentes que se suministran mediante inyección. En los ejemplos en que el anticuerpo anti-VLA-1 y el segundo agente son proteínas recombinantes, el anticuerpo anti-VLA-1 y el segundo agente pueden ser los únicos agentes recombinantes administrados al individuo, o al menos los únicos agentes recombinantes que modulan las respuestas inmunitarias o inflamatorias. En otros ejemplos más, el anticuerpo anti-VLA-1 solo es el único agente recombinante o el único agente biológico administrado al individuo.

60 Los siguientes ejemplos no pretenden ser limitativos.

Ejemplos

65 Ejemplo 1. Las características biofísicas del anticuerpo anti-VLA-1 se evaluaron en diversas formulaciones de anticuerpos.

Las características biofísicas del anticuerpo anti-VLA-1 se examinaron para determinar, entre otros, la estabilidad térmica y conformacional del anticuerpo en presencia de diversos tampones y excipientes.

Los tampones enumerados en la tabla 1 se evaluaron para evaluar la estabilidad conformacional de SAN-300.

5

Tabla 1. Tampones

| Tampón | pH |
|-----------------|-----|
| Glutamato 30 mM | 4,5 |
| | 5,0 |
| Acetato 30 mM | 4,5 |
| | 5,5 |
| Citrato 30 mM | 5,0 |
| | 6,0 |
| Succinato 30 mM | 5,5 |
| | 6,5 |
| Histidina 30 mM | 6,0 |
| | 7,0 |
| Fosfato 30 mM | 6,5 |
| | 7,5 |

10 La concentración proteica objetivo para los estudios biofísicos fue de 2 mg/ml. Las muestras de proteína se sometieron a intercambio de tampón usando concentradores Amicon Ultra-4 (30 k MWCO, RC Membrane) en los tampones indicados en la tabla 1. La concentración de proteína en las muestras se midió mediante espectroscopía de UV-Vis usando un coeficiente de extinción de 1,53 ml/mg*cm. Para el cribado biofísico inicial, se determinó la estabilidad térmica y conformacional de la proteína en diversos tampones utilizando differential scanning calorimetry (calorimetría diferencial de barrido - DSC) y dynamic light scattering (dispersión de luz dinámica - DLS). La DSC mide la desnaturalización, temperatura de fusión y entalpía. La DLS proporciona una medida de la agregación. Las muestras se analizaron a 2 mg/ml en los diversos tampones de formulación. El volumen final para cada formulación fue de ~1,0 ml (~24 mg de proteína para todo el estudio).

15 Los datos de DSC se resumen en la tabla 2. Las formulaciones A-L en la tabla 2 se proporcionan para aumentar el pH. El glutamato no proporcionó picos claros, véase la formulación A, lo que indica que es menos deseable.

20

Tabla 2. Resultados de DSC

| Formulación | Tampón | Temperatura de inicio (°C) | T _{m1} (°C) | T _{m2} (°C) | T _{m3} (°C) |
|-------------|-------------------------|----------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| A | Glutamato 30 mM, pH 4,5 | NA _a | 76,99 | ND | ND |
| B | Glutamato 30 mM, pH 5,0 | 58 | 66,96 | 78,63 | 81,13b |
| C | Acetato 30 mM, pH 4,5 | 53 | 62,28 | 76,11 | 80,90b |
| D | Acetato 30 mM, pH 5,5 | 60 | 70,01 | 79,01 | 83,38b |
| E | Citrato 30 mM, pH 5,0 | 54 | 64,20 | 76,02 | 81,26b |
| F | Citrato 30 mM, pH 6,0 | 60 | 69,78 | 77,62 | 83,29 |
| G | Succinato 30 mM, pH 5,5 | 58 | 68,71 | 78,05 | 83,22 |
| H | Succinato 30 mM, pH 6,5 | 61 | 71,43b | 77,81 | 83,65 |
| I | Histidina 30 mM, pH 6,0 | 58 | 68,82 | 78,49 | 83,16 |
| J | Histidina 30 mM, pH 7,0 | 60 | 71,80b | 77,89 | 84,06 |
| K | Fosfato 30 mM, pH 6,5 | 61 | 71,45b | 77,56 | 83,73 |
| L | Fosfato 30 mM, pH 7,5 | 58 | 71,29b | 76,94 | 82,94 |

T_{m1} significa la temperatura para el inicio de la fusión.

- 25 _a Los datos fueron insuficientes para la determinación de la temperatura al inicio.
- _b Pico que apareció como una cresta de la curva de DSC y no pudo ser identificado con software de análisis de picos. El valor mostrado se recogió manualmente.

30 Los datos de DSC se resumen en la tabla 3. El valor Z promedio es el diámetro promedio de todas las especies. P_{di}, el índice de polidispersidad, es una medida de la polidispersibilidad y se correlaciona positivamente con la agregación. Se desea un valor inferior a 0,2 para P_{di}. Los valores que se acercan a 0,2 son menos deseables; por ejemplo, el valor de 0,185 para la formulación B es menos deseable. Véase la tabla 3.

Tabla 3. Resultados de DLS

| Tampón | pH | Z- Promedio | Pdi | Pk1 media Int (d.nm) | Pk2 Int promed (d.nm) | Pk3 Int promed (d.nm) | Anchura Pk1 Int (d.nm) | Anchura int Pk2 Int (d.nm) | Anchura Pk3 Int (d.nm) |
|--------------------|-----|----------------|-------|-------------------------|-----------------------------|-----------------------------|------------------------------|----------------------------------|------------------------------|
| 30 mM Glutamato | 4,5 | 11,28 | 0,106 | 11,48 | ND | ND | 1,438 | ND | ND |
| 30 mM Glutamato | 5,0 | 12,45 | 0,185 | 12,05 | 1608 | 5017 | 1,77 | 856,6 | 524,2 |
| Acetato 30 mM | 4,5 | 11,15 | 0,065 | 11,53 | ND | ND | 1,398 | ND | ND |
| Acetato 30 mM | 5,5 | 10,96 | 0,026 | 11,21 | ND | ND | 1,078 | ND | ND |
| Citrato 30 mM | 5,0 | 11,41 | 0,075 | 11,84 | ND | ND | 1,61 | ND | ND |
| Citrato 30 mM | 6,0 | 11,23 | 0,019 | 11,44 | ND | ND | 1,109 | ND | ND |
| Succinato 30 mM | 5,5 | 11,82 | 0,12 | 11,95 | ND | ND | 1,55 | ND | ND |
| Succinato 30 mM | 6,5 | 11,24 | 0,079 | 11,69 | ND | ND | 2,589 | ND | ND |
| Histidina 30 mM | 6,0 | 10,84 | 0,067 | 11,22 | ND | ND | 2,025 | ND | ND |
| Histidina 30 mM | 7,0 | 10,32 | 0,077 | 10,62 | ND | ND | 1,88 | ND | ND |
| Fosfato 30 mM | 6,5 | 10,89 | 0,032 | 11,18 | ND | ND | 1,674 | ND | ND |
| Fosfato 30 mM | 7,5 | 11,93 | 0,016 | 11,11 | ND | ND | 1,229 | ND | ND |

- 5 Generalmente, la estabilidad de las formulaciones aumenta con el aumento del pH. Se determinó que un pH de 4,5 o inferior no era óptimo. No se observó agregación en ninguna de las condiciones de tampón, y la temperatura de fusión era de > 50 °C (TM1 > 50 °C). Se determinó que el glutamato era el tampón menos favorable, y el citrato no tenía propiedades claramente preferidas.
- 10 **Cribado de excipientes.** La estabilidad conformacional y térmica de las formulaciones que comprenden SAN-300 y diversos excipientes se evaluaron después del intercambio en las formulaciones enumeradas a continuación. Para el cribado de excipientes, se caracterizaron los efectos del tampón en la proteína (~2 mg/ml) utilizando DSC y DLS.

Tabla 4. Resultados del cribado de excipientes por DSC

15

| Formulación | Tampón | Excipiente | Temperatura de inicio (°C) | Tm1 (°C) | Tm2 (°C) | Tm3 (°C) |
|-------------|----------------------------|------------------|-------------------------------|--------------------|-------------|-------------|
| A | Acetato 30 mM, pH 5,0 | NaCl 150 mm | 57 | 65,06 | 76,25 | 82,26 |
| B | | Sorbitol 250 mM | 59 | 67,82 | 78,49 | 83,66 |
| C | | Sacarosa 250 mM | 59 | 68,12 | 78,65 | 83,84 |
| D | | Trehalosa 250 mM | 58 | 67,06 | 77,76 | 83,45a |
| E | | Manitol 250 mM | 59 | 67,82 | 78,48 | 83,68a |
| F | Succinato 30 mM, pH 6,0 | NaCl 150 mm | 60 | 70,31 | 77,50 | 83,68 |
| G | | Sorbitol 250 mM | 60 | 71,35 | 77,98 | 84,32 |
| H | | Sacarosa 250 mM | 62 | 71,60 ^a | 78,19 | 84,71 |
| I | | Trehalosa 250 mM | 62 | 71,89 ^a | 78,43 | 84,77 |
| J | | Manitol 250 mM | 60 | 71,45 ^a | 77,90 | 84,39 |
| K | Histidina 30 mM, pH 6,5 | NaCl 150 mm | 62 | 69,30 | 77,32 | 83,34 |
| L | | Sorbitol 250 mM | 63 | 72,04 ^a | 78,44 | 84,77 |
| M | | Sacarosa 250 mM | 62 | 72,27 ^a | 78,58 | 84,93 |
| N | | Trehalosa 250 mM | 63 | 72,33 ^a | 78,83 | 85,01 |

| | | | | | | |
|---|--------------------------|------------------|----|--------------------|-------|-------|
| O | | Manitol 250 mM | 62 | 71,84 ^a | 78,29 | 84,62 |
| P | Fosfato 30 mM, pH 7,0 | NaCl 150 mm | 60 | 71,28 ^a | 77,06 | 83,41 |
| Q | | Sorbitol 250 mM | 61 | 72,27 ^a | 76,14 | 83,48 |
| R | | Sacarosa 250 mM | 61 | 72,11 ^a | 76,48 | 83,51 |
| S | | Trehalosa 250 mM | 61 | 73,15 ^a | 76,79 | 83,81 |
| T | | Manitol 250 mM | 60 | 71,94 ^a | 75,92 | 83,26 |

^a Pico que apareció como una cresta de la curva de DSC y no pudo ser identificado con software de análisis de picos. El valor mostrado se recogió manualmente.

Tabla 5. Resultados del cribado de excipientes por DLS

5

| Formulación | Z-prom (d.nm) | Pdl | Pk1 Int prom (d.nm) | Pk2 Int prom (d.nm) | Pk3 Int prom (d.nm) | Pk1 Anchura (d.nm) | Pk2 Anchura (d.nm) | Pk3 Anchura (d.nm) |
|-------------|---------------|-------|---------------------|---------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| A | 11,71 | 0,095 | 12 | 0 | 0 | 1,754 | 0 | 0 |
| B | 11,74 | 0,052 | 12,46 | 0 | 0 | 2,521 | 0 | 0 |
| C | 17,72 | 0,387 | 14,26 | 183,1 | 0 | 2,478 | 49,72 | 0 |
| D | 14,43 | 0,276 | 15,82 | 1380 | 1,591 | 3,475 | 640 | 0,111 |
| E | 12,52 | 0,159 | 13,25 | 1688 | 0 | 3,529 | 863,6 | 0 |
| F | 11,22 | 0,016 | 11,41 | 0 | 0 | 1,097 | 0 | 0 |
| G | 11,98 | 0,048 | 12,64 | 0 | 0 | 2,187 | 0 | 0 |
| H | 18,01 | 0,435 | 14,99 | 245,6 | 0 | 2,725 | 77,19 | 0 |
| I | 14,51 | 0,287 | 15,95 | 2038 | 1,631 | 3,347 | 1025 | 0,1261 |
| J | 12,47 | 0,113 | 13,71 | 0 | 0 | 3,79 | 0 | 0 |
| K | 11,56 | 0,122 | 12,71 | 0 | 0 | 4,188 | 0 | 0 |
| L | 11,43 | 0,093 | 12,43 | 0 | 0 | 2,162 | 0 | 0 |
| M | 21,57 | 0,582 | 13,93 | 128,8 | 767,1 | 2,303 | 38,08 | 317,6 |
| N | 12,06 | 0,226 | 14,53 | 1,417 | 0 | 3,035 | 0,1048 | 0 |
| O | 12,07 | 0,167 | 12,81 | 0 | 0 | 2,415 | 0 | 0 |
| P | 11,46 | 0,09 | 11,93 | 0 | 0 | 2,74 | 0 | 0 |
| Q | 13,19 | 0,171 | 14,29 | 101,7 | 338,7 | 4,074 | 42,57 | 112,8 |
| R | 17,23 | 0,383 | 14,79 | 150,7 | 0 | 2,88 | 40,26 | 0 |
| S | 13,37 | 0,226 | 15,74 | 1,473 | 4842 | 3,386 | 0,1095 | 686,7 |
| T | 12,27 | 0,116 | 13,7 | 0 | 0 | 3,284 | 0 | 0 |

Pk1=pico correspondiente a anticuerpo anti-VLA-1

PK2 y Pk3 = picos correspondientes a agregados

^a Las formulaciones se describen en la tabla 4.

10 La temperatura de inicio y Tm determinada mediante DSC se muestran en la tabla 4. Los datos DLS se muestran en la tabla 5.

15 Los datos de DSC indicaron que ninguno de los excipientes sometidos a prueba tuvo un efecto pronunciado en la temperatura de fusión (Tm1). Para todos los excipientes, la temperatura de fusión fue de > 50 °C. La temperatura de congelación en NaCl era inferior, según lo esperado, y la temperatura de fusión en el azúcar y en los polioles era similar. La trehalosa, el manitol y la sacarosa eran menos preferidos. El sorbitol de poliol y NaCl fueron más preferidos.

Ejemplo 2. Características de solubilidad del anticuerpo anti-VLA-1.

20 Se realizaron estudios de solubilidad para maximizar, entre otros, la concentración del anticuerpo SAN-300. La solubilidad de SAN-300 se evaluó usando diversas formulaciones. Las formulaciones y los resultados se proporcionan en la tabla 6.

Tabla 6. Datos de solubilidad

| Tampón | Excipiente | Arginina | Aprox. proteína Total después de la primera concentración (mg) | Aprox. Contenido para que la muestra sea retirada (mg) | Tiempo de giro para la concentración final (min) | Aprox. volumen después de la concentración final (ml) | Contenido de proteína después de la concentración final (mg/ml) |
|-------------------------|-----------------|----------|--|--|--|---|---|
| Acetato 30 mM, pH 5,0 | NaCl 150 mM | 0 mM | 76,2 | 72,4 | 15,0 | 0,300 | 223,3 |
| | | 20 mM | 88,9 | 84,5 | 15,0 | 0,325 | 215,8 |
| | Sorbitol 250 mM | 0 mM | 80,3 | 76,6 | 15,0 | 0,275 | 225,1 |
| | | 20 mM | 77,4 | 73,5 | 15,0 | 0,250 | 220,6 |
| Succinato 30 mM, pH 6,0 | NaCl 150 mM | 0 mM | 91,2 | 86,7 | 15,0 | 0,350 | 218,7 |
| | | 20 mM | 88,2 | 83,5 | 15,0 | 0,325 | 219,0 |
| | Sorbitol 250 mM | 0 mM | 90,1 | 85,6 | 15,0 | 0,300 | 212,8 |
| | | 20 mM | 83,0 | 78,5 | 15,0 | 0,300 | 212,9 |
| Histidina 30 mM, pH 6,5 | NaCl 150 mM | 0 mM | 81,1 | 76,7 | 15,0 | 0,325 | 209,1 |
| | | 20 mM | 87,5 | 82,8 | 15,0 | 0,325 | 215,5 |
| | Sorbitol 250 mM | 0 mM | 81,4 | 77,3 | 15,0 | 0,325 | 196,5 |
| | | 20 mM | 77,6 | 73,7 | 15,0 | 0,350 | 219,4 |
| Fosfato 30 mM, pH 7,0 | NaCl 150 mM | 0 mM | 92,8 | 88,2 | 25,0 | 0,300 | 255,7 |
| | | 20 mM | 86,0 | 81,7 | 25,0 | 0,275 | 259,7 |
| | Sorbitol 250 mM | 0 mM | 92,4 | 88,0 | 25,0 | 0,300 | 256,6 |
| | | 20 mM | 99,7 | 95,1 | 25,0 | 0,300 | 219,1 |

5 **Preparación de muestra.** Las muestras de proteína se intercambiaron en los tampones indicados utilizando concentradores Amicon Ultra-4 (MWCO 30K). Los concentradores se aclararon previamente con 3 ml de tampón seguido de centrifugación a ~3000 x g durante 5 minutos. Para cada formulación, se diluyeron 1,7 ml de SAN-300 (69 mg/ml) con 2,3 ml del tampón apropiado en un concentrador aclarador y se redujo el volumen en ~2 ml por centrifugación a ~3000 x g, dando como resultado una concentración de proteína de ~60 mg/ml. Este proceso se repitió para un total de cuatro ciclos de intercambio de tampones. A continuación, la concentración de proteínas se midió por duplicado por espectroscopía de UV-Vis mediante el uso de cubetas de UV Eppendorf desechables (1,0 cm de longitud de trayectoria) y un coeficiente de extinción de 1,53 ml/mg*cm. Se diluyó un volumen de 10 µl de las muestras concentradas en 990 µl del tampón adecuado hasta una concentración de ~0,5 mg/ml.

10 A continuación se concentraron las muestras a 3.000 x g (o menos) hasta que se observó precipitación o el volumen de la muestra se redujo a la mitad, momento en que se midió la concentración de proteína como se ha descrito anteriormente con un incremento adecuado en el volumen de dilución. Cada muestra se concentró adicionalmente y se midió según la tabla, o hasta que se observó precipitación. Se registraron las concentraciones de proteína y el porcentaje de recuperación para cada formulación. Se usaron aproximadamente 1.900 mg de proteína para todo el estudio.

Ejemplo 3. Estudios de tensioactivo

20 Se evaluó el papel del tensioactivo en la reducción de la pérdida de proteínas y la minimización de la agregación. Las muestras se analizaron en términos de aspecto, UV-Vis, DLS y SEC-HPLC para evaluar la estabilidad/agregación en las muestras sometidas a estrés. Las formulaciones utilizadas en los estudios de tensioactivo se resumen en la tabla 7.

Tabla 7. Formulaciones para estudios de tensioactivo

25

| Tampón | Excipiente | Concentración de Tween-80 (%) |
|-------------------------|-----------------|-------------------------------|
| Acetato 30 mM, pH 5,0 | NaCl 150 mM | 0 |
| | | 0,005 |
| | | 0,020 |
| | Sorbitol 250 mM | 0 |
| | | 0,005 |
| | | 0,020 |
| Succinato 30 mM, pH 6,0 | NaCl 150 mM | 0 |
| | | 0,005 |
| | | 0,020 |
| | Sorbitol 250 mM | 0 |
| | | 0,005 |
| | | 0,020 |

| | | |
|-------------------------|-----------------|-------|
| | | 0,020 |
| Histidina 30 mM, pH 6,5 | NaCl 150 mM | 0 |
| | | 0,005 |
| | | 0,020 |
| | Sorbitol 250 mM | 0 |
| | | 0,005 |
| | | 0,020 |
| Fosfato 30 mM, pH 7,0 | NaCl 150 mM | 0 |
| | | 0,005 |
| | | 0,020 |
| | Sorbitol 250 mM | 0 |
| | | 0,005 |
| | | 0,020 |

Resultados. El tensioactivo se analizó en términos de su efecto sobre la pérdida y agregación de proteína. Se evaluó el polisorbato 80 (Tween 80) en dos niveles de concentración para cada agitación y congelamiento/descongelamiento. Las muestras sometidas a estrés por agitación mostraron una opalescencia significativa sin Tween 80.

5 Se halló que Tween 80 influía en el estrés por agitación. El efecto no fue dependiente de la concentración a las concentraciones evaluadas.

10 Tween 80 no influyó en la agregación, a ninguna concentración, en la congelación/descongelación.

En estudios de SEC (size exclusion chromatography [cromatografía de exclusión por tamaño]), Tween 80 no influía a ninguna concentración. El acetato y la histidina tenían propiedades tamponadoras preferidas. Se observó menos agregación en acetato e histidina y, por lo tanto, estos eran tampones preferidos.

15 En estudios de DLS, Tween 80 protegía contra los efectos de agitación, aunque el efecto fue independiente de la concentración a las concentraciones estudiadas. No se observó ningún efecto debido a Tween en los experimentos de congelación/descongelación y el sorbitol presentó mejores resultados.

20 Preparación de la muestra para el ejemplo 3. El SAN-300 se formuló con y sin Tween 80 (es decir, polisorbato 80) con una concentración objetivo de SAN-300 de ~200 mg/ml. Las muestras de proteína se sometieron a intercambio de tampón mediante el uso de concentradores Amicon Ultra (30K MWCO, Ultracel Membrane, n.º de cat. UFC 903008) en las combinaciones de tampón/excipientes (excluyendo el tensioactivo) indicadas en la tabla 7.

25 Se usó un total de ~1.600 mg (23 ml) de SAN-300 para cada combinación de tampón/excipientes y el volumen se dividió en dos concentradores que se diluyeron con el tampón apropiado hasta un volumen de 15 ml. Las muestras se concentraron a ~7,5 ml y se diluyeron en el tampón apropiado hasta un volumen total de 15 ml. Este proceso se repitió durante un total de 4 ciclos. A continuación se redujeron los volúmenes de muestra hasta lograr la concentración objetivo (~2 ml por tubo). Se agruparon los concentrados duplicados y el contenido de proteína se determinó por duplicado mediante espectroscopía de UV-Vis diluyendo 50 µl en 49,95 ml de SFI 0,9 % volumétricamente y utilizando un coeficiente de extinción de 1,53 ml/mg*cm.

35 Las muestras agrupadas se dividieron a continuación en tres alícuotas de 1,2 ml y se añadió Tween 80 a las muestras alícuotas a la concentración especificada. Las muestras formuladas se sometieron a estrés mediante ciclos de congelamiento-descongelamiento y estrés mecánico por agitación, además de una pequeña alícuota reservada como un control sin estrés (almacenado a 2-8 °C) mediante análisis de SEC-HPLC. Para ambas formas de estrés, se transfirieron 0,5 ml de muestra a viales de vidrio de borosilicato de tipo 1 (tamaño de 2 ml). Para los ciclos de congelación-descongelación, la muestra se congeló a -80 °C durante ≥ 90 minutos y a continuación se dejó descongelar a temperatura ambiente. Este proceso se repitió durante un total de 5 ciclos. La muestra se almacenó a continuación a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta la realización del análisis. Para el estrés por agitación, se colocaron las muestras en un agitador de microplaca durante un intervalo de 24 a 48 horas a temperatura ambiente. Las muestras se almacenaron a continuación a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta la realización del análisis.

Ejemplo 4. Diseño de experimentos (DOE) de preformulación

45 Los tampones de la tabla 8 se evaluaron a una concentración de 200 mg/ml de SAN-300 para DOE (diseño de experimentos) de preformulación. Las muestras 1 a 28 fueron para la evaluación de Tween 80. Las muestras 29 a 36 se generaron para probar la idoneidad de Tween-20 como excipiente. Para el DOE, cada muestra de pH axial se preparó por duplicado, preparándose las muestras de pH en el punto central por triplicado. Para las investigaciones de Tween-20, se prepararon muestras por duplicado en puntos centrales del pH.

Tabla 8. Tampones para DOE (diseño de experimentos) de preformulación

| Núm. muestra | Tampón | pH | Excipiente | Tensioactivo |
|--------------|-----------------|-----|-----------------|-----------------|
| 1 | Acetato 30 mM | 4,5 | NaCl 150 mM | Tween 80 0,01 % |
| 2 | Acetato 30 mM | 4,5 | NaCl 150 mM | Tween 80 0,01 % |
| 3 | Acetato 30 mM | 5,0 | NaCl 150 mM | Tween 80 0,01 % |
| 4 | Acetato 30 mM | 5,0 | NaCl 150 mM | Tween 80 0,01 % |
| 5 | Acetato 30 mM | 5,0 | NaCl 150 mM | Tween 80 0,01 % |
| 6 | Acetato 30 mM | 5,5 | NaCl 150 mM | Tween 80 0,01 % |
| 7 | Acetato 30 mM | 5,5 | NaCl 150 mM | Tween 80 0,01 % |
| | | | | |
| 8 | Acetato 30 mM | 4,5 | Sorbitol 250 mM | Tween 80 0,01 % |
| 9 | Acetato 30 mM | 4,5 | Sorbitol 250 mM | Tween 80 0,01 % |
| 10 | Acetato 30 mM | 5,0 | Sorbitol 250 mM | Tween 80 0,01 % |
| 11 | Acetato 30 mM | 5,0 | Sorbitol 250 mM | Tween 80 0,01 % |
| 12 | Acetato 30 mM | 5,0 | Sorbitol 250 mM | Tween 80 0,01 % |
| 13 | Acetato 30 mM | 5,5 | Sorbitol 250 mM | Tween 80 0,01 % |
| 14 | Acetato 30 mM | 5,5 | Sorbitol 250 mM | Tween 80 0,01 % |
| | | | | |
| 15 | Histidina 30 mM | 6,0 | NaCl 150 mM | Tween 80 0,01 % |
| 16 | Histidina 30 mM | 6,0 | NaCl 150 mM | Tween 80 0,01 % |
| 17 | Histidina 30 mM | 6,5 | NaCl 150 mM | Tween 80 0,01 % |
| 18 | Histidina 30 mM | 6,5 | NaCl 150 mM | Tween 80 0,01 % |
| 19 | Histidina 30 mM | 6,5 | NaCl 150 mM | Tween 80 0,01 % |
| 20 | Histidina 30 mM | 7,0 | NaCl 150 mM | Tween 80 0,01 % |
| 21 | Histidina 30 mM | 7,0 | NaCl 150 mM | Tween 80 0,01 % |
| | | | | |
| 22 | Histidina 30 mM | 6,0 | Sorbitol 250 mM | Tween 80 0,01 % |
| 23 | Histidina 30 mM | 6,0 | Sorbitol 250 mM | Tween 80 0,01 % |
| 24 | Histidina 30 mM | 6,5 | Sorbitol 250 mM | Tween 80 0,01 % |
| 25 | Histidina 30 mM | 6,5 | Sorbitol 250 mM | Tween 80 0,01 % |
| 26 | Histidina 30 mM | 6,5 | Sorbitol 250 mM | Tween 80 0,01 % |
| 27 | Histidina 30 mM | 7,0 | Sorbitol 250 mM | Tween 80 0,01 % |
| 28 | Histidina 30 mM | 7,0 | Sorbitol 250 mM | Tween 80 0,01 % |
| | | | | |
| 29 | Acetato 30 mM | 5,0 | NaCl 150 mM | Tween 20 0,01 % |
| 30 | Acetato 30 mM | 5,0 | NaCl 150 mM | Tween 20 0,01 % |
| 31 | Acetato 30 mM | 5,0 | Sorbitol 250 mM | Tween 20 0,01 % |
| 32 | Acetato 30 mM | 5,0 | Sorbitol 250 mM | Tween 20 0,01 % |
| 33 | Histidina 30 mM | 6,5 | NaCl 150 mM | Tween 20 0,01 % |
| 34 | Histidina 30 mM | 6,5 | NaCl 150 mM | Tween 20 0,01 % |
| 35 | Histidina 30 mM | 6,5 | Sorbitol 250 mM | Tween 20 0,01 % |
| 36 | Histidina 30 mM | 6,5 | Sorbitol 250 mM | Tween 20 0,01 % |

5 Resultados. Se colocó un vial de cada formulación a 5 °C y uno a 50 °C (condición de estrés) para la incubación de 28 días. Los datos recogidos después de 28 días de almacenamiento se analizaron para determinar su significación estadística.

10 Las series de datos del acetato indican que una formulación preferida contiene sorbitol y tiene un pH ~5,50.

La serie de datos de la histidina indican que se prefiere un pH ~6,00. Con la excepción de los datos de HPLC, todos los demás indicadores favorecían el sorbitol como excipiente preferido. Los efectos del sorbitol y del NaCl en muestras de histidina fueron más similares que los observados para las formulaciones de acetato.

15 Los datos de exclusión por tamaño fueron esencialmente idénticos para el NaCl y el sorbitol, mientras que los datos de respuesta a CEX de 50 °C altamente cualitativos indicaron que el NaCl es un excipiente preferido para las

formulaciones de histidina. Los cromatogramas CEX también indicaron un mayor nivel de degradación en presencia de acetato en comparación con la histidina.

5 Estas conclusiones se obtuvieron a partir de formulaciones que contenían el tensioactivo PS-80 a una concentración de aproximadamente 0,01 %. Para evaluar el efecto de un tensioactivo alternativo, se prepararon muestras de off-DEO a valores de pH de punto medio que contenían PS-20 a aproximadamente 0,01 %. La evaluación de los datos puso de manifiesto que no había una diferencia clara entre los dos tipos de tensioactivos, como indicaron los métodos de SEC (size exclusion chromatography [cromatografía de exclusión por tamaño]), CEX (cation exchange chromatography [cromatografía de intercambio catiónico]), DSC y UV-vis. Sin embargo, los resultados de las pruebas de DLS y de análisis del aspecto eran menos óptimos con PS-20. Las mediciones de dispersión de luz de muestras de acetato 30 mM, NaCl 150 mM, PS-20, pH 5,0, mostraron una polidispersidad excesiva, que no se observó en muestras comparables que contenían PS-80. Sin embargo, la polidispersidad resultó evidente en las muestras respectivas de PS-80, acetato/NaCl a pH 4,5. Además, durante las pruebas de análisis de aspecto al cabo de 4 semanas, se observó que un total de 9 muestras (de un total de 72) contenían materia en forma de partículas visible. De estas, seis fueron formulaciones de PS-20 (~38 % de 16 muestras). Dado que no se obtiene una ventaja clara con PS-20 en comparación con el PS 80, este último tensioactivo fue preferido para la realización de otros estudios.

La formulación de acetato que contiene sorbitol fue ligeramente preferida en comparación con la formulación de histidina en todas las condiciones analizadas salvo la HPLC. Esta preferencia por el acetato era indicada principalmente por los datos de DLS. Estos datos, sin embargo, también indicaban la predicción de que la formulación de acetato preferida tenía un porcentaje mayor de especies agregadas (en ~1 %) en relación con la formulación de histidina preferida. La mayor propensión de la formación de agregados en el acetato podría ser, por sí misma, suficiente para favorecer el empleo de la formulación de histidina/sorbitol en estudios adicionales. Sin embargo, una ventaja de la formulación de acetato/sorbitol era su reducida viscosidad. En una evaluación adicional de SAN-300, esta viscosidad reducida podría permitir el uso de formulaciones de mayor concentración, además de disminuir la carga en sistemas de filtración de flujo tangencial.

Por lo tanto, se seleccionaron las siguientes formulaciones candidatas para los estudios de degradación forzada y desarrollo de la formulación:

- 30 1. acetato 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5 y
2. histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-80 0,01 %, pH 6,0.

Dado que para las formulaciones de histidina los resultados correspondientes al polisorbato 20 fueron similares a los del polisorbato 80, se diseñó una formulación de histidina donde se sustituía el polisorbato 20 por el polisorbato 80 para evitar cualquier efecto de amarilleo que se produce a veces con las formulaciones de polisorbato 80/histidina.

Preparación de la muestra para el ejemplo 4. Las muestras se sometieron a intercambio de tampón y se concentraron utilizando concentradores de Amicon-15 (n.º de cat. UFC903024). Los concentradores se sometieron a aclarado previo con el tampón adecuado añadiendo 5 ml de tampón al filtro, seguido de centrifugación a ~3.200 x g durante 5 minutos. Para cada formulación, se repartió un total de 13 ml de SAN-300 (69 mg/ml) entre los concentradores de Amicon-15 por duplicado y se diluyeron hasta 15 ml con el tampón de formulación apropiada. En el caso de una muestra de punto central único para cada formulación, se dividió un total de 19,5 ml de SAN-300 entre concentradores por triplicado conforme al volumen de muestra necesario para la prueba de osmolalidad y de viscosidad. Las formulaciones Tween-20 se prepararon con 13 ml de SAN-300. Para el intercambio de tampones, los concentradores se centrifugaron hasta que el volumen alcanzó ~7,5 ml, y las muestras se diluyeron con tampón de formulación a 15 ml para un total de 4 ciclos. Se usó un total de ~33 g de proteína para el estudio

Después del intercambio de tampón de SAN-300 en los distintos tampones, las muestras se concentraron a < 1,5 ml, y el contenido de los concentradores por duplicado (o por triplicado) se agruparon en una sola fracción. Un estudio de cribado de tensioactivos anterior mostró una pérdida de proteínas de 20-32 % durante un proceso idéntico de intercambio de tampones y concentración. Suponiendo una pérdida de 35 % en el peor de los casos, los 13 ml de partida de SAN-300 producirían ~2,9 ml de concentrado a 200 mg/ml. El material se mezcló mediante pipeteado ascendente y descendente antes de transferirlo a tubos cónicos de 15 ml. La concentración de proteína en las muestras se midió mediante espectroscopía de UV-Vis usando un coeficiente de extinción de 1,53 ml/mg*cm y una longitud de trayectoria de 1 cm. Para diluir las muestras al valor objetivo de ~0,5 mg/ml, se diluyeron 50 µl del concentrado en 25 ml de NaCl 0,9 % volumétricamente y por duplicado. Las lecturas de A₂₈₀ por duplicado no deben diferir entre sí más de 5 %. Se preparó y se midió una tercera dilución, sin que las lecturas de A₂₈₀ difirieran más de 5 % entre sí. Las muestras se diluyeron o se concentraron adicionalmente según lo necesario para lograr la concentración objetivo de 200 mg/ml +/- 10 mg/ml.

Tras obtener concentraciones de 200 mg/ml para cada formulación, se añadió el volumen apropiado de PS-80 al 10 % (Surfact-Amps, Thermo-Fisher, n.º cat. 28328) o PS-20 10 % (n.º cat. 28320) para lograr una concentración final de aproximadamente 0,01 %. Las formulaciones se filtraron en condiciones estériles utilizando concentradores estériles de 0,22 µm Millipore Ultrafree-CL GV (n.º de cat. UFC40GV0S). Para la filtración en condiciones estériles, se transfirió todo el volumen de cada formulación a un filtro estéril aparte, abriendo solo la parte superior del filtro. Las unidades Ultrafree-CL se centrifugaron a -3.200 x g durante 5 minutos o hasta que toda la solución había pasado a través de la

membrana de 0,22 µM. Tras la centrifugación, no se volvieron a abrir las unidades de filtrado hasta el momento de la introducción en viales, que se realizó dentro de una biosafety cabinet (cabina de bioseguridad - BSC).

5 Antes de la introducción en viales, se aclararon tres veces a ~75 viales de 2,0 ml (West n.º de cat.68000314) y un número similar de tapones FluroTec (West n.º de cat.19500040) en WFI (agua para inyección). Los tapones se colocaron doblemente en bolsas de autoclave y se esterilizaron en autoclave. Los viales se secaron en un horno a 80 °C. Tras el secado, se envolvió doblemente la gradilla de viales en papel de estaño fino, y a continuación se despirogenizó calentando a ~200 °C.

10 Para la introducción en viales, se utilizó una cabina de bioseguridad. Antes de su uso, se conectó la BSC durante al menos 15 minutos y a continuación se pulverizó con IPA al 70 %. Se utilizaron también guantes estériles y cubiertas para el brazo. Todos los artículos introducidos en la campana se pulverizaron con IPA al 70 % antes de introducirlos. Se introdujeron en la cabina de bioseguridad unidades de filtrado que contenían formulaciones estériles. Se utilizó un mínimo de 1,0 ml de volumen de relleno. El número de viales por formulación fue de 2 y el
15 resto permaneció en el filtro estéril para su uso como la muestra de tiempo cero. El análisis de aspecto de tiempo cero se realizó utilizando uno de los viales para cada formulación antes de la implantación.

Ejemplo 5A. Estudios de desarrollo de formulación

20 Para el desarrollo de la formulación, se evaluaron muestras de SAN-300 para analizar las siguientes propiedades: capacidad de aplicación con jeringa, viscosidad, osmolalidad, y compatibilidad de filtrado.

25 **Estudio de la capacidad de administración con jeringa.** La capacidad de aplicación con jeringa de SAN-300 de alta concentración se evaluó a la concentración objetivo. Para este estudio, se utilizó un total de 10 ml para cada formulación candidata. La fuerza (libras-fuerza (lbf)) requerida para expulsar cada solución se determinó mediante el uso de un instrumento Instron utilizando una jeringa de 1 ml y agujas de 25 G, 27 G y 30 G. Cada punto de datos se realizó por triplicado, utilizando una muestra nueva para cada medición. Las muestras se expulsaron a una
30 velocidad de 20 pulgadas/minuto (aproximadamente 10 ml/min) y se recolectaron en un vial de vidrio. Las muestras tras la expulsión se analizaron mediante DLS (sin diluir), SEC y análisis de aspecto. Se analizó como control una muestra de material formulado antes de la expulsión.

Los resultados del estudio de capacidad de administración con jeringa se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Desarrollo de formulación para la capacidad de administración con jeringa

35

| Formulación | Aguja | Muestra | Carga promedio (lbf) | Carga máxima (lbf) | Carga promedio media (lbf) | Carga máxima promedio (lbf) |
|--|------------|---------|----------------------|--------------------|----------------------------|-----------------------------|
| Acetato 30 mM Sorbitol 220 mM PS-80 0,01 % pH 5,5 | Calibre 25 | 1 | 1,57 | 1,59 | 1,45 ± 0,11 | 1,49 ± 0,09 |
| | | 2 | 1,44 | 1,48 | | |
| | | 3 | 1,35 | 1,41 | | |
| | Calibre 27 | 1 | 3,49 | 3,58 | 3,47 ± 0,08 | 3,54 ± 0,12 |
| | | 2 | 3,38 | 3,42 | | |
| | | 3 | 3,54 | 3,64 | | |
| | Calibre 30 | 1 | 11,64 | 11,97 | 10,72 ± 0,79 | 11,09 ± 0,77 |
| | | 2 | 10,26 | 10,60 | | |
| | | 3 | 10,26 | 10,70 | | |
| Histidina 30 mM Sorbitol 220 mM PS-20 0,01 % pH 6,0 | Calibre 25 | 1 | 1,26 | 1,28 | 1,28 ± 0,04 | 1,32 ± 0,04 |
| | | 2 | 1,25 | 1,30 | | |
| | | 3 | 1,33 | 1,36 | | |
| | Calibre 27 | 1 | 2,92 | 3,04 | 2,88 ± 0,04 | 2,94 ± 0,08 |
| | | 2 | 2,86 | 2,89 | | |
| | | 3 | 2,86 | 2,90 | | |
| | Calibre 30 | 1 | 13,12 | 13,28 | 11,01 ± 1,89 | 11,21 ± 1,89 |
| | | 2 | 9,45 | 9,59 | | |
| | | 3 | 10,47 | 10,74 | | |

40 **Mediciones de viscosidad.** Se agruparon muestras de acetato/sorbitol/PS-80 y de histidina/sorbitol/PS-80 (5 °C) a partir del DOE, independientemente del pH. Después, las muestras se diluyeron hasta 190 mg/ml y 180 mg/ml en el tampón adecuado, y se midieron las viscosidades y el contenido de proteínas (tabla 14).

La viscosidad de SAN-300 se midió usando un reómetro Brookfield DV-III Ultra programable. Antes de la medición de la muestra, se calibró la eficacia del viscosímetro utilizando un patrón de viscosidad certificado. Después de la medición

del patrón, se cargaron 0,5 ml de muestra pura en el viscosímetro. Las mediciones de viscosidad se realizaron a múltiples valores de par de torsión.

- 5 Las muestras sin diluir presentaron un comportamiento no Newtoniano, como lo demostró la pequeña disminución de la viscosidad a velocidades de cizallamiento más altas. El comportamiento de ambos tampones se torna más Newtoniano a medida que se diluye el SAN-300.

Tabla 14. Resultados de los estudios de viscosidad

| Tampón | Excipiente | pH | Con. objetivo (mg/ml) | Viscosidad 3 rpm (cP) | Viscosidad 6 rpm (cP) | Viscosidad 9 rpm (cP) |
|-----------------|-----------------|------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| Acetato 30 mM | | ~5,0 | Puro | 17,8 | 17,3 | 17,2 |
| Histidina 30 mM | | ~6,5 | Puro | 24,7 | 24,2 | 23,8 |
| Acetato 30 mM | Sorbitol 250 mM | ~5,0 | 190 | 14,0 | 13,7 | 13,6 |
| Histidina 30 mM | | ~6,5 | 190 | 18,0 | 17,6 | 17,5 |
| Acetato 30 mM | | ~5,0 | 180 | 11,1 | 11,0 | 11,0 |
| Histidina 30 mM | | ~6,5 | 180 | 14,1 | 13,7 | 13,7 |

- 10 **Estudios de compatibilidad de filtro.** Para evaluar la compatibilidad con la membrana, se introdujo 1 ml de solución de SAN-300 en una jeringa de 1 ml (BD n.º de cat. 309586) y se expulsó a través de los siguientes tipos de filtros:

- 15 i) membrana de PES de tamaño de poro de 0,22 µm (Millipore, n.º de cat. SLGPM33RS).
 ii) membrana de PVDF de tamaño de poro de 0,22 µm (Millipore, n.º de cat. SLGVM33RS).
 iii) membrana de acetato de celulosa de tamaño de poro de 0,22 µm (Whatman, n.º de cat. 10462200)
- 20 Se registró el aspecto antes y después de la filtración. Las muestras se analizaron por UV Vis, DLS (sin diluir) y SEC. Se compararon los datos con una muestra de control sin procesar.

La tabla 15 muestra la pérdida de proteínas después de la eyección a través de diferentes tipos de filtros.

25 Tabla 15. Resultados de estudios de compatibilidad del filtro

| Tampón | Excipiente | pH | Condición | Conc. de partida (mg/ml) | Conc. Final (mg/ml) | Pérdida de proteína (%) |
|-----------------|-------------------------------|-----|---------------------|--------------------------|---------------------|-------------------------|
| Acetato 30 mM | Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 % | 5,5 | Control 5 °C | 189,1 | 186,4 | 1,4 |
| Histidina 30 mM | Sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 % | 6,0 | Control 5 °C | 174,4 | 173,3 | 0,6 |
| Acetato 30 mM | Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 % | 5,5 | Acetato de celulosa | 189,1 | 186,0 | 1,6 |
| Histidina 30 mM | Sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 % | 6,0 | Acetato de celulosa | 174,4 | 176,1 | -1,0 |
| Acetato 30 mM | Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 % | 5,5 | PES | 189,1 | 186,4 | 1,4 |
| Histidina 30 mM | Sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 % | 6,0 | PES | 174,4 | 175,4 | -0,6 |
| Acetato 30 mM | Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 % | 5,5 | PVDF | 189,1 | 185,3 | 2,0 |
| Histidina 30 mM | Sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 % | 6,0 | PVDF | 174,4 | 174,8 | -0,2 |

Ejemplo 5B. Estudios de degradación forzada

- 30 Se realizaron estudios de degradación forzada de SAN-300 para garantizar la capacidad de los métodos analíticos para detectar y resolver los productos de degradación potenciales en dos formulaciones diferentes. Se usó un total de 4,5 ml (viales de 9 x 0,5 ml) de SAN-300 por formulación.

- 35 **Controles de la formulación.** Para los controles de formulación, se almacenó 1 vial de cada formulación de SAN-300 a 5 °C durante el tiempo que duró el estudio de estrés lumínico (ver más abajo), seguido de almacenamiento a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta el análisis.

- 40 **Estrés por congelación/descongelación.** Para los estudios de congelación/descongelación, la congelación se llevó a cabo colocando 1 vial de cada formulación de SAN-300 a -80 °C durante ≥ 2 horas. Las muestras se descongelan a temperatura ambiente y después se volvieron a llevar a -80 °C durante al menos 90 minutos. Las muestras se sometieron a 5 ciclos de congelación/descongelación y a continuación se almacenaron a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta su análisis.

Estrés por calor. Para los estudios de estrés por calor, se almacenó 1 vial de cada formulación de SAN-300 a 50 °C. Después de 1 semana, las muestras se sacaron para someterlas a la prueba. Las muestras sacadas se almacenaron a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta la realización del análisis.

Estrés lumínico. Se realizaron estudios de fotoestabilidad siguiendo directrices de ICH Q1B para la exposición del producto a luz blanca fría y de UV cercano. Se expuso un vial de cada formulación de SAN-300 a 1,2 lux millón de horas de luz blanca y 200 W/m² de energía UV. En primer lugar, las muestras se expusieron a 8,00 k lux de luz blanca fría durante 150 horas. Después de esta exposición, las muestras se expusieron a 10,00 W/m² de luz UV durante 20 horas. La temperatura de la cámara se mantuvo a 5 °C durante la duración del estudio. Un control negativo para cada formulación que se envuelve doblemente con papel de aluminio se sometió a condiciones idénticas (es decir, los controles de la formulación). Después del estrés, las muestras se retiraron de la cámara de estabilidad y se almacenaron a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta el análisis.

Controles para estudios de hidrólisis y agitación. Para tener en cuenta los efectos de temperatura en los estudios de hidrólisis y estrés por agitación, se almacenó 1 vial de cada formulación de SAN-300 a 25 °C durante el tiempo que duraron los estudios de hidrólisis/agitación y a continuación se almacenó a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta su análisis.

Desamidación/hidrólisis básica. Para los estudios de desamidación catalizada con base, se valoró volumétricamente 1 vial de cada formulación de SAN-300 a pH \geq 9,0 con Tris 1M. La muestra se puso a continuación a 25 °C durante tres días. Al final del período de incubación, la muestra se sometió de nuevo a intercambio de tampones en el tampón de formulación apropiado utilizando un concentrador MWCO de 10 kDa (Millipore, n.º de cat. UFC801024) y se almacenó a continuación a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta la realización del análisis.

Desamidación/hidrólisis ácida. Para los estudios de desamidación catalizada con ácido, se valoró volumétricamente 1 vial de cada formulación de SAN-300 a pH 4,0 con HCl 1N. La muestra se puso a continuación a 25 °C durante tres días. Al final del período de incubación, la muestra se sometió de nuevo a intercambio de tampones en el tampón de formulación apropiado utilizando un concentrador MWCO de 10 kDa y se almacenó a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta su análisis.

Estrés por agitación/cizallamiento. Para los estudios de agitación, se colocó 1 vial de cada formulación de SAN-300 verticalmente sobre un agitador de microplacas a ~650 rpm durante tres días a temperatura ambiente. Las muestras se almacenaron a continuación a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta la realización del análisis.

Estrés por oxidación forzada Para los estudios de oxidación forzada, se introdujo peróxido de hidrógeno en 1 vial de cada formulación de SAN-300 hasta una concentración final de 0,04 % (V/V) y a continuación se incubó a 37 °C durante 4 horas. Al final del período de incubación, la muestra se sometió de nuevo a intercambio de tampones en el tampón de formulación apropiado utilizando un concentrador MWCO de 10 kDa y se almacenó a una temperatura de 2 °C a 8 °C hasta su análisis.

Tabla 16. Resultados de estudios de degradación forzada

| Tampón | Excipiente | pH | Condición | Conc. de partida (mg/ml) | Conc. Final (mg/ml) | Pérdida de proteína (%) |
|-----------------|-------------------------------|-----|-------------------|--------------------------|---------------------|-------------------------|
| Acetato 30 mM | Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 % | 5,5 | Control 5 °C | 189,1 | 186,4 | 1,4 |
| Histidina 30 mM | Sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 % | 6,0 | Control 5 °C | 174,4 | 173,3 | 0,6 |
| Acetato 30 mM | Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 % | 5,5 | Form. Control | 189,1 | 184,7 | 2,3 |
| Histidina 30 mM | Sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 % | 6,0 | Form. Control | 174,4 | 175,1 | -0,4 |
| Acetato 30 mM | Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 % | 5,5 | Estrés lumínico | 189,1 | 181,3 | 4,1 |
| Histidina 30 mM | Sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 % | 6,0 | Estrés lumínico | 174,4 | 171,6 | 1,6 |
| Acetato 30 mM | Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 % | 5,5 | Hidr. Control | 189,1 | 186,2 | 1,5 |
| Histidina 30 mM | Sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 % | 6,0 | Hidr. Control | 174,4 | 175,7 | -0,8 |
| Acetato 30 mM | Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 % | 5,5 | Hidrólisis ácida | 189,1 | 130,4 ^a | 31,0 |
| Histidina 30 mM | Sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 % | 6,0 | Hidrólisis ácida | 174,4 | 121,7 ^a | 30,2 |
| Acetato 30 mM | Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 % | 5,5 | Hidrólisis básica | 189,1 | 175,3 ^a | 7,3 |
| Histidina 30 mM | Sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 % | 6,0 | Hidrólisis básica | 174,4 | 141,6 ^a | 18,8 |
| Acetato 30 mM | Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 % | 5,5 | Oxidación | 189,1 | 163,9 ^a | 13,3 |
| Histidina 30 mM | Sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 % | 6,0 | Oxidación | 174,4 | 158,6 ^a | 9,1 |

ES 2 732 243 T3

| | | | | | | |
|-----------------|-------------------------------|-----|----------------------------|-------|-------|------|
| Acetato 30 mM | Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 % | 5,5 | Agitación | 189,1 | 188,0 | 0,6 |
| Histidina 30 mM | Sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 % | 6,0 | Agitación | 174,4 | 176,2 | -1,0 |
| Acetato 30 mM | Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 % | 5,5 | Congelación-descongelación | 189,1 | 185,4 | 2,0 |
| Histidina 30 mM | Sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 % | 6,0 | Congelación-descongelación | 174,4 | 165,5 | 5,1 |
| Acetato 30 mM | Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 % | 5,5 | Estrés por calor | 189,1 | 184,6 | 2,4 |
| Histidina 30 mM | Sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 % | 6,0 | Estrés por calor | 174,4 | 170,7 | 2,1 |

^a Los valores representan la concentración de proteína medida a ~400 µl después del intercambio de tampón.

Las formulaciones útiles son las siguientes:

5 Formulación 1:

189,1 mg/ml de SAN-300

Acetato 30 mM

10 Sorbitol 220 mM

Polisorbato 80 (PS-80) 0,01 %

15 pH 5,5

Viscosidad 3 rpm: 13,2 cP

Viscosidad 5 rpm: 12,8 cP

20 Viscosidad 7 rpm: 12,6 cP

Viscosidad 9 rpm: 12,6 cP

25 Formulación 2:

174,4 mg/ml de SAN-300

Histidina 30 mM

30 Sorbitol 250 mM

Polisorbato 20 (PS-20) 0,01 %

35 pH 6,0

Viscosidad 3 rpm: 10,4 cP

Viscosidad 5 rpm: 10,2 cP

40 Viscosidad 7 rpm: 10,1 cP

Viscosidad 9 rpm: 10,0 cP

45 Ejemplo 5C. Preparación de muestra para estudios de desarrollo de formulación y degradación forzada

Las muestras para usar en estudios de desarrollo de formulación y degradación forzada se prepararon del siguiente modo:

1. acetato 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5.

50 2. histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0

Las muestras de DoE tenían concentraciones de ~215 mg/ml y una viscosidad de 18 (acetato) y 21 (histidina). Para formulaciones subcutáneas, se desea una viscosidad objetivo teórica < 15 cps, y por lo tanto las concentraciones se ajustaron para llevar la viscosidad a un rango aceptable:

55

Acetato ~190 mg/ml, 13,7 cps

Histidina ~180 mg/ml, 13,8 cps

- 5 Por lo tanto, la concentración final de SAN-300 de la solución de acetato fue de 190 mg/ml, mientras que la concentración final de SAN-300 en histidina fue de 180 mg/ml.

10 **Preparación de muestra.** El intercambio de tampón de SAN-300 en las formulaciones candidatas se realizó utilizando concentradores Amicon Ultra-15 (30 k MWCO, Ultracel Membrane, n.º de cat. UFC 903096). Suponiendo una concentración objetivo de 180 mg/ml a 190 mg/ml y una pérdida de proteína en el peor de los casos de 40 %, se sometió a intercambio de tampones un total de ~90 ml de SAN-300 en cada formulación candidata (es decir, ~12,4 g de material de partida para consumir en total), utilizando un total de 12 concentradores Amicon en paralelo para cada formulación para procesar la cantidad requerida de SAN-300. Los concentradores se aclararon con el tampón apropiado antes de la adición de proteína. A cada concentrador, se añadieron 7,5 ml de SAN-300 (69 mg/ml), y a continuación se diluyó a 15 ml con el tampón adecuado. El volumen se redujo a ~7,5 ml por centrifugación, seguido de dilución con el tampón apropiado a 15 ml. Este proceso se repitió durante un total de 4 ciclos. Después del intercambio de tampones, las muestras se concentraron hasta la concentración objetivo y se agruparon. La concentración final de SAN-300 de las muestras se determinó mediante espectroscopía de UV-Vis usando un coeficiente de extinción de 1,53 ml/mg*cm.

20 Antes de la preparación de la muestra final, se realizaron mediciones de osmolalidad utilizando un osmómetro de depresión de punto de congelación. El osmómetro Osmette XL 5007 se calibró utilizando agua desionizada (cero mOsm/kg), soluciones estándar de 100 mOsm/kg y 500 mOsm/kg antes de realizar las mediciones de la muestra. Tras la calibración del osmómetro, se utilizaron 0,25 ml de muestra para la medición. Si es necesario, se pueden evaluar excipientes adicionales para la composición de formulación objetivo (es decir, de 280 a 350 mOsm/kg).

25 Las muestras se filtraron con jeringa utilizando membranas de PVDF de 0,22 µm (Millipore, n.º de cat. SLGVM33RS). Después de la filtración, las muestras se agruparon y la concentración de SAN-300 se determinó de nuevo mediante espectroscopía de UV-Vis. Se llenaron muestras asignadas para la degradación forzada (0,5 ml) en viales de vidrio de borosilicato de tipo 1 de 2 ml (West Pharmaceuticals, n.º de cat. 68000314) y se taparon con tapones Fluorotec de 13 mm (West Pharmaceuticals, n.º de cat. 19500040). Se selló un total de 9 viales para cada formulación. Se colocaron muestras asignadas para estudios de desarrollo de formulación en un tubo cónico de 40 ml. Las muestras se sometieron a intercambio en los tampones apropiados y se concentraron con un ligero exceso con respecto a la concentración de SAN-300 ((i) acetato/sorbitol/PS-80/pH 5,5: objetivo de 190 mg/ml Ab; (ii) histidina/sorbitol/PS-20/pH 6,0: 180 mg/ml objetivo Ab)

- 35 Se añadieron los tensioactivos adecuados, se determinó el contenido de proteína y se midió la viscosidad (tabla 9 y tabla 10).

Tabla 9. Formulaciones de muestra.

| Tampón | Excipiente | pH | Muestra | Conc. Diluida (mg/ml) | Conc. Final (mg/ml) | Prom. Conc. Final (mg/ml) |
|-----------------|-----------------|-----|---------|-----------------------|---------------------|---------------------------|
| Acetato 30 mM | Sorbitol 250 mM | 5,5 | 1 | 0,44 | 218,9 | 217,4 |
| | | | 2 | 0,43 | 215,9 | |
| Histidina 30 mM | | 6,0 | 1 | 0,42 | 210,5 | 214,5 |
| | | | 2 | 0,44 | 218,5 | |

40

Tabla 10. Concentraciones iniciales y osmolalidad de las formulaciones de muestra

| Tampón | Conc. (mg/ml) | Osmolalidad (mOsm/kg) |
|--|---------------|-----------------------|
| acetato 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5. | 217,4 | 384 |
| histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0 | 214,5 | 354 |

45 A continuación, las muestras se diluyeron para obtener las concentraciones objetivo arriba indicadas. Por ejemplo, para obtener una osmolalidad adecuada para la formulación de acetato (280-350 mOsm/kg), esta muestra se diluyó a la concentración objetivo utilizando acetato 30 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5. Tras la dilución, la concentración final de sorbitol de esta muestra fue de 220 mM.

50 La osmolalidad se midió de nuevo para las muestras finales (tabla 11).

Tabla 11. Concentración objetivo y osmolalidad de las formulaciones de muestra

| Tampón | Conc. (mg/ml) | Osmolalidad (mOsm/kg) |
|--------|---------------|-----------------------|
|--------|---------------|-----------------------|

| | | |
|--|-------|-----|
| acetato 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5. | 196,5 | 318 |
| histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0 | 174,8 | 341 |

Antes de introducir en viales para el estudio de degradación forzada, las muestras se filtraron con una jeringa a través de una membrana de PVDF de 0,22 μm (Millipore, n.º cat. SLGVM33RS), y se determinó de nuevo el contenido de proteína (tabla 12).

5

Tabla 12. Concentración y viscosidad después de la filtración con jeringa.

| Tampón | Conc. (mg/ml) | Viscosidad 3 rpm (cP) | Viscosidad 5 rpm (cP) | Viscosidad 7 rpm (cP) | Viscosidad 9 rpm (cP) |
|--|---------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------------|
| acetato 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5. | 189,1 | 13,2 | 12,8 | 12,6 | 12,6 |
| histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0 | 174,4 | 10,4 | 10,2 | 10,1 | 10,0 |

Ejemplo 6: Prueba de producción y estabilidad de las formulaciones de SAN-300: Materiales, métodos y diseño experimental

10

Descripción general

Se llevaron a cabo estudios de estabilidad a largo plazo para SAN-300, un anticuerpo monoclonal anti-VLA1 IgG1, para evaluar varias formulaciones. La proteína se formuló en histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0 y acetato 30 mM, 220 mM de sorbitol, PS 80 0,01 %, pH 5,5 a concentraciones altas (180-190 mg/ml) y bajas (120 mg/ml) para un total de cuatro formulaciones. Estas muestras se prepararon mediante filtración de flujo tangencial, se sellaron en viales de borosilicato de tipo I, y almacenaron en condiciones de almacenamiento prescritas (-75 °C y 2-8 °C), una condición acelerada (30 °C/65 % HR), y una condición de estrés (40 °C/75 % HR). Las muestras se mantuvieron bajo estas condiciones para evaluar la estabilidad química, física y estructural de la proteína. Se sometieron a prueba formulaciones de menor concentración durante un período de 6 meses en todas las condiciones. Ambas formulaciones de concentración más alta se evaluaron durante 12 meses bajo todas las condiciones, con excepción de las muestras almacenadas a 40 °C/75 % HR, que se evaluaron durante 6 meses. Con los resultados de los estudios de estabilidad a largo plazo descritos en los ejemplos 6-12 se determinó que la histidina era un sistema tamponador superior al acetato, y el SAN-300 se mantuvo estable a -75 °C y 2-8 °C durante un período de hasta 12 meses a una concentración elevada.

15

20

25

Lista de abreviaturas

A280, A320 absorbancia a 280, 320 nm

30

AU Unidades de absorbancia

CE Electroforesis capilar

35

CEX cromatografía de intercambio de cationes

N.º cat. número de catálogo

DI agua desionizada

40

dP diferencial de presión (P alimentación - P ret)

HC Cadena pesada

45

HMW Elevado peso molecular

HPLC Cromatografía de líquidos de alta resolución

LC Cadena ligera

50

LMWI Impureza de bajo peso molecular

P alimentación Presión de alimentación

55

P Ret Presión de la fracción retenida

PS-20, PS-80 Polisorbato-20, Polisorbato 80

- HR Humedad relativa
- RSD Desviación estándar relativa
- 5 SDS Dodecilsulfato sódico
- SEC Cromatografía de exclusión por tamaño TFF Filtración de flujo tangencial
- 10 TMP Presión transmembrana ((P alimentación + P Ret)/2)
- UV Ultravioleta
- Vis Visible
- 15 WFI Agua para inyección
- Materiales
- 20 En los ejemplos 6 - 12 se usaron los siguientes materiales.
- SAN-300, Lote n.º CP4-04-109 (69 mg/ml)
- SAN-300, Lote n.º CP4-04-106 (60 mg/ml)
- 25 Casetes de Pellicon XL 30 kDa, Millipore, n.º cat. PXB030A50
- 10 % Tween-20 Surfact-Amp, Thermo, n.º cat. 28320
- 30 10 % Tween-80 Surfact-Amp, Thermo, n.º cat. 28328
- Kit de tinción azul coloidal Stainer A&B, Invitrogen,
- N.º cat. 46-7015 D-Sorbitol, Sigma, n.º cat. 85529
- 35 Sistema de deshidratación minigel DryEase®, Invitrogen,
- Solución de deshidratación de gel n.º cat. N12387, Invitrogen, n.º cat. LC1001
- 40 Ácido clorhídrico (6 N), J.T. Baker, n.º cat. H31513 o equivalente
- L-Histidina J.T. Baker, n.º cat. 2080-05
- 45 Marcador molecular Mark 12, Invitrogen, n.º cat. LC5677
- Agente reductor de muestra NuPAGE®, Invitrogen, n.º cat. NP0004
- Acetato de sodio, Sigma, n.º cat. S1429
- 50 Cloruro de sodio, Sigma, n.º cat. S1679 o equivalente
- Hidróxido de sodio (6 N), J.T. Baker, n.º cat. H41521 o equivalente
- Fosfato de sodio dibásico anhidro, Sigma, n.º cat. S9763 o equivalente
- 55 Fosfato de sodio monobásico monohidrato, Sigma, n.º cat. S9638 o equivalente
- Geles de Tris-glicina (gradiente 4-20 %), 15 pocillos, Invitrogen, n.º cat. EC60255BOX
- 60 Tampón de muestra SDS Tris-glicina, Invitrogen, n.º cat. LC2676
- Cubetas UV, Eppendorf, n.º cat. 952010051
- 65 Agua WFI HyClone, Thermo, n.º cat. SH30221.10
- Columna CEX: Columna ProPac WCX-10 CEX, 4 x 250 mm, Dionex, n.º cat. 054993

- Columna CEX Guard: Columna ProPac WCX-10G Guard, 4 x 50 mm, Dionex, n.º cat. 054994
- 5 Columna SEC: G3000SWx1 7,8 x 300 mm, 5 µM, Tosoh, n.º cat. 08541
- Columna SEC Guard: SWx1 6 x 40 mm, 7 µM, Tosoh, n.º cat. 08543
- Estándar de viscosidad, Brookfield, n.º cat. 10 cps
- 10 Viales (13 mm, 2 ml), West, n.º cat. 68000314
- Tapones (13 mm), West, n.º cat. 19500040
- Tapones (13 mm), West, n.º cat. 54130240
- 15 Equipo
- Sistema de HPLC 1100, Agilent
- 20 Medidor de pH/conductividad Sevenmulti, Mettler Toledo
- Alimentación en polvo BioRad, Power Pac Basic
- Reómetro programable DV-III Ultra, Brookfield
- 25 Sistema de bioimágenes GeneGenius
- Contador de partículas líquido HIAC, HACH, modelo 9703
- 30 Sistema Labscale TFF, Millipore,
- Lámpara de observación, Eisai Machinery, modelo MIH-DX
- Osmómetro automático Osmette™ XL modelo 5007
- 35 pH-metro S40, Mettler Toledo
- Cámara de estabilidad, Environmental Specialties, modelo ES2000
- 40 Espectrofotómetro de UV/Vis, Agilent, modelo 8453
- Xcell Surelock Mini-Cell, Invitrogen, n.º cat. EI00001
- Métodos
- 45 **Contenido de proteína.** Se diluyeron volumétricamente 50 µl de solución concentrada de proteína en 25,0 ml de NaCl al 0,9 %. Las muestras diluidas se midieron usando cubetas desechables de UV en un espectrofotómetro de UV/VIS de Agilent, modelo 8453. La concentración de proteínas se determinó según las siguientes ecuaciones:
- 50
$$\text{Factor de corrección} = A_{320} + (A_{320} - A_{360})$$
- $$A_{280} \text{ corregido} = A_{280} - \text{Factor de corrección}$$
- $$\text{Concentración de proteína (mg/ml)} = (A_{280} \text{ corregido} * \text{factor de dilución})/1,53 \text{ ml/mg*cm}$$
- 55 Si las muestras duplicadas mostraban una relative standard deviation (desviación estándar relativa - RSD) > 5 %, se evaluó una tercera dilución, y se descartó el punto de datos periféricos.
- 60 **pH.** Las mediciones de pH de todas las soluciones de muestra se realizaron según GTM-0015 “Determinación del pH” con el uso de un pH-metro SV40 calibrado (Mettler Toledo) con un electrodo de compensación de temperatura automática.
- Conductividad.** Las mediciones de conductividad se llevaron a cabo utilizando un medidor de pH y conductividad Sevenmulti calibrado.
- 65 Preparación de muestra y diseño del estudio

El lote indicado de la sustancia farmacológica de SAN-300 se formuló en los siguientes tampones mediante tangential flow filtration (filtración de flujo tangencial - TFF) utilizando un sistema Millipore Labscale TFF equipado con tres casetes Millipore Pellicon XL 30 kDa que operan en serie (150 cm² de área total). Se mantuvo una presión transmembrana (TMP) a ≤ 20 psi para todos los procesos de TFF.

- 5 i) Lote n.° CP4-04-106 (60 mg/ml): acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, pH 5,5.
- 10 ii) Lote n.° CP4-104-109 (69 mg/ml): histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, pH de 6,0 para controlar el avance durante el procesamiento de TFF, se retiraron alícuotas en diferentes momentos para las pruebas de pH en el proceso, conductividad y contenido de proteína (tabla 17 y tabla 18).

Tabla 17. Resultados de plan de retirada de alícuotas y pruebas en el proceso para el procesamiento de TFF de la sustancia farmacológica SAN-300

| Formulación | N.° muestra | Punto de muestra | Alícuota retirada | Contenido de proteína (mg/ml) | pH | Conductividad (mS/cm) |
|--|-------------|--|-------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------------|
| Acetato 30 mM Sorbitol 220 mM pH 5,5 | - | Tampón de diafiltración | - | - | 5,56 | 2,26 |
| | IP-1 | Sustancia farmacológica | 3 x 1 ml | 60,0 | 6,09 | 1,73 |
| | IP-2 | Fracción retenida después de la concentración | 1 ml | 111,1 | - | - |
| | IP-3 | Fracción filtrada después de la concentración | 3 x 1 ml | 2,1 | - | - |
| | IP-4 | Después de 5 diafiltraciones (fracción retenida) | 3 x 1 ml | - | - | - |
| | IP-5 | Después de 5 diafiltraciones (fracción retenida) | 10 x 1 ml | 2,8 | 5,50 | 2,38 |
| | IP-6 | Después de 7 diafiltraciones (fracción retenida) | 3 x 1 ml | 113,2 | - | - |
| | IP-7 | Después de 7 diafiltraciones (fracción retenida) | 10 x 1 ml | 2,1 | 5,44 | 2,42 |
| | IP-8 | Tras un exceso de concentración | 1 ml | 231,2 | - | - |
| | IP-9 | Sistema de aclarado | - | 56,6 | - | - |
| | IP-10 | Adición tras el aclarado | - | 193,4 | - | - |
| Histidina 30 mM Sorbitol 250 mM pH 6,0 | - | Tampón de diafiltración | - | - | 6,08 | 1,32 |
| | IP-1 | Sustancia farmacológica | 3 x 1 ml | 69,0 | NA ^a | NA ^a |
| | IP-2 | Fracción retenida después de la concentración | 1 m L | 123,0 | - | - |
| | IP-3 | Fracción filtrada después de la concentración | 3 x 1 ml | 0,7 | - | - |
| | IP-4 | Después de 5 diafiltraciones (fracción retenida) | 3 x 1 ml | - | - | - |
| | IP-5 | Después de 5 diafiltraciones (fracción retenida) | 10 x 1 ml | -0,1 | 6,06 | 1,38 |
| | IP-6 | Después de 7 diafiltraciones (fracción retenida) | 3 x 1 ml | 141,2 | - | - |
| | IP-7 | Después de 7 diafiltraciones (fracción retenida) | 10 x 1 ml | 1,3 | 5,97 | 1,32 |
| | IP-8 | Tras un exceso de concentración | 1 ml | 219,1 | - | - |
| | IP-9 | Sistema de aclarado | - | 37,1 | - | - |
| | IP-10 | Adición tras el aclarado | - | 182,2 | - | - |

15 ^a No se tomó una medición para la muestra

| | | | | | | | | | | | |
|--|-----------------------------|---------|----------|--------------|------------|----------|----------|-------|-------|-------|-------|
| | | 2 | 0,68393 | -0,01673 | -0,01182 | -0,02164 | 0,70557 | 0,46 | 230,6 | | |
| | IP-9 (aclorado) | 1 | 0,19040 | 0,00407 | -0,00859 | 0,01673 | 0,17367 | 0,11 | 56,8 | 56,6 | 0,4 |
| | | 2 | 0,18056 | -0,00083 | -0,00956 | 0,00790 | 0,17266 | 0,11 | 56,4 | | |
| | IP-10 | 1 | 0,58275 | -1,2217E- 02 | -2,1278E02 | -0,00316 | 0,58591 | 0,38 | 191,5 | 193,4 | 1,4 |
| | | 2 | 0,61120 | 7,4577E- 04 | -1,2146E02 | 0,01364 | 0,59756 | 0,39 | 195,3 | | |
| Histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, pH 6,0. | IP-2 | 1 | 0,37486 | -0,00234 | -0,00556 | 0,00089 | 0,37397 | 0,24 | 122,2 | 123,0 | 0,9 |
| | | 2 | 0,38775 | 0,00684 | 0,00443 | 0,00924 | 0,37851 | 0,25 | 123,7 | | |
| | IP-3 | 1 | 0,00531 | 0,00209 | -0,00454 | 0,00872 | -0,00340 | 0,00 | -1,1 | 0,7 | 351,2 |
| | | 2 | -0,01455 | -0,01648 | -0,01043 | -0,02254 | 0,00799 | 0,01 | 2,6 | | |
| | Tras la 4ª diafiltración | 1 | 0,37145 | -0,00682 | -0,00769 | -0,00596 | 0,37741 | 0,25 | 123,3 | 120,7 | 3,0 |
| | | 2 | 0,37566 | 0,00874 | 0,00340 | 0,01409 | 0,36157 | 0,24 | 118,2 | | |
| | IP-5 | 1 | -0,00936 | -0,00685 | -0,00431 | -0,00939 | 0,00004 | 0,00 | 0,0 | -0,1 | 157,9 |
| | | 2 | -0,01815 | -0,01492 | -0,01237 | -0,01748 | -0,00068 | 0,00 | -0,2 | | |
| | IP-6 | 1 | 0,40677 | -0,01602 | -0,00584 | -0,02621 | 0,43298 | 0,28 | 141,5 | 141,2 | 0,3 |
| | | 2 | 0,41610 | -0,01461 | -0,01419 | -0,01503 | 0,43113 | 0,28 | 140,9 | | |
| | IP-7 | 1 | -0,01297 | -0,01053 | -0,00233 | -0,01873 | 0,00577 | 0,00 | 1,9 | 1,3 | 60,3 |
| | | 2 | -0,00631 | -0,00604 | -0,00346 | -0,00863 | 0,00232 | 0,00 | 0,8 | | |
| | Conc. a 115 ml | 1 | 0,59934 | 0,00308 | 0,00170 | 0,00445 | 0,59489 | 0,39 | 194,4 | 194,4 | 0,0 |
| | | 2 | 0,58662 | -0,00413 | -0,00013 | -0,00813 | 0,59475 | 0,39 | 194,4 | | |
| | IP-8 | 1 | 0,66784 | 0,00237 | 0,00483 | -0,00008 | 0,66792 | 0,44 | 218,3 | 219,1 | 0,5 |
| | | 2 | 0,64941 | -0,01297 | -0,00253 | -0,02340 | 0,67281 | 0,44 | 219,9 | | |
| | IP-9 (aclorado) | 1 | 0,11225 | -0,00660 | -0,00911 | -0,00409 | 0,11634 | 0,08 | 38,0 | 37,1 | 3,5 |
| | | 2 | 0,11000 | -0,00567 | -0,01068 | -0,00067 | 0,11067 | 0,07 | 36,2 | | |
| IP-10 | 1 | 0,54739 | -0,01053 | -0,00573 | -0,01532 | 0,56271 | 0,37 | 183,9 | 182,2 | 1,3 | |
| | 2 | 0,54346 | -0,00355 | 0,00168 | -0,00878 | 0,55224 | 0,36 | 180,5 | | | |

Para empezar, se concentraron ~450 ml de CP4-04-106 o ~430 ml de CP4-04-109 hasta aproximadamente la mitad del volumen inicial (tabla 19). Se monitorizó la presión de la alimentación y la fracción retenida (P alimentación y P ret) durante la concentración inicial en distintos momentos.

5

Tabla 19. Resumen de los datos de concentración iniciales para el procesamiento de TFF de la sustancia farmacológica SAN-300

| Formulación | Tiempo | P alimentación (psi) | P ret (psi) | dP (psi) | TMP (psi) | Flujo (ml/min) | Flujo (LMH) | Volumen de fracción permeada (ml) |
|--|--------|----------------------|-------------|----------|-----------|----------------|-------------|-----------------------------------|
| Acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, pH 5,5. | 5 | 25,0 | 5,0 | 20,0 | 15,0 | 4,0 | 16,0 | 20 |
| | 20 | 26,0 | 5,0 | 21,0 | 15,5 | 3,7 | 14,8 | 75 |
| | 35 | 27,0 | 5,0 | 22,0 | 16,0 | 3,5 | 14,1 | 128 |
| | 45 | 29,0 | 5,0 | 24,0 | 17,0 | 3,1 | 12,4 | 159 |
| | 65 | 33,0 | 5,0 | 28,0 | 19,0 | 2,9 | 11,4 | 216 |
| Histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, pH 6,0. | 1 | 22,5 | 7,5 | 15,0 | 15,0 | - | - | - |
| | 8 | 22,5 | 7,5 | 15,0 | 15,0 | - | - | 26 |
| | 34 | 30,0 | 5,0 | 25,0 | 17,5 | - | - | 96 |
| | 62 | 30,0 | 3,0 | 20,0 | 18,0 | - | - | 173 |

10 La masa de fracción permeada se registró en cada uno de estos momentos y se determinó el volumen de fracción permeada. También se calcularon la caída de presión (dP; P alimentación - P ret) y la presión transmembrana (TMP; (P alimentación + P ret)/2). Para la formulación de acetato, se registró el caudal de la fracción filtrada en cada momento (flujo, ml/min), y esta medición se normalizó para el área de la membrana ((L*h-1) / m2).

15 Después, la sustancia farmacológica concentrada se sometió a intercambio en el tampón de formulación apropiado mediante siete ciclos de diafiltración continua (tabla 20). Para cada diavolumen, se midieron la presión de alimentación, la presión de la fracción retenida y la velocidad de filtración, y los parámetros asociados se calcularon como se ha descrito anteriormente. Se observó que el flujo aumentaba en ~50 % para la formulación de acetato, y ~30 % para la formulación de histidina en el quinto diavolumen.

Tabla 20. Resumen de los datos de diafiltración iniciales para el procesamiento de TFF de la sustancia farmacológica SAN-300

| Formulación | Diavolumen | P alimentación (psi) | P ret (psi) | dP (psi) | TMP (psi) | Flujo (ml/min) | Flujo (LMH) | Tiempo Total (h:min) |
|--|------------|----------------------|-------------|----------|-----------|----------------|-------------|----------------------|
| Acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, pH 5,5. | 1 | 33,0 | 3,0 | 30,0 | 18,0 | 2,8 | 11,0 | 01:24 |
| | 2 | 34,0 | 5,0 | 29,0 | 19,5 | 3,0 | 12,0 | 02:37 |
| | 3 | 33,0 | 5,0 | 28,0 | 19,0 | 3,0 | 12,0 | 03:40 |
| | 4 | 33,0 | 5,0 | 28,0 | 19,0 | 3,8 | 15,2 | 04:37 |
| | 5 | 34,0 | 5,0 | 29,0 | 19,5 | 4,2 | 16,9 | 05:32 |
| | 6 | 34,0 | 5,0 | 29,0 | 19,5 | 4,3 | 17,0 | 06:22 |
| | 7 | 34,0 | 5,0 | 29,0 | 19,5 | 4,7 | 18,8 | 07:12 |
| Histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, pH 6,0 | 1 | 37,0 | 2,0 | 35,0 | 19,5 | 2,5 | 10,0 | 01:34 |
| | 2 | 36,0 | 3,0 | 33,0 | 19,5 | 2,6 | 10,4 | 02:53 |
| | 3 | 36,0 | 3,0 | 33,0 | 19,5 | 3,5 | 14,0 | 04:06 |
| | 4 | 37,0 | 3,0 | 34,0 | 20,0 | 3,2 | 12,9 | 05:14 |
| | 5 | 36,0 | 3,0 | 33,0 | 19,5 | 3,3 | 13,2 | 06:16 |
| | 6 | 37,0 | 0,0 | 37,0 | 18,5 | 3,3 | 13,2 | 07:29 |
| | 7 | 39,0 | 1,0 | 38,0 | 20,0 | 3,3 | 13,2 | 08:38 |

5 Después de completar la diafiltración, la sustancia farmacológica formulada se sobreconcentró en relación con la concentración objetivo de SAN-300 final (tabla 17). El pH y la conductividad finales de las soluciones sobreconcentradas eran casi idénticas al tampón de diafiltración asociado (tabla 17). Después de retirar la muestra, el sistema TFF se lavó con tampón de diafiltración y se determinó el contenido de proteína de la descarga. Esta descarga se utilizó para diluir el SAN-300 sobreconcentrado a un nivel solo ligeramente superior al nivel final objetivo (tabla 17). El volumen de esta solución se determinado en peso usando una densidad de 1,089 de g/ml. Finalmente, se estimó el porcentaje de rendimiento mediante determinaciones de contenido de proteína hechas durante toda la duración del procesamiento de TFF (Tabla 21). Si bien no se observó ninguna pérdida aparente de SAN-300 para la formulación de acetato, el intercambio en el tampón de histidina dio lugar a un rendimiento de 89 %.

15 Tabla 21. Rendimiento estimado en porcentaje para el procesamiento de SAN-300 TFF

| Formulación | Muestra | Volumen (ml) | Conc. (mg/ml) | Proteína total (mg) |
|---|--|--------------|--------------------|---------------------|
| Acetato 30 mM Sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5 | Alícuota tras la concentración ^a | 1,3 | 111,1 | 138,9 |
| | Alícuota tras 5 diafiltraciones | 3,0 | 111,1 ^b | 333,3 |
| | Alícuota tras 7 diafiltraciones ^c | 3,5 | 113,2 | 396,2 |
| | Alícuota sobre concentración ^c | 1,5 | 231,2 | 346,8 |
| | Muestra sobre-concentrada final | 109,7 | 231,2 | 25362,6 |
| | Aclarado ^b | 22,0 | 56,6 | 1245,2 |
| | Total (mg): | | | 27823,0 |
| | Sustancia farmacológica de partida | 450,0 | 60,0 | 27000,0 |
| | Porcentaje de rendimiento: | | | 103,0 |
| Histidina 30 mM, Sorbitol 250 mM PS-20 0,01 % pH 6,0 | Alícuota tras la concentración ^a | 2,0 | 123,0 | 246,0 |
| | Alícuota 4 ^a diafiltración | 1,0 | 120,7 | 120,7 |
| | Alícuota tras 5 diafiltraciones | 3,0 | 120,7 ^b | 362,1 |
| | Alícuota tras 7 diafiltraciones ^c | 3,5 | 141,2 | 494,2 |
| | Conc. Alícuota a 115 ml | 0,5 | 194,4 | 97,2 |
| | Alícuota sobre concentración ^c | 1,5 | 219,1 | 328,7 |
| | Muestra sobreconcentrada final | 108,7 | 219,1 | 23816,2 |
| | Aclarado ^b | 25,5 | 37,1 | 946,1 |
| | Total (mg): | | | 26411,1 |
| | Sustancia farmacológica de partida | 430,0 | 69,0 | 29670,0 |
| | Porcentaje de rendimiento: | | | 89,0 |

- a Incluye 1,0 ml de muestra para ensayo A280 retirado
- b Concentración no determinada, del valor mostrado es una estimación utilizada para aproximar la cantidad de material retirado para esta alícuota
- c Incluye 0,5 ml de muestra retirada para ensayo de A280

5 Para alcanzar la concentración objetivo final, se añadió un pequeño volumen de tampón de formulación que incluía el polisorbato apropiado para la muestra (acetato, PS-80; histidina, PS-20) para lograr una concentración de tensioactivo de 0,01 %. Se retiró una alícuota de 40 ml de SAN-300 formulado a la concentración objetivo y se diluyó a 120 mg/ml usando tampón de formulación que incluía polisorbato 0,01 %. Se generó un total de cuatro formulaciones de SAN-300 a las concentraciones objetivos indicadas:

Alta concentración:

NB1206p86A: 190 mg/ml, acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5.

NB1206p86B: 180 mg/ml, histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0.

Concentración baja:

NB1206p86C: 120 mg/ml acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5

NB1206p86D: 120 mg/ml, histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0.

Antes de introducirlo en viales, el contenido de proteína final de todas las formulaciones se midió antes y después de la filtración a través de una membrana de PES de 0,22 µm. Los datos se muestran en la tabla 22.

Tabla 22. Determinación del contenido de proteína final para las formulaciones de SAN-300 usadas en el estudio de estabilidad

| Formulación | Con. objetivo (mg/ml) | Filtrada | Muestra | A280 (AU) | A320 (AU) | A360 (AU) | Corrección (AU) | A280 corregido (AU) | Conc. Diluida (mg/ml) | Conc. Final (mg/ml) | Promedio Conc. Final (mg/ml) | % de RSD |
|--|-----------------------|-------------|---------|-----------|-----------|-----------|-----------------|---------------------|-----------------------|---------------------|------------------------------|----------|
| Acetato 30 mM, sorbitol 220 mM PS-80 0,01 % pH 5,5 | 190 | Previamente | 1 | 0,56786 | -0,01349 | -0,01702 | -0,00995 | 0,57781 | 0,38 | 188,8 | 189,4 | 0,4 |
| | | | 2 | 0,55664 | -0,02798 | -0,03137 | -0,02459 | 0,58123 | 0,38 | 189,9 | | |
| | | Después- | 1 | 0,56776 | -0,01310 | -0,01250 | -0,01369 | 0,58145 | 0,38 | 190,0 | 187,6 | 1,8 |
| | | | 2 | 0,57070 | -0,00423 | -0,01231 | 0,00385 | 0,56685 | 0,37 | 185,2 | | |
| | 120 | Previamente | 1 | 0,34587 | -0,02212 | -0,01862 | -0,02563 | 0,37150 | 0,24 | 121,4 | 119,8 | 1,8 |
| | | | 2 | 0,33867 | -0,02524 | -0,02718 | -0,02330 | 0,36197 | 0,24 | 118,3 | | |
| | | Después- | 1 | 0,34845 | -0,02428 | -0,02173 | -0,02684 | 0,37529 | 0,25 | 122,6 | 121,7 | 1,1 |
| | | | 2 | 0,34747 | -0,02325 | -0,02449 | -0,02200 | 0,36947 | 0,24 | 120,7 | | |
| Histidina 30 mM, sorbitol 250 mM PS-20 0,01 % pH 6,0 | 180 | Previamente | 1 | 0,52190 | -0,01683 | -0,01887 | -0,01480 | 0,53670 | 0,35 | 175,4 | 174,1 | 1,0 |
| | | | 2 | 0,49998 | -0,02657 | -0,02423 | -0,02890 | 0,52888 | 0,35 | 172,8 | | |
| | | Después- | 1 | 0,54108 | -0,00328 | -0,00087 | -0,00569 | 0,54677 | 0,036 | 178,7 | 177,4 | 1,0 |
| | | | 2 | 0,52670 | -0,01604 | -0,01957 | -0,01250 | 0,53920 | 0,35 | 176,2 | | |
| | 120 | Previamente | 1 | 0,34107 | -0,01813 | -0,01766 | -0,01860 | 0,35967 | 0,24 | 117,5 | 116,9 | 0,8 |
| | | | 2 | 0,35011 | -0,00864 | -0,01161 | -0,00567 | 0,35578 | 0,23 | 116,3 | | |
| | | Después- | 1 | 0,34101 | -0,01342 | -0,01537 | -0,01146 | 0,35247 | 0,23 | 115,2 | 115,5 | 0,3 |
| | | | 2 | 0,33710 | -0,01865 | -0,02027 | -0,01702 | 0,35412 | 0,23 | 115,7 | | |

Las cuatro formulaciones se introdujeron en viales de vidrio de borosilicato de tipo I despirogenado estériles en un volumen de 1 ml, se sellaron usando tapones FluroTec® de 13 mm, y se almacenaron a 2-8 °C hasta la implantación. Para las pruebas de estabilidad, las muestras se mantuvieron en las condiciones de almacenamiento prescritas (-75 °C, y 2-8 °C), una condición acelerada (30 °C/65 % HR) y una condición con estrés (40 °C/75 % HR). Además, algunos viales se almacenaron en una posición invertida a 2-8 °C para determinar si el cierre del recipiente influía en la estabilidad de SAN-300. El programa de pruebas analíticas se muestra en la tabla 23.

Tabla 23. Programa de pruebas analíticas para el estudio de la estabilidad de SAN-300

| Formulación | Condición | A | 1 Mes | 3 Meses | 6 Meses | 9 Meses | 12 Meses |
|---------------------------------------|--------------------|----------------|----------------|----------------|---------|---------|----------|
| NB1206p86A NB1206p86B (Alta conc.) | -75 °C | X ^a | | | X | | X |
| | 2-8 °C | | X ^b | X ^b | X | X | X |
| | 2-8 °C (invertida) | | - | | X | | X |
| | 30 °C/65 % HR | | X | X | X | X | X |
| | 40 °C/75 % HR | | X | X | X | | |
| NB1206p86C NB1206p86D (Baja conc.) | -75 °C | X ^a | | | X | | |
| | 2-8 °C | | | X ^b | X | | |
| | 2-8 °C (invertida) | | - | | X | | |
| | 30 °C/65 % HR | | | X | X | | |
| | 40 °C/75 % HR | | | X | X | | |

X: Las pruebas incluyeron el aspecto, contenido de proteína, pH, HIAC, SDS-PAGE reducido/en estado reducido, SEC y CEX

a Pruebas de osmolalidad y de viscosidad adicionales

b Prueba de osmolalidad adicional

5

Ejemplo 7: Viscosidad y osmolalidad de las formulaciones de SAN-300

Se evaluó la viscosidad de las formulaciones de SAN-300 (como se describe en el ejemplo 6) en el momento inicial. La osmolalidad de las formulaciones se evaluó en el momento inicial y al cabo de 1 y 3 meses de almacenamiento a 2-8 °C.

10

Métodos

Métodos para evaluar la viscosidad. Se calibró un reómetro de cizalla con un fluido estándar de viscosidad Brookfield n.º 10, y se midieron 0,5 ml de muestra a diversas velocidades de husillo (velocidades de cizallamiento). Las muestras que mostraban una lectura de viscosidad constante (en cP) de todas las velocidades de cizallamiento se consideraron Newtonianas en este rango, mientras que las muestras con valores de viscosidad dependientes de la velocidad de cizallamiento se considerarían no Newtonianas.

15

Métodos para evaluar la osmolalidad. Se realizaron mediciones de la osmolalidad usando un osmómetro de descenso del punto de congelación, que mide la disminución del punto de congelación de la solución a medida que aumenta la concentración de soluto. El osmómetro Osmette XL 5007 se calibró utilizando agua desionizada (cero mOsm/kg), soluciones estándar de 100 mOsm/kg y 500 mOsm/kg.

20

Después de la calibración del osmómetro, se midieron 250 µL de la muestra.

25

Resultados.

Los resultados de la viscosidad y de la osmolalidad se proporcionan en la tabla 24.

30

Tabla 24. Resumen de resultados de viscosidad y osmolalidad para el estudio de estabilidad de SAN-300

| Lote de muestra | Formulación | Conc. (mg/ml) | Condición | Momento | Viscosidad (cP) | Osmolalidad (mOsm/kg) |
|-----------------|--|---------------|-----------|---------|-----------------|-----------------------|
| NB1206p86A | acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5. | 190 | Inicial | | 13,7 | 295 |
| | | | 2-8 °C | 1M | | 318 |
| | | | | 3M | | 310 |
| NB1206p86C | | 120 | Inicial | | 4,4 | 299 |
| | | | 2-8 °C | | | 321 |
| NB1206p86B | histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0 | 180 | Inicial | | 11,9 | 289 |
| | | | 2-8 °C | 1M | | 331 |
| | | | | 3M | | 319 |
| NB1206p86D | | 120 | Inicial | | 4,3 | 287 |
| | | | 2-8 °C | | | 316 |

Resultados de viscosidad. La viscosidad de la formulación se evaluó para todas las formulaciones en el momento inicial. Los datos se muestran en la tabla 24. Se observó un comportamiento Newtoniano para todas las muestras, donde tanto las formulaciones de alta concentración de histidina como las de acetato presentaron viscosidades < 15 cP (11,9 y 13,7 cP,

35

respectivamente). Las viscosidades de la formulación de acetato e histidina de baja concentración fueron de 4,3 y 4,4 cP, respectivamente. Todas las viscosidades medidas estaban en consonancia con los valores históricos.

5 **Resultados de osmolalidad.** Las mediciones de osmolalidad se realizaron en el momento inicial (tabla 24). Las lecturas tanto para las formulaciones de acetato (295 mOsm/kg) como las de histidina (289 mOsm/kg) de alta concentración eran algo menores que los valores históricos y, por lo tanto, la reevaluación de la osmolalidad de la muestra se realizó al cabo de 1 y 3 meses utilizando muestras almacenadas a 2-8 °C. Los valores resultantes para la formulación de acetato fueron 318 y 310 mOsm/kg para las muestras al cabo de 1 mes y 3 meses, respectivamente, mientras que las muestras que contenían histidina mostraron una osmolalidad de 331 y 319 mOsm/kg. Estos datos fueron totalmente consistentes con las lecturas históricas y muestran que la osmolalidad de la muestra permanecía constante dentro de este marco de tiempo. La osmolalidad de las formulaciones de acetato e histidina de baja concentración a los 3 meses era de 321 y 316 mOsm/kg, respectivamente.

15 Ejemplo 9: Estabilidad a largo plazo de las formulaciones de SAN-300: Aspecto, contenido de proteína y pH

Se evaluó el aspecto, el contenido de proteína y el pH de las formulaciones de SAN-300 para determinar su estabilidad a largo plazo usando el diseño experimental descrito en el ejemplo 7.

20 Métodos

Aspecto. Antes de abrir los viales para la prueba analítica, se evaluó el aspecto de la muestra contra un fondo blanco y oscuro. Cada muestra se analizó frente a un vial idéntico lleno de agua desionizada en términos de color, transparencia (opalescencia), y presencia de materia en forma de partículas visible.

25 **Contenido de proteína y pH.** El contenido de proteína y el pH se evaluaron como se describe en el ejemplo 7.

Resultados.

30 Los resultados se muestran a continuación en la tabla 25. Todas las formulaciones mantuvieron un aspecto, contenido de proteína y pH constante durante el transcurso del estudio

Tabla 25A. Formulación de acetato: Resumen de resultados referentes a contenido de proteínas, pH, y aspecto de muestras de estabilidad de SAN-300

| Lote de muestra | Formulación | Condición | Momento | Contenido de proteína (mg/ml) | pH | Osmolalidad (mOsm/kg) | Aspecto* |
|-----------------|---|--------------------|---------|-------------------------------|-----|-----------------------|---|
| NB1206p86A | 190 mg/ml SAN-300 Acetato 30 mM Sorbitol 220 mM PS-80 0,01 % pH 5,5 | Inicial | | 185,9 | 5,6 | 295 | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | | -75 °C | 6M | 194,2 | 5,7 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | | | 12M | 181,6 | 5,7 | | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | | 2-8 °C | 1M | 186,7 | 5,6 | 318 | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | | | 3M | 184,9 | 5,7 | 310 | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | | | 6M | 192,0 | 5,6 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | | | 9M | 187,1 | 5,6 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | | | 12M | 181,5 | 5,7 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | | 2-8 °C (invertida) | 6M | 194,1 | 5,6 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |

| | | | | | | | | | |
|-----------------------|-------|------------------|--|---------|-----|-------|--|-----|--|
| | | 30 °C/65 % HR | 12M | 186,6 | 5,7 | | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 1M | 187,7 | 5,7 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 3M | 189,3 | 5,7 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 6M | 189,5 | 5,7 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 9M | 192,9 | 5,7 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 12M | 188,3 | 5,7 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | 40 °C/75 % HR | 1M | 189,5 | 5,7 | | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 3M | 188,3 | 5,7 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 6M | 193,8 | 5,7 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | NB1206p86C | 120 mg/ml SAN-300 Acetato 30 mM Sorbitol 220 mM PS-80 0,01 % pH 5,5 | Inicial | | 120,9 | 5,6 | 299 | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | | | | - 75 °C | 6M | 122,3 | | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | | | | 2-8 °C | 3M | 121,0 | 5,6 | 321 | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| 6M | 124,6 | | | | 5,6 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| 2-8 °C (invertida) | 6M | | | 122,9 | 5,6 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| 30 °C/65 % HR | 3M | | | 122,7 | | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | 6M | | | 124,4 | 5,6 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| 40 °C/75 % HR | 3M | | | 124,4 | 5,6 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | 6M | | | 125,6 | 5,7 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |

^a El grado de coloración de la muestra aumenta de (-) a (*) a (+). Las muestras de baja concentración (120 mg/ml) se clasificaron retroactivamente como ligeramente amarillas (-) para los momentos anteriores a 6 meses.

5 Tabla 25B: Formulación de histidina: Resumen de resultados referentes a contenido en proteínas, pH, y aspecto de muestras de estabilidad de SAN-300 (continuación)

| Lote de muestra | Formulación | Condición | Momento | Contenido de proteína (mg/ml) | pH | Osmolalidad (mOsm/kg) | Aspecto* |
|-----------------|-------------|-----------|---------|-------------------------------|----|-----------------------|----------|
|-----------------|-------------|-----------|---------|-------------------------------|----|-----------------------|----------|

| | | | | | | | | | |
|------------|---|--------------------|---|---------|-----|-------|--|-----|--|
| NB1206p86B | 180 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0. | Inicial | | 174,1 | 6,2 | 289 | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | -75 °C | 6M | 179,4 | 6,2 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 12M | 173,8 | 6,3 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | 2-8 °C | 1M | 176,5 | 6,2 | 331 | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 3M | 175,8 | 6,2 | 319 | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 6M | 180,1 | 6,2 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 9M | 178,9 | 6,2 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 12M | 170,9 | 6,3 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | 2-8 °C (invertida) | 6M | 184,5 | 6,2 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 12M | 170,1 | 6,3 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | 30 °C/65 % HR | 1M | 179,9 | 6,2 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 3M | 79,5 | 6,2 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 6M | 180,2 | 6,2 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 9M | 177,7 | 6,2 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 12M | 172,2 | 6,2 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | 40 °C/75 % HR | 1M | 176,5 | 6,2 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 3M | 184,3 | 6,2 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | | 6M | 180,6 | 6,2 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |
| | | NB1206p86D | 120 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0. | Inicial | | 117,8 | 6,1 | 287 | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | | | | - 75 °C | 6M | 120,9 | 6,2 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| 2-8 °C | 3M | | | 119,4 | 6,1 | 316 | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles | | |

| | | | | | | |
|--|-----------------------|----|-------|-----|---|--|
| | | 6M | 120,7 | 6,2 | | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | 2-8 °C (invertida) | 6M | 122,5 | 6,2 | | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | 30 °C/65 % HR | 3M | 118,4 | 6,1 | | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | | 6M | 119,9 | 6,1 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | 40 °C/75 % HR | 3M | 121,0 | 6,1 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |
| | | 6M | 118,8 | 6,1 | - | ligeramente amarillo (*), ligeramente opalescente, sin partículas visibles |

^a El grado de coloración de la muestra aumenta de (-) a (*) a (+). Las muestras de baja concentración (120 mg/ml) se clasificaron retroactivamente como ligeramente amarillas (-) para los momentos anteriores a 6 meses.

5 **Aspecto.** La inspección visual de los viales de muestra sin abrir se utilizó para evaluar el color, la transparencia, y la presencia de materia en forma de partículas de la muestra. Como se muestra en la tabla 25, todas las muestras eran ligeramente opalescentes y prácticamente exentas de partículas visibles, siendo las formulaciones de alta concentración notablemente más amarillas que las de baja concentración. Aunque se observó un color algo más amarillo en las formulaciones de histidina mantenidas a temperaturas más altas (al cabo de 6 meses a 40 °C, 12 meses a 30 °C), las formulaciones mostraron generalmente un aspecto más constante por evaluación visual en el transcurso del estudio.

10 **Contenido de proteína.** El contenido de proteína se evaluó para todas las muestras en el transcurso del estudio de estabilidad (tabla 25). No se observó pérdida detectable de SAN-300 para ninguna de las formulaciones, independientemente de las condiciones de almacenamiento.

15 **pH.** Se midió el pH de la formulación para todas las muestras del estudio. Las lecturas iniciales del pH para las formulaciones de histidina y acetato de alta concentración fueron 6,2 y 5,6, respectivamente. Como se muestra en la tabla 25, el pH permaneció constante durante todo el estudio, sin variar en más de 0,1 unidades con respecto a la lectura inicial en ninguna formulación.

20 Ejemplo 10: Estabilidad a largo plazo de las formulaciones de SAN-300: Materia en forma de partículas

Se evaluó la presencia de materia en forma de partículas en las formulaciones SAN-300 para determinar su estabilidad a largo plazo utilizando el diseño experimental descrito en el ejemplo 7.

25 Métodos para evaluar la presencia de materia en forma de partículas

30 Se utilizó un sistema de recuento de partículas líquido (HACH, modelo 9703, modelo sensor: HRLD 150 (HIAC)) para determinar el tamaño de partícula y su abundancia en las muestras de SAN-300. Los datos se obtuvieron con una sola extracción de muestra de 500 µl. Debido a los pequeños volúmenes de muestra usados en este estudio, los resultados generados no cumplen los requerimientos de USP <788> “Particulate Matter in Injections (materia en forma de partículas en inyecciones)”.

35 En resumen, el sistema HIAC se deja calentar durante aproximadamente 30 minutos, y tanto la jeringa (1 ml) como el sistema se lavaron con agua desionizada durante al menos 10 ciclos antes de su uso. Se evaluó la idoneidad del entorno mostrando que 25 ml de agua desionizada no contenía más de 25 partículas de tamaño > 10 µm. Si la idoneidad del ambiente fallaba, se purgó el sistema con agua desionizada hasta que se obtuvo una medición aceptable. La idoneidad del sistema se confirmó analizando una única extracción de 500 µl de estándar de 15 µM usando tamaños de canal de 10 µM y 25 µM. Si los recuentos acumulativos/ml para el canal de 10 µM estaban dentro del valor prescrito dada para el estándar, entonces el sistema se consideraba adecuado para la prueba de muestra. Antes de cada muestra, el sistema se lavó de nuevo con agua desionizada hasta que una extracción de 500 µl de agua desionizada no mostraba partículas de un tamaño superior a 10 µm. La muestra se analizó utilizando una sola extracción de 500 µl y se determinaron recuentos acumulativos/ml para canales de 10 µm y 25 µm y se registraron con aproximación al número entero más cercano.

45 Resultados.

Se realizó el recuento de partículas por HIAC para todas las muestras durante el transcurso del estudio de estabilidad. Los datos se muestran en la tabla 26.

ES 2 732 243 T3

Tabla 26. Resumen de resultados de estabilidad de HIAC para muestras de estabilidad de SAN-300 (los puntos de tiempo se miden en meses)

| Lote de muestra | Formulación | Condición | Momento | Recuentos acumulativos/ml ^a | |
|--------------------|---|--------------------|---|--|-------|
| | | | | 10 µm | 25 µm |
| NB126p86B | 190 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5. | Inicial | | 1492 | 22 |
| | | -75 °C | 6M | 1446 | 200 |
| | | | 12M | 1550 | 142 |
| | | 2-8 °C | 1M | 2540 | 154 |
| | | | 3M | 36 | 4 |
| | | | 6M | 1200 | 186 |
| | | | 9M | 150 | 64 |
| | | 2-8 °C (invertida) | 12M | 966 | 68 |
| | | | 6M | 22 | 2 |
| | | 30 °C/65 % HR | 12M | 1126 | 104 |
| | | | 1M | 1682 | 140 |
| | | | 3M | 8 | 6 |
| | | | 6M | 44 | 0 |
| | | 40 °C/75 % HR | 9M | 414 | 4 |
| | | | 12M | 940 | 28 |
| 6M | 212 | | 16 | | |
| NB1206p86A | 190 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5. | Inicial | | 154 | 0 |
| | | -75 °C | 6M | 48 | 2 |
| | | | 2-8 °C | 3M | 24 |
| | | 2-8 °C (invertida) | 6M | 142 | 44 |
| | | | 6M | 20 | 0 |
| | | 30 °C/65 % HR | 3M | 10 | 0 |
| | | | 6M | 58 | 8 |
| | | 40 °C/75 % HR | 3M | 4 | 0 |
| | | | 6M | 46 | 0 |
| | | NB1206p86B | 180 mg/ml de SAN-300, histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0. | Inicial | |
| -75 °C | 6M | | | 356 | 20 |
| | 12M | | | 582 | 12 |
| 2-8 °C | 1M | | | 1464 | 46 |
| | 3M | | | 38 | 10 |
| | 6M | | | 426 | 46 |
| | 9M | | | 34 | 8 |
| 2-8 °C (invertida) | 12M | | | 478 | 8 |
| | 6M | | | 432 | 28 |
| 30 °C/65 % HR | 12M | | | 930 | 0 |
| | 1M | | | 2280 | 110 |
| | 3M | | | 118 | 42 |
| | 6M | | | 48 | 2 |
| 40 °C/75 % HR | 9M | | | 2 | 0 |
| | 12M | | | 2 | 0 |
| | 6M | 198 | 10 | | |
| NB1206p86D | 120 mg/ml de SAN-300, histidina 30 mM, sorbitol | Inicial | | 80 | 0 |
| | | -75 °C | 6M | 104 | 34 |
| | | 2-8 °C | 3M | 52 | 12 |

| | | | | | |
|--|-------------------------------|--------------------|----|-----|----|
| | 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0. | | 6M | 80 | 12 |
| | | 2-8 °C (invertida) | 6M | 146 | 40 |
| | | 30 °C/65 % HR | 3M | 46 | 6 |
| | | | 6M | 22 | 0 |
| | | 40 °C/75 % HR | 3M | 22 | 0 |
| | | | 6M | 82 | 4 |

^a Determinado mediante una única extracción de 500 µl

Para todas las formulaciones y condiciones, los recuentos de partículas fueron muy inferiores a los límites de partículas establecidos por USP<788>(6.000 para partículas de 10 µm, y 600 para las de 25 µm). Todas las formulaciones suprimieron adecuadamente la formación de partículas durante el almacenamiento de SAN-300 de larga duración tanto en las condiciones de almacenamiento previsto (-75 °C y 2-8 °C) como en condiciones aceleradas o bajo estrés (30 °C o 40 °C).

Ejemplo 11: Estabilidad a largo plazo de las formulaciones de SAN-300: Pureza

Se evaluó la pureza de las formulaciones de SAN-300 con SDS-PAGE en estado reducido y cromatografía de exclusión por tamaño utilizando el diseño experimental descrito en el ejemplo 7. Métodos de electroforesis en gel de poliacrilamida en estado reducido. Se utilizó electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizada (SDS-PAGE) para evaluar la pureza de la muestra de SAN-300 mediante separación por tamaño de proteínas/péptidos de muestra. Las muestras, controles y estándar de referencia se prepararon a 2,0 mg/ml en tampón de muestra 1X Tris-Glycine SDS (que contenía agente reductor de muestra NuPAGE®), se centrifugaron y desnaturalizaron con calor durante 1 minuto a 95 °C seguido de una etapa de centrifugación adicional. Los geles se cargaron a 20 µg por calle o carril, y la electroforesis se realizó durante 60 minutos a tensión máxima, 250 vatios, y 30 mAmp/gel. Después de la electroforesis, los geles se tiñeron durante un mínimo de 3 horas con azul coloidal y se destiñeron durante la noche. Los geles se secaron con un sistema de secado de minigel DryEase®, se tomaron imágenes, y se analizaron mediante densitometría utilizando el sistema GeneGenius Bioimaging.

El porcentaje de heavy chain (cadena pesada - HC), light chain (cadena ligera - LC) e IgG se determinó a partir de datos de densitometría para cada muestra de SDS-PAGE, además de la densidad total de calle (volumen bruto); para una mejor variabilidad entre los geles, se registraron las abundancias de HC, LC y IgG con respecto al estándar de referencia interno en cada gel. Para la visualización, se registró también el porcentaje de pérdida de IgG. El material procedente de ambos lotes de SAN-300 (CP4-04-109 y CP4-04-106) utilizado para generar muestras de estabilidad se sometió a T₀ y se consideró equivalente. Se utilizó CP4-04-109 como referencia para el resto del estudio.

Cromatografía de exclusión por tamaño. Se usó size exclusion chromatography (cromatografía de exclusión por tamaño - SEC) para evaluar la cantidad de agregados y productos de degradación presentes en las muestras de SAN-300. Se equipó un sistema de HPLC Agilent 1100 con una columna de TSKgel G3000SWx1 SEC (Tosoh, 7,8 mm x 30 cm, tamaño de partícula 5 µm) y columna de protección SWx1 (Tosoh, 6 mm x 4 cm, tamaño de partícula 7 µm). Las muestras se diluyeron hasta 1 mg/ml en fase móvil de SEC (fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 200 mM, pH 7,2) y se inyectaron 40 µl de muestra por duplicado. El sistema se aplicó utilizando un régimen de flujo de 1,0 ml/min y la proteína eluida se detectó mediante la absorbancia medida a 215 nm. Se registró el porcentaje de área total del cromatograma para el pico de monómero, además de cada especie individual de high molecular weight (elevado peso molecular - HMW) y low molecular weight impurity (impureza de bajo peso molecular - LMWI). El material procedente de ambos lotes de SAN-300 (CP4-04-109 y CP4-04-106) utilizado para generar muestras de estabilidad se aplicó a T₀ y consideró equivalente. Se utilizó CP4-04-109 como referencia para el resto del estudio. Las muestras se aplicaron en el siguiente orden de secuencia: blanco (1x), referencia (1x), muestras (2x), referencia (1x), blanco (1x), donde se realizó una inyección de referencia de paréntesis cada 15 muestras (30 inyecciones).

Resultados.

Electroforesis en gel de poliacrilamida en estado reducido. La pureza de todas las muestras de estabilidad se evaluó mediante SDS-PAGE en estado reducido. Los datos se muestran en la tabla 27.

Tabla 27. Resumen de resultados de estabilidad de SDS-PAGE en estado reducido para muestras de estabilidad de SAN-300 (los tiempos se miden en meses)

| Lote de muestra | Formulación | Condición | Momento | Cadena pesada (%) ^a | Cadena ligera (%) ^a | IgG (%) ^a | Pérdida de IgG intacta (%) |
|-----------------|---|-----------|---------|--------------------------------|--------------------------------|----------------------|----------------------------|
| NB1206p86A | 190 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol | Inicial | | 98,1 | 101,4 | 99,2 | 0,8 |
| | | -75 °C | 6M | 101,8 | 102,1 | 101,9 | -1,9 |
| | | | 12M | 99,2 | 99,0 | 99,2 | 0,8 |

| | | | | | | | |
|------------|--|--------------------|---------|-------|-------|-------|------|
| | 220 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5, 5,5 | 2-8 °C | 1M | 94,3 | 99,7 | 96,0 | 4,0 |
| | | | 3M | 94,1 | 92,7 | 93,6 | 6,4 |
| | | | 6M | 97,6 | 102,4 | 99,1 | 0,9 |
| | | | 9M | 97,6 | 95,9 | 97,1 | 2,9 |
| | | | 12M | 93,5 | 95,0 | 93,9 | 6,1 |
| | | 2-8 °C (invertida) | 6M | 101,0 | 102,7 | 101,5 | -1,5 |
| | | | 12M | 94,4 | 94,3 | 94,4 | 5,6 |
| | | 30 °C/65 °C/0 HR | 1M | 95,8 | 99,9 | 97,1 | 2,9 |
| | | | 3M | 88,9 | 82,3 | 86,6 | 13,4 |
| | | | 6M | 89,6 | 82,8 | 87,5 | 12,5 |
| | | | 9M | 80,8 | 77,3 | 79,6 | 20,4 |
| | | 40 °C/75 % HR | 12M | 79,3 | 73,9 | 77,7 | 22,3 |
| | | | 1M | 86,9 | 94,0 | 89,0 | 11,0 |
| 3M | 77,2 | | 75,8 | 76,7 | 23,3 | | |
| | 6M | 78,0 | 78,4 | 78,1 | 21,9 | | |
| | | Inicial | 103,4 | 97,2 | 101,4 | -1,4 | |
| | | -75 °C | 6M | 98,2 | 105,8 | 100,7 | -0,7 |
| NB1206p86C | 120 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5 | 2-8 °C | 3M | 98,2 | 96,7 | 97,7 | 2,3 |
| | | | 6M | 100,7 | 96,8 | 99,4 | 0,6 |
| | | 2-8 °C (invertida) | 6M | 100,7 | 98,9 | 97,8 | 2,2 |
| | | 30 °C/65 % HR | 3M | 95,7 | 92,2 | 94,6 | 5,4 |
| | | | 6M | 88,2 | 88,7 | 88,4 | 11,6 |
| | | 40 °C/75 % HR | 3M | 83,3 | 77,5 | 81,5 | 18,5 |
| 6M | 85,3 | | 79,3 | 83,3 | 16,7 | | |
| NB1206p86B | 180 mg/ml de SAN-300, histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0 | -75 °C | Inicial | 101,5 | 103,9 | 102,3 | -2,3 |
| | | | 6M | 97,5 | 105,3 | 100,1 | -0,1 |
| | | 12M | 98,8 | 101,6 | 99,6 | 0,4 | |
| | | | 2-8 °C | 1M | 99,9 | 97,3 | 99,1 |
| | | 3M | | 98,3 | 100,5 | 99,0 | 1,0 |
| | | 6M | | 97,8 | 101,6 | 99,1 | 0,9 |
| | | 9M | | 101,4 | 98,5 | 100,5 | -0,5 |
| | | 12M | | 96,7 | 99,3 | 97,4 | 2,6 |
| | | 2-8 °C (invertida) | 6M | 100,7 | 99,0 | 100,1 | -0,1 |
| | | | 12M | 93,5 | 94,6 | 93,8 | 6,2 |
| | | 30 °C/65 % HR | 1M | 95,8 | 92,0 | 94,5 | 5,5 |
| | | | 3M | 92,2 | 94,6 | 93,0 | 7,0 |
| | | | 6M | 88,3 | 93,2 | 89,9 | 10,1 |
| | | | 9M | 80,5 | 81,0 | 80,6 | 19,4 |
| | | 40 °C/75 % HR | 12M | 80,9 | 76,3 | 79,5 | 20,5 |
| | | | 1M | 87,9 | 84,7 | 86,8 | 13,2 |
| 3M | 81,2 | | 83,7 | 82,0 | 18,0 | | |
| | 6M | 71,3 | 76,2 | 72,9 | 27,1 | | |
| | | Inicial | 102,3 | 98,7 | 101,1 | -1,1 | |
| | | -75 °C | 6M | 97,2 | 99,1 | 97,8 | 2,2 |
| NB1206p86D | 120 mg/ml de SAN-300, histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 - 0,01 %, pH 6,0 | 2-8 °C | 3M | 100,0 | 94,8 | 98,3 | 1,7 |
| | | | 6M | 97,4 | 98,3 | 97,7 | 2,3 |
| | | 2-8 °C (Invertida) | 6M | 99,6 | 102,6 | 100,5 | -0,5 |
| | | 30 °C/65 % HR | 3M | 93,1 | 91,4 | 92,6 | 7,4 |
| | | | 6M | 90,7 | 88,5 | 90,0 | 10,0 |
| | | 40 °C/75 % HR | 3M | 83,5 | 88,1 | 85,0 | 15,0 |
| 6M | 78,2 | | 82,8 | 79,6 | 20,4 | | |

^a Se registran los datos en relación con la aplicación de referencia interna en el mismo gel.

Dada la variabilidad inherente a este método, se registraron las abundancias de las muestras de cadena pesada, cadena ligera, e IgG con respecto a los valores obtenidos para la aplicación de referencia interna en cada gel. Además, se registró también el porcentaje de pérdida de IgG.

- 5 Ambas formulaciones de alta concentración mostraban una tendencia comparable en todas las condiciones de almacenamiento y permanecieron estables al cabo de 12 meses a 2-8 °C. La histidina dio unos resultados ligeramente superiores a los del acetato en una mayoría de momentos para las muestras de 2-8 °C y de 30 °C. Se observaron reducciones pequeñas en el contenido de IgG (~5 %) en muestras a 2-8 °C en posición vertical para ambas formulaciones al cabo de 12 meses, con resultados comparables para muestras invertidas mantenidas a esta temperatura. Las muestras de doce meses mantenidas a - 75 °C para ambas formulaciones fueron comparables con las mediciones en el momento inicial. Las muestras de baja concentración de SAN-300 mostraron un pequeño aumento aparente en la estabilidad, con respecto a las soluciones de alta concentración asociadas. Aunque este efecto dependiente de la concentración en IgG intacta casi no fue detectable a 2-8 °C a los seis meses, fue más pronunciado a temperaturas elevadas (>5 % a 40 °C).
- 10
- 15 **Size Exclusion Chromatography (Cromatografía de exclusión por tamaño - SEC).** La pureza de las muestras del estudio de estabilidad de SAN-300 se evaluó mediante SEC (tabla 28), registrándose el porcentaje de abundancias de todas las especies de HMW y LMWI observadas.

20 Tabla 28. Resumen de resultados de estabilidad de SEC para muestras de estabilidad de SAN-300 (los puntos de tiempo se miden en meses)

| Lote de muestra | Formulación | Condición | Momento | Agregado 3 % área promedio | Agregado 2 % área promedio | Agregado 1 % área promedio | Monómero 0% área promedio | LMWI 1 % área promedio | LMWI 2 % área promedio |
|-----------------|---|--------------------|---|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|------------------------|------------------------|
| NB1206p86A | 190 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5. | Inicial | | - | 0,1 | 2,6 | 96,9 | - | 0,5 |
| | | -75 °C | 6M | - | 0,1 | 2,6 | 96,9 | - | 0,5 |
| | | | 12M | - | < 0,1 | 2,3 | 97,3 | - | 0,5 |
| | | 2-8 °C | 1M | - | 0,1 | 2,7 | 96,8 | - | 0,5 |
| | | | 3M | - | 0,1 | 3,0 | 96,4 | - | 0,5 |
| | | | 6M | - | 0,1 | 3,2 | 96,2 | - | 0,5 |
| | | | 9M | - | 0,1 | 3,1 | 96,2 | - | 0,5 |
| | | 2-8 °C (invertida) | 12M | - | 0,1 | 3,3 | 96,1 | - | 0,5 |
| | | | 6M | - | 0,1 | 3,4 | 96,0 | - | 0,5 |
| | | 30 °C/65 % HR | 12M | - | 0,1 | 3,3 | 96,1 | - | 0,5 |
| | | | 1M | - | 0,1 | 3,5 | 95,8 | - | 0,6 |
| | | | 3M | - | 0,2 | 4,4 | 94,5 | - | 0,9 |
| | | | 6M | - | 0,3 | 5,2 | 93,3 | - | 1,3 |
| | | 40 °C/75 % HR | 9M | - | 0,2 | 5,2 | 92,9 | - | 1,6 |
| | | | 12M | - | 0,4 | 5,7 | 88,0 | 4,1 | 1,9 |
| | | | 1M | - | 0,2 | 4,4 | 94,6 | - | 0,9 |
| | | | 3M | - | 0,6 | 6,2 | 91,2 | - | 2,0 |
| | | 6M | 0,3 | 1,0 | 8,8 | 80,1 | 3,3 | 6,6 | |
| NB1206p86C | 120 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5. | Inicial | | - | 0,1 | 2,0 | 97,4 | - | 0,5 |
| | | -75 °C | 6M | - | < 0,1 | 2,1 | 97,4 | - | 0,5 |
| | | | 3M | - | < 0,1 | 2,4 | 97,1 | - | 0,5 |
| | | 2-8 °C | 6M | - | 0,1 | 2,7 | 96,8 | - | 0,5 |
| | | | 6M | - | 0,1 | 2,6 | 96,8 | - | 0,5 |
| | | 30 °C/65 % HR | 6M | - | 0,1 | 3,3 | 95,8 | - | 0,9 |
| | | | 6M | - | 0,1 | 3,7 | 94,9 | - | 1,2 |
| | | 40 °C/75 % HR | 3M | - | 0,2 | 4,6 | 93,3 | - | 1,9 |
| | | | 6M | 0,1 | 0,5 | 6,0 | 83,4 | 3,0 | 7,0 |
| | | NB1206p86B | 180 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 250 mM, PS- | Inicial | | - | 0,1 | 2,6 | 96,9 |
| -75 °C | 6M | | | < 0,1 | 0,1 | 2,8 | 96,6 | - | 0,5 |
| | 12M | | | < 0,1 | 0,1 | 2,5 | 97,0 | - | 0,4 |
| 2-8 °C | 1M | | | - | 0,1 | 2,5 | 97,0 | - | 0,4 |
| | 3M | | | - | 0,1 | 2,8 | 96,7 | - | 0,5 |
| | 6M | | | < 0,1 | 0,1 | 3,1 | 96,3 | - | 0,5 |

| | | | | | | | | | |
|------------|---|--------------------|-----|-------|-----|-----|------|-----|-----|
| | 20 0,01 %, pH 6,0. | | 9M | < 0,1 | 0,1 | 2,7 | 96,6 | | 0,5 |
| | | | 12M | < 0,1 | 0,1 | 2,8 | 96,6 | - | 0,5 |
| | | 2-8 °C (invertida) | 6M | < 0,1 | 0,1 | 2,9 | 96,5 | - | 0,5 |
| | | | 12M | < 0,1 | 0,1 | 2,8 | 96,6 | - | 0,5 |
| | | 30 °C/65 % HR | 1M | - | 0,1 | 2,9 | 96,5 | - | 0,5 |
| | | | 3M | - | 0,2 | 3,6 | 95,4 | - | 0,8 |
| | | | 6M | < 0,1 | 0,2 | 4,2 | 94,4 | - | 1,2 |
| | | | 9M | < 0,1 | 0,2 | 4,5 | 93,7 | | 1,6 |
| | | | 12M | < 0,1 | 0,3 | 5,0 | 88,9 | 4,0 | 1,9 |
| | | 40 °C/75 % HR | 1M | - | 0,1 | 3,4 | 95,7 | - | 0,8 |
| | | | 3M | - | 0,4 | 5,0 | 92,9 | - | 1,7 |
| | | | 6M | 0,2 | 0,6 | 6,6 | 83,9 | 2,8 | 5,9 |
| NB1206p86D | 120 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0. | Inicial | | - | 0,1 | 2,3 | 97,2 | - | 0,4 |
| | | -75 °C | 6M | < 0,1 | 0,1 | 2,5 | 97,0 | - | 0,5 |
| | | | 3M | - | 0,1 | 2,3 | 97,2 | - | 0,5 |
| | | 2-8 °C | 6M | < 0,1 | 0,1 | 2,5 | 96,9 | - | 0,5 |
| | | | 6M | < 0,1 | 0,1 | 2,4 | 97,0 | - | 0,5 |
| | | 30 °C/65 % HR | 3M | - | 0,1 | 2,7 | 96,3 | - | 0,8 |
| | | | 6M | < 0,1 | 0,1 | 3,2 | 95,4 | - | 1,2 |
| | | 40 °C/75 % HR | 3M | - | 0,2 | 3,7 | 94,4 | - | 1,8 |
| | | | 6M | 0,1 | 0,3 | 4,8 | 85,6 | 2,9 | 6,3 |

- De manera similar a los datos de SDS-PAGE, los resultados de SEC mostraron que el SAN-300 de alta concentración formulado en histidina da como resultado una menor degradación del monómero con respecto al acetato. A los 12 meses, las muestras de histidina a 2-8 °C (monómero 96,6 %) eran casi indiferenciables del material en el momento inicial (monómero 96,9 %), mientras que la formulación de acetato mostraba niveles ligeramente elevados de material de HMW (figura 5). Los datos para las muestras invertidas y congeladas para ambas formulaciones fueron comparables con los resultados para las muestras de 2-8 °C en posición vertical. Las muestras en condiciones aceleradas y sometidas a estrés pusieron de manifiesto diferencias más pronunciadas entre las eficacias de las dos formulaciones de alta concentración. A los 6 meses, por ejemplo, las muestras de histidina a 40 °C mostraban un contenido de monómero de ~84 %, mientras que las muestras de acetato correspondientes mostraban solamente ~80 %. Estas diferencias en el contenido de monómero estaban asociadas casi totalmente con el contenido agregado, ya que la formación de LMWI no parecía depender del tampón. Como se muestra en las gráficas superpuestas representativas presentadas en la figura 6, se observó un total de tres especies de HMW durante el transcurso del estudio, donde el agregado 1 (dímero) representa la mayor parte del contenido de HMW. La formación de los agregados de orden superior 2 y 3 era dependiente tanto de la temperatura como del tampón, siendo la histidina de nuevo superior al tampón de acetato. Además del fragmento de SAN-300 LMWI 2, observado en todas las muestras a diferentes grados, las condiciones aceleradas y sometidas a estrés dieron lugar a la formación de LMWI 1, mostrada como un cresta posterior del pico del monómero.
- Los resultados para las formulaciones de baja concentración reflejaron los descritos anteriormente, donde las muestras tamponadas con acetato mostraron un contenido de monómero reducido en comparación con las muestras de histidina correspondientes (tabla 28). Como se esperaba, ambas formulaciones de baja concentración tuvieron una propensión disminuida a la formación de agregados en comparación con las de concentración alta. Este efecto fue muy dependiente de la temperatura, donde las diferencias en el agregado total entre las muestras de baja y alta concentración fueron ~0,5 % para las muestras de 2-8 °C y de hasta 3,5 % para las de 40 °C. La fragmentación en LMWI no dependía de la concentración de SAN-300.

Ejemplo 12: Estabilidad a largo plazo de las formulaciones de SAN-300: Heterogeneidad de carga

- La heterogeneidad de carga de las formulaciones de SAN-300 se evaluó con cromatografía de intercambio catiónico con el uso del diseño experimental descrito en el ejemplo 7.

Método

- Un sistema de HPCL Agilent 1100 se equipó con una columna ProPac WCX-10 CEX (Dionex, 4 x 250 mm) y una columna de protección Propac WCX-10G (Dionex, 4 x 50 mm). Las muestras de SAN-300 se diluyeron a 1,0 mg/ml en fase móvil A (fosfato de sodio 10 mM, pH 7,5) y se inyectaron 75 µl por duplicado. Se aplicó un gradiente usando tampón B (fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 7,5) y tampón C (fosfato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 2 M, pH 7,5), detectándose proteína mediante la absorbancia medida a 280 nm.

40

Las abundancias de pico principal, las variantes ácidas, y variantes básicas se obtuvieron para cada muestra como el porcentaje total del área de pico del cromatograma. Los dos lotes de SAN-300 (CP4-04-109 y CP4-04-106) utilizados para generar formulaciones para el presente estudio mostraron perfiles de carga ligeramente diferentes según lo determinado mediante CEX. Teniendo en cuenta esta variabilidad, también se registraron las especies principales, ácidas y básicas en tanto por ciento con respecto al estándar de referencia apropiado para el lote dentro de una determinada secuencia de HPLC. Las muestras se aplicaron en el siguiente orden de secuencia: blanco (1x), referencia CP4-04-109 (1x), referencia CP4-04-106 (1x), muestras (2x), referencia CP4-04-106 (1x), referencia CP4-04-106, blanco (1x), realizándose inyecciones de referencia de paréntesis cada 15 muestras (30 inyecciones).

5

10 Resultados.

La heterogeneidad de carga se determinó mediante CEX para todas las muestras de estabilidad. Los datos se muestran en la tabla 29 y la tabla 30. Se indicó el porcentaje de abundancias del pico principal, y las variantes de carga ácida y básica total.

15

Tabla 29. Resumen de resultados de CEX para muestras de estabilidad de SAN-300 (momentos medidos en meses)

| Lote de muestra | Formulación | Condición | Momento | Picos ácidos % área promedio | Picos medios % área promedio | Picos básicos % área promedio |
|-----------------------|---|-----------------------|---|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| NB1206p86A | 190 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5. | Inicial | | 34,7 | 56,4 | 9,0 |
| | | -75 °C | 6M | 34,8 | 56,2 | 9,0 |
| | | | 12M | 34,8 | 55,8 | 9,4 |
| | | 2-8 °C | 1M | 34,4 | 53,5 | 12,1 |
| | | | 3M | 33,6 | 54,5 | 11,9 |
| | | | 6M | 34,9 | 56,5 | 8,6 |
| | | | 9M | 33,5 | 57,4 | 9,0 |
| | | | 12M | 33,7 | 58,3 | 8,0 |
| | | 2-8 °C (invertida) | 6M | 34,9 | 56,7 | 8,4 |
| | | | 12M | 34,2 | 57,9 | 8,0 |
| | | 30 °C/65 % HR | 1M | 37,7 | 53,2 | 9,1 |
| | | | 3M | 46,3 | 46,6 | 6,7 |
| | | | 6M | 69,2 | 27,6 | 3,1 |
| | | | 9M | 78,4 | 17,4 | 4,2 |
| | | 40 °C/75 % HR | 12M | 85,8 | 12,5 | 1,7 |
| | | | 1M | 60,3 | 42,6 | 7,1 |
| 3M | 76,8 | | 19,6 | 3,7 | | |
| | | 6M | NA ^a | NA ^a | NA ^a | |
| NB1206p86C | 120 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5. | Inicial | | 34,6 | 56,9 | 8,6 |
| | | -75 °C | 6M | 35,4 | 56,1 | 8,5 |
| | | | 3M | 34,9 | 55,0 | 10,1 |
| | | 2-8 °C | 6M | 34,9 | 57,2 | 7,9 |
| | | | 6M | 35,1 | 57,1 | 7,8 |
| | | 30 °C/65 % HR | 3M | 47,4 | 47,0 | 5,6 |
| | | | 6M | 70,1 | 27,5 | 2,4 |
| | | 40 °C/75 % HR | 3M | 76,6 | 19,8 | 3,6 |
| | | | 6M | NA ^a | NA ^a | NA ^a |
| | | NB1206p86B | 180 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0. | Inicial | | 32,4 |
| -75 °C | 6M | | | 33,3 | 58,3 | 8,4 |
| | 12M | | | 32,8 | 58,6 | 8,6 |
| 2-8 °C | 1M | | | 32,6 | 55,8 | 11,6 |
| | 3M | | | 33,2 | 57,3 | 9,5 |
| | 6M | | | 34,4 | 58,7 | 6,9 |
| | 9M | | | 32,5 | 60,7 | 6,8 |
| | 12M | | | 34,0 | 59,7 | 6,4 |
| 2-8 °C (invertida) | 6M | | | 34,1 | 59,0 | 6,9 |
| | 12M | | | 34,3 | 59,0 | 6,7 |
| 30 °C/65 % HR | 1M | | | 36,4 | 56,3 | 7,3 |

| | | | | | | | |
|------------|---|--------------------|-----|-----------------|-----------------|-----------------|-----|
| | | | 3M | 46,1 | 49,4 | 4,5 | |
| | | | 6M | 65,9 | 32,3 | 1,8 | |
| | | | 9M | 75,2 | 22,8 | 2,0 | |
| | | | 12M | 81,3 | 17,0 | 1,7 | |
| | | 40 °C/75 % HR | 1M | 46,9 | 46,6 | 6,5 | |
| | | | 3M | 72,0 | 23,8 | 4,2 | |
| | | | 6M | NA ^a | NA ^a | NA ^a | |
| NB1206p86D | 120 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0. | Inicial | | | 32,3 | 59,3 | 8,5 |
| | | -75 °C | 6M | 31,9 | 60,5 | 7,6 | |
| | | 2-8 °C | 3M | 31,3 | 58,7 | 10,0 | |
| | | | 6M | 32,8 | 61,4 | 5,8 | |
| | | 2-8 °C (invertida) | 6M | 32,3 | 61,9 | 5,8 | |
| | | 30 °C/65 % HR | 3M | 45,1 | 49,7 | 5,2 | |
| | | | 6M | 65,9 | 33,0 | 1,1 | |
| | | 40 °C/75 % HR | 3M | 72,4 | 24,5 | 3,1 | |
| | | | 6M | NA ^a | NA ^a | NA ^a | |

^a Muestras no integradas, debido a la excesiva degradación

5 A diferencia de otros métodos analíticos usados en el presente estudio, se observó una pequeña variación en la heterogeneidad de carga entre los dos lotes de SAN-300 utilizados en la preparación de las muestras del estudio. Por esta razón, los resultados de CEX también se registraron como el porcentaje de cambio, con respecto al estándar de referencia específico del lote en una determinada secuencia de HPLC (véase la tabla 30).

10 Tabla 30. Resumen de resultados de CEX para muestras de estabilidad de SAN-300: Con respecto a la referencia interna (los momentos se miden en meses)

| Lote de muestra | Formulación | Condición | Momento | Picos ácidos % cambio respecto patrón ref. | Pico medio % cambio respecto patrón ref. | Picos básicos % cambio respecto patrón ref. |
|-----------------|---|--------------------|------------------|--|--|---|
| NB120ep86A | 190 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5. | Inicial | | 0,0 | -0,4 | 2,3 |
| | | -75 °C | 6M | 1,2 | -1,5 | 5,0 |
| | | | 12M ^a | 3,2 | -1,6 | -1,8 |
| | | 2-8 °C | 1M | 0,3 | 0,0 | -0,8 |
| | | | 3M | 4,5 | -4,3 | 9,5 |
| | | | 6M | 1,7 | -1,0 | -0,4 |
| | | | 0M | -0,1 | 1,3 | -6,3 |
| | | 2-8 °C (invertida) | 12M ^a | -0,1 | 2,8 | -16,0 |
| | | | 6M | 1,7 | -0,6 | -2,7 |
| | | 30 °C/65 % HR | 12M ^a | 1,3 | 2,1 | -16,9 |
| | | | 1M | 9,9 | -0,6 | -25,4 |
| | | | 3M | 45,4 | -18,3 | -38,6 |
| | | | 6M | 101,7 | -51,3 | -63,6 |
| | | 40 °C/75 % HR | 9M | 133,5 | -69,3 | -56,1 |
| | | | 12M ^a | 154,3 | -78,0 | -81,8 |
| | | | 1M | 46,6 | -20,4 | -41,8 |
| 3M | 138,7 | | -65,7 | -66,4 | | |
| | | 6M | ND | ND | ND | |
| NB1206p36C | 120 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 220 mM, PS-80 0,01 %, pH 5,5. | Inicial | | -0,2 | 0,5 | -2,4 |
| | | -75 °C | 6M | 3-0 | -1,7 | -0-6 |
| | | 2-8 °C | 3M | 8,4 | -3,4 | -7,1 |
| | | | 6M | 1,0 | 0,1 | -6,0 |
| | | 2-8 °C (invertida) | 6M | 2,2 | 0,1 | -9,3 |
| | | 30 °C/65 % HR | 3M | 47,4 | -17,6 | -48,1 |
| | | | 6M | 104,1 | -51,6 | -71,6 |

| | | | | | | |
|------------|---|--------------------|-------|-------|-------|-------|
| | | 40 °C/75 % HR | 3M | 136,1 | -65,3 | -66,5 |
| | | | 6M | ND | ND | ND |
| NBI206pB6B | 180 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0. | Inicial | | 0,6 | -0,1 | -1,9 |
| | | -75 °C | 6M | 4,2 | -2,4 | 1,4 |
| | | | 12M | 3,7 | -0,9 | -6,8 |
| | | 2-8 °C | 1M | 1,9 | 0,2 | -15,7 |
| | | | 3M | 4,3 | 0,7 | -15,5 |
| | | | 6M | 7,6 | -1,7 | -16,9 |
| | | | 9M | 4,5 | 2,3 | -28,8 |
| | | 2-8 °C (invertida) | 12M | 7,4 | 0,8 | -30,9 |
| | | | 6M | 6,6 | -1,3 | -16,1 |
| | | 30 °C/65 % HR | 12M | 8,3 | -0,3 | -26,6 |
| | | | 1M | 13,8 | 1,1 | -40,7 |
| | | | 3M | 44,8 | -13,1 | -60,4 |
| | | | 6M | 106,0 | -45,9 | -78,8 |
| | | 40 °C/75 % HR | 9M | 141,5 | -61,6 | -79,2 |
| 12M | 157,0 | | -71,3 | -81,2 | | |
| 1M | 46,6 | | -16,3 | -47,2 | | |
| 3M | 126,2 | | -58,2 | -62,5 | | |
| | | | 6M | ND | ND | ND |
| NBI2Q6p86D | 120 mg/ml de SAN-300, acetato 30 mM, sorbitol 250 mM, PS-20 0,01 %, pH 6,0. | Inicial | | 0,2 | -0,4 | 2,0 |
| | | -75 °C | 6M | -0,3 | 1,2 | -7,8 |
| | | | 3M | -1,7 | 3,2 | -11,5 |
| | | 2-80 | 6M | 2,6 | 2,8 | -30,2 |
| | | | 6M | 0,9 | 3,6 | -29,9 |
| | | 2-8 °C (invertida) | 6M | 0,9 | 3,6 | -29,9 |
| | | | 3M | 41,3 | -12,7 | -54,1 |
| | | 30 °C/65 % HR | 6M | 106,0 | -44,8 | -86,8 |
| | | | 3M | 127,5 | -56,9 | -72,7 |
| | | 40 °C/75 % HR | 6M | ND | ND | ND |
| 6M | ND | | ND | ND | | |

a Debido a un fallo de presión, no se aplicó la última referencia de paréntesis. Los valores se calculan usando una sola inyección de referencia.

b Muestras no integradas, debido a la excesiva degradación

5 Los dos grupos de datos fueron comparables.

10 Ambas formulaciones de alta concentración conservaron su perfil de heterogeneidad de carga inicial tras 12 meses de almacenamiento a -75 °C y 2-8 °C. Aunque los resultados para las formulaciones NB1206p86A y NB1206p86B eran prácticamente indistinguibles en las condiciones de almacenamiento, las condiciones aceleradas y sometidas a estrés mostraron más claramente que el sistema de tampón de histidina dio lugar a menores cambios en la heterogeneidad de carga de SAN-300. Tanto NB1206p86A como NB1206p86B mostraron tendencias similares a 30 °C y 40 °C, reteniendo la formulación de histidina continuamente su perfil de carga inicial en mayor medida. Se halló que el cambio a las variantes más ácidas a temperaturas elevadas no dependía de la concentración, ya que las muestras de concentración baja no eran distinguibles de las muestras de concentración alta asociadas.

15 Conclusiones

20 Ambas formulaciones de alta concentración mostraron una excelente estabilidad en un período de hasta 12 meses en las condiciones previstas de almacenamiento (-75 °C y 2-8 °C). Los resultados de SEC, SDS-PAGE y CEX indican que en comparación con la formulación de acetato, la formulación de histidina proporciona una mejor estabilidad a SAN-300.

Ejemplo 13: Formulación líquida ilustrativa

25 Se obtuvo una formulación líquida que contenía 180 mg/ml de anticuerpo monoclonal anti-VLA1 que tenía una secuencia de cadena ligera de la id. de sec. n.º 1 y una secuencia de cadena pesada de la id. de sec. n.º 2 en histidina 30 mM, sorbitol 250 mM, polisorbato 20 0,01 %, pH 6,0, con un volumen de llenado final de 1 ml/vial utilizando los métodos descritos en el ejemplo 6. La formulación cumplió cada uno de los criterios mostrados en la tabla 31. La formulación se envasó para el almacenamiento a 2-8 °C en un vial de vidrio de borosilicato de USP de tipo 1 de 2 ml

con un tapón a base de clorobutilo de 13 mm con recubrimiento de flourotech en el tapón y un recubrimiento de B2 en la parte superior y un sello superior de aluminio con tapa abatible.

Tabla 31 Especificaciones

5

| Propiedad | | Criterio |
|------------------------|--|--|
| General | Aspecto (véase USP<631>) | De transparente a opalescente ligeramente amarillo a amarillo esencialmente exento de materia en forma de partículas visible |
| | pH (véase USP<791>) | 5 - 7 |
| | Partículas (véase USP<788>) | partículas $\geq 10 \mu\text{m}$: ≤ 6.000 partículas por recipiente partículas $\geq 25 \mu\text{m}$: ≤ 600 partículas por recipiente |
| | Osmolalidad (véase USP<785>) | 270 - 380 mOsm/kg |
| | Concentración de proteína (A280) | 165 - 190 mg/ml |
| Identidad ¹ | Perfil de carga mediante toma de Imaging Capillary Isoelectric Focusing (Imagen de isoelectro enfoque capilar - icIEF) | pI del pico principal es $\pm 0,1$ con respecto al patrón de referencia |
| | Potencia (ELISA) | Demuestra la unión al dominio I de integrina $\alpha 1$ |
| Potencia biológica | Potencia (ELISA) | 80 % - 125 % del patrón de referencia |
| Pureza e impurezas | Impurezas mediante CE-SDS de reducción | Impurezas totales < 15,0 % |
| | Impurezas mediante CE-SDS sin reducción | Impurezas totales < 15,0 % |
| | Agregación por exclusión de tamaños Cromatografía (SEC) | $\leq 10,0$ % Agregación total |
| Seguridad | Endotoxina | $\leq 90,0$ UE/ml |
| | Esterilidad | Cumple con los requisitos de USP |

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> SANTARUS, INC.

<120> FORMULACIONES DE ANTICUERPOS

<130> C2095-7004WO

<140>

<141>

<150> 61/599,827

<151> 2012-02-16

<160> 6

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 213

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia Artificial:
Polipéptido sintético"

<400> 1

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn His Met
20 25 30

Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Trp Thr
85 90 95

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

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

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

ES 2 732 243 T3

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

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

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

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

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 2

<211> 447

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> fuente

<223> /nota="Descripción de la secuencia Artificial:
Polipéptido sintético"

<400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly His Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95

Arg Gly Phe Gly Asp Gly Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

ES 2 732 243 T3

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 130 135 140
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 145 150 155 160
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 165 170 175
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 180 185 190
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 195 200 205
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 210 215 220
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser

ES 2 732 243 T3

370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 3
 <211> 1179
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Met Ala Pro Arg Pro Arg Ala Arg Pro Gly Val Ala Val Ala Cys Cys
 1 5 10 15

Trp Leu Leu Thr Val Val Leu Arg Cys Cys Val Ser Phe Asn Val Asp
 20 25 30

Val Lys Asn Ser Met Thr Phe Ser Gly Pro Val Glu Asp Met Phe Gly
 35 40 45

Tyr Thr Val Gln Gln Tyr Glu Asn Glu Glu Gly Lys Trp Val Leu Ile
 50 55 60

Gly Ser Pro Leu Val Gly Gln Pro Lys Asn Arg Thr Gly Asp Val Tyr
 65 70 75 80

Lys Cys Pro Val Gly Arg Gly Glu Ser Leu Pro Cys Val Lys Leu Asp
 85 90 95

Leu Pro Val Asn Thr Ser Ile Pro Asn Val Thr Glu Val Lys Glu Asn
 100 105 110

Met Thr Phe Gly Ser Thr Leu Val Thr Asn Pro Asn Gly Gly Phe Leu
 115 120 125

Ala Cys Gly Pro Leu Tyr Ala Tyr Arg Cys Gly His Leu His Tyr Thr
 130 135 140

Thr Gly Ile Cys Ser Asp Val Ser Pro Thr Phe Gln Val Val Asn Ser
 145 150 155 160

ES 2 732 243 T3

Ile Ala Pro Val Gln Glu Cys Ser Thr Gln Leu Asp Ile Val Ile Val
165 170 175

Leu Asp Gly Ser Asn Ser Ile Tyr Pro Trp Asp Ser Val Thr Ala Phe
180 185 190

Leu Asn Asp Leu Leu Glu Arg Met Asp Ile Gly Pro Lys Gln Thr Gln
195 200 205

Val Gly Ile Val Gln Tyr Gly Glu Asn Val Thr His Glu Phe Asn Leu
210 215 220

Asn Lys Tyr Ser Ser Thr Glu Glu Val Leu Val Ala Ala Lys Lys Ile
225 230 235 240

Val Gln Arg Gly Gly Arg Gln Thr Met Thr Ala Leu Gly Ile Asp Thr
245 250 255

Ala Arg Lys Glu Ala Phe Thr Glu Ala Arg Gly Ala Arg Arg Gly Val
260 265 270

Lys Lys Val Met Val Ile Val Thr Asp Gly Glu Ser His Asp Asn His
275 280 285

Arg Leu Lys Lys Val Ile Gln Asp Cys Glu Asp Glu Asn Ile Gln Arg
290 295 300

Phe Ser Ile Ala Ile Leu Gly Ser Tyr Asn Arg Gly Asn Leu Ser Thr
305 310 315 320

Glu Lys Phe Val Glu Glu Ile Lys Ser Ile Ala Ser Glu Pro Thr Glu
325 330 335

Lys His Phe Phe Asn Val Ser Asp Glu Leu Ala Leu Val Thr Ile Val
340 345 350

Lys Thr Leu Gly Glu Arg Ile Phe Ala Leu Glu Ala Thr Ala Asp Gln
355 360 365

Ser Ala Ala Ser Phe Glu Met Glu Met Ser Gln Thr Gly Phe Ser Ala
370 375 380

His Tyr Ser Gln Asp Trp Val Met Leu Gly Ala Val Gly Ala Tyr Asp
385 390 395 400

Trp Asn Gly Thr Val Val Met Gln Lys Ala Ser Gln Ile Ile Ile Pro

ES 2 732 243 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| | | | | 405 | | | | | | 410 | | | | | | 415 |
| Arg | Asn | Thr | Thr | Phe | Asn | Val | Glu | Ser | Thr | Lys | Lys | Asn | Glu | Pro | Leu | |
| | | | 420 | | | | | 425 | | | | | 430 | | | |
| Ala | Ser | Tyr | Leu | Gly | Tyr | Thr | Val | Asn | Ser | Ala | Thr | Ala | Ser | Ser | Gly | |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | |
| Asp | Val | Leu | Tyr | Ile | Ala | Gly | Gln | Pro | Arg | Tyr | Asn | His | Thr | Gly | Gln | |
| | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | |
| Val | Ile | Ile | Tyr | Arg | Met | Glu | Asp | Gly | Asn | Ile | Lys | Ile | Leu | Gln | Thr | |
| 465 | | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 | |
| Leu | Ser | Gly | Glu | Gln | Ile | Gly | Ser | Tyr | Phe | Gly | Ser | Ile | Leu | Thr | Thr | |
| | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | 495 | | |
| Thr | Asp | Ile | Asp | Lys | Asp | Ser | Asn | Thr | Asp | Ile | Leu | Leu | Val | Gly | Ala | |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | |
| Pro | Met | Tyr | Met | Gly | Thr | Glu | Lys | Glu | Glu | Gln | Gly | Lys | Val | Tyr | Val | |
| | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | | |
| Tyr | Ala | Leu | Asn | Gln | Thr | Arg | Phe | Glu | Tyr | Gln | Met | Ser | Leu | Glu | Pro | |
| | 530 | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | | |
| Ile | Lys | Gln | Thr | Cys | Cys | Ser | Ser | Arg | Gln | His | Asn | Ser | Cys | Thr | Thr | |
| 545 | | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 | |
| Glu | Asn | Lys | Asn | Glu | Pro | Cys | Gly | Ala | Arg | Phe | Gly | Thr | Ala | Ile | Ala | |
| | | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | | |
| Ala | Val | Lys | Asp | Leu | Asn | Leu | Asp | Gly | Phe | Asn | Asp | Ile | Val | Ile | Gly | |
| | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | | |
| Ala | Pro | Leu | Glu | Asp | Asp | His | Gly | Gly | Ala | Val | Tyr | Ile | Tyr | His | Gly | |
| | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | | |
| Ser | Gly | Lys | Thr | Ile | Arg | Lys | Glu | Tyr | Ala | Gln | Arg | Ile | Pro | Ser | Gly | |
| | 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | | |
| Gly | Asp | Gly | Lys | Thr | Leu | Lys | Phe | Phe | Gly | Gln | Ser | Ile | His | Gly | Glu | |
| 625 | | | | | 630 | | | | | 635 | | | | | 640 | |
| Met | Asp | Leu | Asn | Gly | Asp | Gly | Leu | Thr | Asp | Val | Thr | Ile | Gly | Gly | Leu | |
| | | | | 645 | | | | | 650 | | | | | 655 | | |

ES 2 732 243 T3

Gly Gly Ala Ala Leu Phe Trp Ser Arg Asp Val Ala Val Val Lys Val
660 665 670

Thr Met Asn Phe Glu Pro Asn Lys Val Asn Ile Gln Lys Lys Asn Cys
675 680 685

His Met Glu Gly Lys Glu Thr Val Cys Ile Asn Ala Thr Val Cys Phe
690 695 700

Asp Val Lys Leu Lys Ser Lys Glu Asp Thr Ile Tyr Glu Ala Asp Leu
705 710 715 720

Gln Tyr Arg Val Thr Leu Asp Ser Leu Arg Gln Ile Ser Arg Ser Phe
725 730 735

Phe Ser Gly Thr Gln Glu Arg Lys Val Gln Arg Asn Ile Thr Val Arg
740 745 750

Lys Ser Glu Cys Thr Lys His Ser Phe Tyr Met Leu Asp Lys His Asp
755 760 765

Phe Gln Asp Ser Val Arg Ile Thr Leu Asp Phe Asn Leu Thr Asp Pro
770 775 780

Glu Asn Gly Pro Val Leu Asp Asp Ser Leu Pro Asn Ser Val His Glu
785 790 795 800

Tyr Ile Pro Phe Ala Lys Asp Cys Gly Asn Lys Glu Lys Cys Ile Ser
805 810 815

Asp Leu Ser Leu His Val Ala Thr Thr Glu Lys Asp Leu Leu Ile Val
820 825 830

Arg Ser Gln Asn Asp Lys Phe Asn Val Ser Leu Thr Val Lys Asn Thr
835 840 845

Lys Asp Ser Ala Tyr Asn Thr Arg Thr Ile Val His Tyr Ser Pro Asn
850 855 860

Leu Val Phe Ser Gly Ile Glu Ala Ile Gln Lys Asp Ser Cys Glu Ser
865 870 875 880

Asn His Asn Ile Thr Cys Lys Val Gly Tyr Pro Phe Leu Arg Arg Gly
885 890 895

Glu Met Val Thr Phe Lys Ile Leu Phe Gln Phe Asn Thr Ser Tyr Leu
900 905 910

ES 2 732 243 T3

Met Glu Asn Val Thr Ile Tyr Leu Ser Ala Thr Ser Asp Ser Glu Glu
 915 920 925

Pro Pro Glu Thr Leu Ser Asp Asn Val Val Asn Ile Ser Ile Pro Val
 930 935 940

Lys Tyr Glu Val Gly Leu Gln Phe Tyr Ser Ser Ala Ser Glu Tyr His
 945 950 955 960

Ile Ser Ile Ala Ala Asn Glu Thr Val Pro Glu Val Ile Asn Ser Thr
 965 970 975

Glu Asp Ile Gly Asn Glu Ile Asn Ile Phe Tyr Leu Ile Arg Lys Ser
 980 985 990

Gly Ser Phe Pro Met Pro Glu Leu Lys Leu Ser Ile Ser Phe Pro Asn
 995 1000 1005

Met Thr Ser Asn Gly Tyr Pro Val Leu Tyr Pro Thr Gly Leu Ser
 1010 1015 1020

Ser Ser Glu Asn Ala Asn Cys Arg Pro His Ile Phe Glu Asp Pro
 1025 1030 1035

Phe Ser Ile Asn Ser Gly Lys Lys Met Thr Thr Ser Thr Asp His
 1040 1045 1050

Leu Lys Arg Gly Thr Ile Leu Asp Cys Asn Thr Cys Lys Phe Ala
 1055 1060 1065

Thr Ile Thr Cys Asn Leu Thr Ser Ser Asp Ile Ser Gln Val Asn
 1070 1075 1080

Val Ser Leu Ile Leu Trp Lys Pro Thr Phe Ile Lys Ser Tyr Phe
 1085 1090 1095

Ser Ser Leu Asn Leu Thr Ile Arg Gly Glu Leu Arg Ser Glu Asn
 1100 1105 1110

Ala Ser Leu Val Leu Ser Ser Ser Asn Gln Lys Arg Glu Leu Ala
 1115 1120 1125

Ile Gln Ile Ser Lys Asp Gly Leu Pro Gly Arg Val Pro Leu Trp
 1130 1135 1140

Val Ile Leu Leu Ser Ala Phe Ala Gly Leu Leu Leu Leu Met Leu
 1145 1150 1155

ES 2 732 243 T3

Leu Ile Leu Ala Leu Trp Lys Ile Gly Phe Phe Lys Arg Pro Leu
 1160 1165 1170

Lys Lys Lys Met Glu Lys
 1175

<210> 4
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia Artificial:
 Polipéptido sintético"

<400> 4
 Gln Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn His Met
 20 25 30

Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 35 40 45

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Trp Thr
 85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 5
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <221> fuente
 <223> /nota="Descripción de la secuencia Artificial:
 Polipéptido sintético"

<400> 5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

ES 2 732 243 T3

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 20 25 30

Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly His Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 85 90 95

Arg Gly Phe Gly Asp Gly Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
 <211> 3540
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> CDS
 <222> (1) .. (3537)

<400> 6
 atg gcc cct cgg ccc cgc gcc cgc cca ggg gtc gct gtc gcc tgc tgc 48
 Met Ala Pro Arg Pro Arg Ala Arg Pro Gly Val Ala Val Ala Cys Cys
 1 5 10 15

tgg ctc ctc act gtt gtt cta cgc tgc tgc gta tca ttc aat gtt gat 96
 Trp Leu Leu Thr Val Val Leu Arg Cys Cys Val Ser Phe Asn Val Asp
 20 25 30

gtg aaa aat tca atg act ttc agc ggc ccg gtg gaa gac atg ttt gga 144
 Val Lys Asn Ser Met Thr Phe Ser Gly Pro Val Glu Asp Met Phe Gly
 35 40 45

tat act gtt caa caa tat gaa aat gaa gaa gga aaa tgg gtg ctt att 192
 Tyr Thr Val Gln Gln Tyr Glu Asn Glu Glu Gly Lys Trp Val Leu Ile
 50 55 60

ggt tct ccg tta gtt ggc caa ccc aaa aac aga act gga gat gtc tat 240
 Gly Ser Pro Leu Val Gly Gln Pro Lys Asn Arg Thr Gly Asp Val Tyr
 65 70 75 80

aag tgt cca gtt ggg aga ggt gaa tca tta cct tgt gta aag ttg gat 288
 Lys Cys Pro Val Gly Arg Gly Glu Ser Leu Pro Cys Val Lys Leu Asp
 85 90 95

ES 2 732 243 T3

| | |
|---|------|
| cta cca gtt aat aca tca att ccc aat gtc aca gaa gta aag gag aac | 336 |
| Leu Pro Val Asn Thr Ser Ile Pro Asn Val Thr Glu Val Lys Glu Asn | |
| 100 105 110 | |
| atg aca ttt gga tca act tta gtc acc aac cca aat gga gga ttt ctg | 384 |
| Met Thr Phe Gly Ser Thr Leu Val Thr Asn Pro Asn Gly Gly Phe Leu | |
| 115 120 125 | |
| gct tgt ggg ccc tta tat gcc tat aga tgt gga cat ttg cat tac aca | 432 |
| Ala Cys Gly Pro Leu Tyr Ala Tyr Arg Cys Gly His Leu His Tyr Thr | |
| 130 135 140 | |
| act gga atc tgt tct gac gtc agc ccc aca ttt caa gtc gtg aat tcc | 480 |
| Thr Gly Ile Cys Ser Asp Val Ser Pro Thr Phe Gln Val Val Asn Ser | |
| 145 150 155 160 | |
| att gcc cct gta caa gaa tgc agc act caa ctg gac ata gtc ata gtg | 528 |
| Ile Ala Pro Val Gln Glu Cys Ser Thr Gln Leu Asp Ile Val Ile Val | |
| 165 170 175 | |
| ctg gat ggt tcc aac agt att tac cca tgg gac agt gtt aca gct ttt | 576 |
| Leu Asp Gly Ser Asn Ser Ile Tyr Pro Trp Asp Ser Val Thr Ala Phe | |
| 180 185 190 | |
| tta aat gac ctt ctt gaa aga atg gat att ggt cct aaa cag aca cag | 624 |
| Leu Asn Asp Leu Leu Glu Arg Met Asp Ile Gly Pro Lys Gln Thr Gln | |
| 195 200 205 | |
| gtt gga att gta cag tat gga gaa aac gtg acc cat gag ttc aac ctc | 672 |
| Val Gly Ile Val Gln Tyr Gly Glu Asn Val Thr His Glu Phe Asn Leu | |
| 210 215 220 | |
| aat aag tat tct tcc acc gaa gag gta ctt gtt gca gca aag aaa ata | 720 |
| Asn Lys Tyr Ser Ser Thr Glu Glu Val Leu Val Ala Ala Lys Lys Ile | |
| 225 230 235 240 | |
| gtc cag aga ggt ggc cgc cag act atg aca gct ctt gga ata gac aca | 768 |
| Val Gln Arg Gly Gly Arg Gln Thr Met Thr Ala Leu Gly Ile Asp Thr | |
| 245 250 255 | |
| gca aga aag gag gca ttc acg gaa gcc cgg ggt gcc cga aga gga gtt | 816 |
| Ala Arg Lys Glu Ala Phe Thr Glu Ala Arg Gly Ala Arg Arg Gly Val | |
| 260 265 270 | |
| aaa aaa gtc atg gtt att gtg aca gat gga gag tct cat gac aat cat | 864 |
| Lys Lys Val Met Val Ile Val Thr Asp Gly Glu Ser His Asp Asn His | |
| 275 280 285 | |
| cga ctg aag aag gtc atc caa gac tgt gaa gat gaa aac att caa cgg | 912 |
| Arg Leu Lys Lys Val Ile Gln Asp Cys Glu Asp Glu Asn Ile Gln Arg | |
| 290 295 300 | |
| ttt tcc ata gct att ctt ggc agc tat aac cga gga aat tta agc act | 960 |
| Phe Ser Ile Ala Ile Leu Gly Ser Tyr Asn Arg Gly Asn Leu Ser Thr | |
| 305 310 315 320 | |
| gaa aaa ttt gtg gag gaa ata aaa tca att gca agt gaa ccc act gaa | 1008 |
| Glu Lys Phe Val Glu Glu Ile Lys Ser Ile Ala Ser Glu Pro Thr Glu | |
| 325 330 335 | |
| aag cat ttc ttc aat gtc tct gat gaa ttg gct cta gtc acc att gtt | 1056 |
| Lys His Phe Phe Asn Val Ser Asp Glu Leu Ala Leu Val Thr Ile Val | |

ES 2 732 243 T3

| 340 | | | | | 345 | | | | | 350 | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|
| aaa | act | ctg | gga | gaa | aga | ata | ttt | gcc | ctg | gaa | gcc | aca | gct | gac | cag | 1104 |
| Lys | Thr | Leu | Gly | Glu | Arg | Ile | Phe | Ala | Leu | Glu | Ala | Thr | Ala | Asp | Gln | |
| | | 355 | | | | | 360 | | | | | 365 | | | | |
| tca | gca | gct | tca | ttt | gaa | atg | gaa | atg | tct | cag | act | ggc | ttc | agt | gct | 1152 |
| Ser | Ala | Ala | Ser | Phe | Glu | Met | Glu | Met | Ser | Gln | Thr | Gly | Phe | Ser | Ala | |
| | 370 | | | | | 375 | | | | | 380 | | | | | |
| cat | tat | tca | cag | gac | tgg | gtc | atg | ctt | gga | gca | gta | gga | gcc | tat | gat | 1200 |
| His | Tyr | Ser | Gln | Asp | Trp | Val | Met | Leu | Gly | Ala | Val | Gly | Ala | Tyr | Asp | |
| | 385 | | | | 390 | | | | | 395 | | | | | 400 | |
| tgg | aat | gga | aca | gtt | gtc | atg | cag | aag | gct | agt | caa | atc | ata | atc | cct | 1248 |
| Trp | Asn | Gly | Thr | Val | Val | Met | Gln | Lys | Ala | Ser | Gln | Ile | Ile | Ile | Pro | |
| | | | | 405 | | | | | 410 | | | | | | 415 | |
| cga | aac | aca | acc | ttt | aat | gtt | gag | tct | acc | aaa | aag | aat | gaa | ccg | ctt | 1296 |
| Arg | Asn | Thr | Thr | Phe | Asn | Val | Glu | Ser | Thr | Lys | Lys | Asn | Glu | Pro | Leu | |
| | | | 420 | | | | | | 425 | | | | 430 | | | |
| gct | tct | tat | tta | ggt | tac | act | gta | aac | tct | gct | act | gct | tct | tct | gga | 1344 |
| Ala | Ser | Tyr | Leu | Gly | Tyr | Thr | Val | Asn | Ser | Ala | Thr | Ala | Ser | Ser | Gly | |
| | | 435 | | | | | 440 | | | | | 445 | | | | |
| gat | gtg | ctc | tat | att | gct | gga | cag | cct | cgg | tac | aat | cat | aca | ggc | cag | 1392 |
| Asp | Val | Leu | Tyr | Ile | Ala | Gly | Gln | Pro | Arg | Tyr | Asn | His | Thr | Gly | Gln | |
| | 450 | | | | | 455 | | | | | 460 | | | | | |
| gtc | att | atc | tac | agg | atg | gaa | gat | gga | aac | atc | aaa | att | ctc | cag | acg | 1440 |
| Val | Ile | Ile | Tyr | Arg | Met | Glu | Asp | Gly | Asn | Ile | Lys | Ile | Leu | Gln | Thr | |
| | 465 | | | | 470 | | | | | 475 | | | | | 480 | |
| ctc | agt | gga | gaa | cag | att | ggt | tcc | tac | ttt | ggc | agt | att | tta | aca | aca | 1488 |
| Leu | Ser | Gly | Glu | Gln | Ile | Gly | Ser | Tyr | Phe | Gly | Ser | Ile | Leu | Thr | Thr | |
| | | | | 485 | | | | | 490 | | | | | | 495 | |
| act | gac | att | gac | aag | gat | tct | aat | act | gac | att | ctt | cta | gtc | gga | gcc | 1536 |
| Thr | Asp | Ile | Asp | Lys | Asp | Ser | Asn | Thr | Asp | Ile | Leu | Leu | Val | Gly | Ala | |
| | | | 500 | | | | | 505 | | | | | 510 | | | |
| cct | atg | tac | atg | gga | aca | gag | aag | gag | gag | caa | gga | aaa | gtg | tat | gtg | 1584 |
| Pro | Met | Tyr | Met | Gly | Thr | Glu | Lys | Glu | Glu | Gln | Gly | Lys | Val | Tyr | Val | |
| | | 515 | | | | | 520 | | | | | 525 | | | | |
| tat | gct | ctc | aat | cag | aca | agg | ttt | gaa | tat | caa | atg | agc | ctg | gaa | cct | 1632 |
| Tyr | Ala | Leu | Asn | Gln | Thr | Arg | Phe | Glu | Tyr | Gln | Met | Ser | Leu | Glu | Pro | |
| | 530 | | | | | 535 | | | | | 540 | | | | | |
| att | aag | cag | acg | tgc | tgt | tca | tct | cgg | cag | cac | aat | tca | tgc | aca | aca | 1680 |
| Ile | Lys | Gln | Thr | Cys | Cys | Ser | Ser | Arg | Gln | His | Asn | Ser | Cys | Thr | Thr | |
| | 545 | | | | 550 | | | | | 555 | | | | | 560 | |
| gaa | aac | aaa | aat | gag | cca | tgc | ggg | gct | cgT | ttt | gga | act | gca | att | gct | 1728 |
| Glu | Asn | Lys | Asn | Glu | Pro | Cys | Gly | Ala | Arg | Phe | Gly | Thr | Ala | Ile | Ala | |
| | | | | 565 | | | | | 570 | | | | | 575 | | |
| gct | gta | aaa | gac | ctc | aat | ctt | gat | gga | ttt | aat | gac | atc | gtg | ata | gga | 1776 |
| Ala | Val | Lys | Asp | Leu | Asn | Leu | Asp | Gly | Phe | Asn | Asp | Ile | Val | Ile | Gly | |
| | | | 580 | | | | | 585 | | | | | 590 | | | |
| gct | ccg | ctg | gaa | gat | gat | cac | ggg | gga | gct | gtg | tac | att | tat | cat | gga | 1824 |

ES 2 732 243 T3

| | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|------|
| Ala | Pro | Leu | Glu | Asp | Asp | His | Gly | Gly | Ala | Val | Tyr | Ile | Tyr | His | Gly | | |
| | | 595 | | | | | 600 | | | | | 605 | | | | | |
| agt | ggc | aag | act | ata | agg | aaa | gag | tat | gca | caa | cgt | att | cca | tca | ggc | | 1872 |
| Ser | Gly | Lys | Thr | Ile | Arg | Lys | Glu | Tyr | Ala | Gln | Arg | Ile | Pro | Ser | Gly | | |
| | 610 | | | | | 615 | | | | | 620 | | | | | | |
| ggg | gat | ggt | aag | aca | ctg | aaa | ttt | ttt | ggc | cag | tct | atc | cac | gga | gaa | | 1920 |
| Gly | Asp | Gly | Lys | Thr | Leu | Lys | Phe | Phe | Gly | Gln | Ser | Ile | His | Gly | Glu | | |
| | 625 | | | | 630 | | | | 635 | | | | | 640 | | | |
| atg | gat | tta | aat | ggt | gac | ggt | ctg | aca | gat | gtg | act | att | ggg | ggc | ctt | | 1968 |
| Met | Asp | Leu | Asn | Gly | Asp | Gly | Leu | Thr | Asp | Val | Thr | Ile | Gly | Gly | Leu | | |
| | | | | 645 | | | | | 650 | | | | | 655 | | | |
| ggt | ggt | gct | gcc | ctc | ttc | tgg | tcc | cga | gat | gtg | gcc | gta | gtt | aaa | gtg | | 2016 |
| Gly | Gly | Ala | Ala | Leu | Phe | Trp | Ser | Arg | Asp | Val | Ala | Val | Val | Lys | Val | | |
| | | | 660 | | | | | 665 | | | | | 670 | | | | |
| acc | atg | aat | ttt | gag | cca | aat | aaa | gtg | aat | att | caa | aag | aaa | aac | tgc | | 2064 |
| Thr | Met | Asn | Phe | Glu | Pro | Asn | Lys | Val | Asn | Ile | Gln | Lys | Lys | Asn | Cys | | |
| | | 675 | | | | | 680 | | | | | 685 | | | | | |
| cat | atg | gag | gga | aag | gaa | aca | gta | tgc | ata | aat | gct | aca | gtg | tgt | ttt | | 2112 |
| His | Met | Glu | Gly | Lys | Glu | Thr | Val | Cys | Ile | Asn | Ala | Thr | Val | Cys | Phe | | |
| | 690 | | | | | 695 | | | | | 700 | | | | | | |
| gat | gtg | aaa | tta | aag | tct | aaa | gaa | gac | acg | att | tat | gaa | gct | gat | ttg | | 2160 |
| Asp | Val | Lys | Leu | Lys | Ser | Lys | Glu | Asp | Thr | Ile | Tyr | Glu | Ala | Asp | Leu | | |
| | 705 | | | | 710 | | | | | 715 | | | | | 720 | | |
| cag | tac | cgt | gtc | acc | cta | gat | tca | cta | aga | caa | ata | tca | cga | agt | ttt | | 2208 |
| Gln | Tyr | Arg | Val | Thr | Leu | Asp | Ser | Leu | Arg | Gln | Ile | Ser | Arg | Ser | Phe | | |
| | | | | 725 | | | | | 730 | | | | | 735 | | | |
| ttc | tct | gga | act | caa | gag | aga | aag | gtt | caa | agg | aac | atc | aca | gtt | cga | | 2256 |
| Phe | Ser | Gly | Thr | Gln | Glu | Arg | Lys | Val | Gln | Arg | Asn | Ile | Thr | Val | Arg | | |
| | | | 740 | | | | | 745 | | | | | 750 | | | | |
| aaa | tca | gaa | tgc | act | aag | cac | tcc | ttc | tac | atg | ttg | gac | aag | cat | gac | | 2304 |
| Lys | Ser | Glu | Cys | Thr | Lys | His | Ser | Phe | Tyr | Met | Leu | Asp | Lys | His | Asp | | |
| | | 755 | | | | | 760 | | | | | 765 | | | | | |
| ttt | cag | gac | tct | gtg | aga | ata | acg | ttg | gac | ttt | aat | ctt | acc | gat | cca | | 2352 |
| Phe | Gln | Asp | Ser | Val | Arg | Ile | Thr | Leu | Asp | Phe | Asn | Leu | Thr | Asp | Pro | | |
| | 770 | | | | | 775 | | | | | 780 | | | | | | |
| gaa | aat | ggg | cct | gtt | ctt | gat | gat | tct | cta | cca | aac | tca | gta | cat | gaa | | 2400 |
| Glu | Asn | Gly | Pro | Val | Leu | Asp | Asp | Ser | Leu | Pro | Asn | Ser | Val | His | Glu | | |
| | 785 | | | | 790 | | | | | 795 | | | | | 800 | | |
| tat | att | ccc | ttt | gcc | aaa | gat | tgt | gga | aat | aag | gaa | aaa | tgt | atc | tca | | 2448 |
| Tyr | Ile | Pro | Phe | Ala | Lys | Asp | Cys | Gly | Asn | Lys | Glu | Lys | Cys | Ile | Ser | | |
| | | | | 805 | | | | | 810 | | | | | 815 | | | |
| gac | ctc | agc | ctg | cat | gtc | gcc | acc | act | gaa | aag | gac | ctg | ctg | att | gtc | | 2496 |
| Asp | Leu | Ser | Leu | His | Val | Ala | Thr | Thr | Glu | Lys | Asp | Leu | Leu | Ile | Val | | |
| | | | 820 | | | | | 825 | | | | | 830 | | | | |
| cga | tcc | cag | aat | gat | aag | ttc | aac | gtt | agc | ctc | aca | gtc | aaa | aat | aca | | 2544 |
| Arg | Ser | Gln | Asn | Asp | Lys | Phe | Asn | Val | Ser | Leu | Thr | Val | Lys | Asn | Thr | | |
| | | 835 | | | | | 840 | | | | | 845 | | | | | |

ES 2 732 243 T3

| | |
|---|------|
| aag gac agt gcc tat aac acc agg aca ata gtg cat tat tct cca aat | 2592 |
| Lys Asp Ser Ala Tyr Asn Thr Arg Thr Ile Val His Tyr Ser Pro Asn | |
| 850 855 860 | |
| cta gtt ttt tca gga att gag gct atc caa aaa gac agt tgt gaa tct | 2640 |
| Leu Val Phe Ser Gly Ile Glu Ala Ile Gln Lys Asp Ser Cys Glu Ser | |
| 865 870 875 880 | |
| aat cat aat atc aca tgt aaa gtt gga tat ccc ttc ctg aga aga gga | 2688 |
| Asn His Asn Ile Thr Cys Lys Val Gly Tyr Pro Phe Leu Arg Arg Gly | |
| 885 890 895 | |
| gag atg gta act ttc aaa ata ttg ttt cag ttt aac aca tcc tat ctc | 2736 |
| Glu Met Val Thr Phe Lys Ile Leu Phe Gln Phe Asn Thr Ser Tyr Leu | |
| 900 905 910 | |
| atg gaa aat gtg acc att tat tta agt gca aca agt gac agc gaa gaa | 2784 |
| Met Glu Asn Val Thr Ile Tyr Leu Ser Ala Thr Ser Asp Ser Glu Glu | |
| 915 920 925 | |
| cct cct gaa acc ctt tct gat aat gta gta aac att tct atc ccg gta | 2832 |
| Pro Pro Glu Thr Leu Ser Asp Asn Val Val Asn Ile Ser Ile Pro Val | |
| 930 935 940 | |
| aaa tat gaa gtt gga cta cag ttt tac agc tct gca agt gaa tac cac | 2880 |
| Lys Tyr Glu Val Gly Leu Gln Phe Tyr Ser Ser Ala Ser Glu Tyr His | |
| 945 950 955 960 | |
| att tca att gct gcc aat gag aca gtc cct gaa gtt att aat tct act | 2928 |
| Ile Ser Ile Ala Ala Asn Glu Thr Val Pro Glu Val Ile Asn Ser Thr | |
| 965 970 975 | |
| gag gac att gga aat gaa att aat atc ttc tac ttg att aga aaa agt | 2976 |
| Glu Asp Ile Gly Asn Glu Ile Asn Ile Phe Tyr Leu Ile Arg Lys Ser | |
| 980 985 990 | |
| gga tct ttt cca atg cca gag ctt aag ctg tca att tca ttc ccc aat | 3024 |
| Gly Ser Phe Pro Met Pro Glu Leu Lys Leu Ser Ile Ser Phe Pro Asn | |
| 995 1000 1005 | |
| atg aca tca aat ggt tac cct gtg ctg tac cca act gga ttg tca | 3069 |
| Met Thr Ser Asn Gly Tyr Pro Val Leu Tyr Pro Thr Gly Leu Ser | |
| 1010 1015 1020 | |
| tct tct gag aat gca aac tgc aga ccc cat atc ttt gag gat cct | 3114 |
| Ser Ser Glu Asn Ala Asn Cys Arg Pro His Ile Phe Glu Asp Pro | |
| 1025 1030 1035 | |
| ttc agt atc aac tct gga aag aaa atg act aca tca act gac cat | 3159 |
| Phe Ser Ile Asn Ser Gly Lys Lys Met Thr Thr Ser Thr Asp His | |
| 1040 1045 1050 | |
| ctc aaa cga ggc aca att ctg gac tgc aat aca tgt aaa ttt gct | 3204 |
| Leu Lys Arg Gly Thr Ile Leu Asp Cys Asn Thr Cys Lys Phe Ala | |
| 1055 1060 1065 | |
| acc atc aca tgt aat ctc act tct tct gac atc agc caa gtc aat | 3249 |
| Thr Ile Thr Cys Asn Leu Thr Ser Ser Asp Ile Ser Gln Val Asn | |
| 1070 1075 1080 | |
| gtt tcg ctt atc ttg tgg aaa cca act ttt ata aaa tca tat ttt | 3294 |
| Val Ser Leu Ile Leu Trp Lys Pro Thr Phe Ile Lys Ser Tyr Phe | |
| 1085 1090 1095 | |

ES 2 732 243 T3

| | |
|---|------|
| tcc agc tta aat ctt act ata agg gga gaa ctt cgg agt gaa aat | 3339 |
| Ser Ser Leu Asn Leu Thr Ile Arg Gly Glu Leu Arg Ser Glu Asn | |
| 1100 1105 1110 | |
| | |
| gca tct ctg gtt tta agt agc agc aat caa aaa aga gag ctt gct | 3384 |
| Ala Ser Leu Val Leu Ser Ser Ser Asn Gln Lys Arg Glu Leu Ala | |
| 1115 1120 1125 | |
| | |
| att caa ata tcc aaa gat ggg cta ccg ggc aga gtg cca tta tgg | 3429 |
| Ile Gln Ile Ser Lys Asp Gly Leu Pro Gly Arg Val Pro Leu Trp | |
| 1130 1135 1140 | |
| | |
| gtc atc ctg ctg agt gct ttt gcc gga ttg ttg ctg tta atg ctg | 3474 |
| Val Ile Leu Leu Ser Ala Phe Ala Gly Leu Leu Leu Leu Met Leu | |
| 1145 1150 1155 | |
| | |
| ctc att tta gca ctg tgg aag att gga ttc ttc aaa aga cca ctg | 3519 |
| Leu Ile Leu Ala Leu Trp Lys Ile Gly Phe Phe Lys Arg Pro Leu | |
| 1160 1165 1170 | |
| | |
| aaa aag aaa atg gag aaa tga | 3540 |
| Lys Lys Lys Met Glu Lys | |
| 1175 | |

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica acuosa de anticuerpos que comprende
 - 5 (i) de 165 mg/ml a 190 mg/ml de un anticuerpo anti-VLA-1 (anti-antígeno muy tardío-1) que tiene una secuencia de aminoácidos de cadena ligera de id. de sec. n.º 1 y una secuencia de aminoácidos de cadena pesada de id. de sec. n.º 2, que comprende, además,
 - 10 (ii) histidina a una concentración de 25 mM a 35 mM;
 - (iii) sorbitol a una concentración de 170 mM a 288 mM; y
 - (iv) polisorbato a una concentración de 0,008 % a 0,012 %,

15 y en donde la composición tiene un pH de 5 a 7.
2. La composición farmacéutica acuosa de anticuerpos de la reivindicación 1, en donde dicho polisorbato es polisorbato 20 o polisorbato 80.
- 20 3. La composición farmacéutica acuosa de anticuerpos de la reivindicación 1, en donde la composición comprende:
 - (a) 180 mg/ml del anticuerpo anti-VLA-1;
 - (b) histidina 30 mM;
 - 25 (c) sorbitol 250 mM; y
 - (d) 0,01 % polisorbato 20,

30 y en donde la composición tiene un pH de 6,0.
4. La composición farmacéutica acuosa de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para usar en el tratamiento de un paciente con un trastorno inflamatorio, inmunitario, o autoinmune.
- 35 5. La composición farmacéutica acuosa de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para usar en el tratamiento de un paciente con un trastorno inflamatorio.
6. La composición farmacéutica acuosa de anticuerpos de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 para usar en el tratamiento de un paciente con artritis reumatoide o inflamación intestinal.
- 40 7. La composición farmacéutica acuosa de anticuerpos para usar según la reivindicación 5, en donde dicho tratamiento comprende administrar la composición farmacéutica acuosa de anticuerpos mediante administración subcutánea.
- 45 8. La composición farmacéutica acuosa de anticuerpos para usar según la reivindicación 5, en donde dicho tratamiento comprende administrar la composición farmacéutica acuosa de anticuerpos mediante administración semanal.
9. La composición farmacéutica acuosa de anticuerpos para usar según la reivindicación 5, en donde dicho tratamiento comprende administrar la composición farmacéutica acuosa de anticuerpos mediante administración semanal durante al menos 6 semanas.
- 50 10. La composición farmacéutica acuosa de anticuerpos para usar según la reivindicación 5, en donde dicho tratamiento comprende administrar la composición farmacéutica acuosa de anticuerpos a dicho paciente a una dosis de 2,0 mg/kg a 6,0 mg/kg.
- 55 11. La composición farmacéutica acuosa de anticuerpos para usar según la reivindicación 6, en donde dicho paciente ha demostrado una respuesta inadecuada a un tratamiento alternativo anterior.
- 60 12. La composición farmacéutica acuosa de anticuerpos para usar según la reivindicación 11, en donde dicho paciente tiene artritis reumatoide y no ha logrado alcanzar la puntuación ACR20 después del tratamiento alternativo anterior para la artritis reumatoide.

FIG. 1A

```

atg gcc cct cgg ccc cgc gcc cgc cca ggg gtc gct gtc gcc tgc tgc tgg ctc ctc act 60
  M  A  P  R  P  R  A  R  P  G  V  A  V  A  C  C  W  L  L  T 20
gtt gtt cta cgc tgc tgc gta tca ttc aat gtt gat gtg aaa aat tca atg act ttc agc 120
  V  V  L  R  C  C  V  S  F  N  V  D  V  K  N  S  M  T  F  S 40
ggc ccg gtg gaa gac atg ttt gga tat act gtt caa caa tat gaa aat gaa gaa gga aaa 180
  G  P  V  E  D  M  F  G  Y  T  V  Q  Q  Y  E  N  E  E  G  K 60
tgg gtg ctt att ggt tct ccg tta gtt ggc caa ccc aaa aac aga act gga gat gtc tat 240
  W  V  L  I  G  S  P  L  V  G  Q  P  K  N  R  T  G  D  V  Y 80
aag tgt cca gtt ggg aga ggt gaa tca tta cct tgt gta aag ttg gat cta cca gtt aat 300
  K  C  P  V  G  R  G  E  S  L  P  C  V  K  L  D  L  P  V  N 100
aca tca att ccc aat gtc aca gaa gta aag gag aac atg aca ttt gga tca act tta gtc 360
  T  S  I  P  N  V  T  E  V  K  E  N  M  T  F  G  S  T  L  V 120
acc aac cca aat gga gga ttt ctg gct tgt ggg ccc tta tat gcc tat aga tgt gga cat 420
  T  N  P  N  G  G  F  L  A  C  G  P  L  Y  A  Y  R  C  G  H 140
ttg cat tac aca act gga atc tgt tct gac gtc agc ccc aca ttt caa gtc gtg aat tcc 480
  L  H  Y  T  T  G  I  C  S  D  V  S  P  T  F  Q  V  V  N  S 160


---


att gcc cct gta caa gaa tgc agc act caa ctg gac ata gtc ata gtg ctg gat ggt tcc 540
  I  A  P  V  Q  E  C  S  T  Q  L  D  I  V  I  V  L  D  G  S 180


---


aac agt att tac cca tgg gac agt gtt aca gct ttt tta aat gac ctt ctt gaa aga atg 600
  N  S  I  Y  P  W  D  S  V  T  A  F  L  N  D  L  L  E  R  M 200


---


gat att ggt cct aaa cag aca cag gtt gga att gta cag tat gga gaa aac gtg acc cat 660
  D  I  G  P  K  Q  T  Q  V  G  I  V  Q  Y  G  E  N  V  T  H 220


---


gag ttc aac ctc aat aag tat tct tcc acc gaa gag gta ctt gtt gca gca aag aaa ata 720
  E  F  N  L  N  K  Y  S  S  T  E  E  V  L  V  A  A  K  K  I 240


---


gtc cag aga ggt ggc cgc cag act atg aca gct ctt gga ata gac aca gca aga aag gag 780
  V  Q  R  G  G  R  Q  T  M  T  A  L  G  I  D  T  A  R  K  E 260


---


gca ttc acg gaa gcc cgg ggt gcc cga aga gga gtt aaa aaa gtc atg gtt att gtg aca 840
  A  F  T  E  A  R  G  A  R  R  G  V  K  K  V  M  V  I  V  T 280


---


gat gga gag tct cat gac aat cat cga ctg aag aag gtc atc caa gac tgt gaa gat gaa 900
  D  G  E  S  H  D  N  H  R  L  K  K  V  I  Q  D  C  E  D  E 300


---


aac att caa cgg ttt tcc ata gct att ctt ggc agc tat aac cga gga aat tta agc act 960
  N  I  Q  R  F  S  I  A  I  L  G  S  Y  N  R  G  N  L  S  T 320


---



```

FIG. 1B

gaa aaa ttt gtg gag gaa ata aaa tca att gca agt gaa ccc act gaa aag cat ttc ttc 1020
 E K F V E E I K S I A S E P T E K H F F 340

aat gtc tct gat gaa ttg gct cta gtc acc att gtt aaa act ctg gga gaa aga ata ttt 1080
 N V S D E L A L V T I V K T L G E R I F 360

gcc ctg gaa gcc aca gct gac cag tca gca gct tca ttt gaa atg gaa atg tct cag act 1140
 A L E A T A D Q S A A S F E M E M S Q T 380

ggc ttc agt gct cat tat tca cag gac tgg gtc atg ctt gga gca gta gga gcc tat gat 1200
 G F S A H Y S Q D W V M L G A V G A Y D 400

tgg aat gga aca gtt gtc atg cag aag gct agt caa atc ata atc cct cga aac aca acc 1260
 W N G T V V M Q K A S Q I I I P R N T T 420

ttt aat gtt gag tct acc aaa aag aat gaa ccg ctt gct tct tat tta ggt tac act gta 1320
 F N V E S T K K N E P L A S Y L G Y T V 440

aac tct gct act gct tct tct gga gat gtg ctc tat att gct gga cag cct cgg tac aat 1380
 N S A T A S S G D V L Y I A G Q P R Y N 460

cat aca ggc cag gtc att atc tac agg atg gaa gat gga aac atc aaa att ctc cag acg 1440
 H T G Q V I I Y R M E D G N I K I L Q T 480

ctc agt gga gaa cag att ggt tcc tac ttt ggc agt att tta aca aca act gac att gac 1500
 L S G E Q I G S Y F G S I L T T T D I D 500

aag gat tct aat act gac att ctt cta gtc gga gcc cct atg tac atg gga aca gag aag 1560
 K D S N T D I L L V G A P M Y M G T E K 520

gag gag caa gga aaa gtg tat gtg tat gct ctc aat cag aca agg ttt gaa tat caa atg 1620
 E E Q G K V Y V Y A L N Q T R F E Y Q M 540

agc ctg gaa cct att aag cag acg tgc tgt tca tct cgg cag cac aat tca tgc aca aca 1680
 S L E P I K Q T C C S S R Q H N S C T T 560

gaa aac aaa aat gag cca tgc ggg gct cgt ttt gga act gca att gct gct gta aaa gac 1740
 E N K N E P C G A R F G T A I A A V K D 580

ctc aat ctt gat gga ttt aat gac atc gtg ata gga gct ccg ctg gaa gat gat cac ggg 1800
 L N L D G F N D I V I G A P L E D D H G 600

gga gct gtg tac att tat cat gga agt ggc aag act ata agg aaa gag tat gca caa cgt 1860
 G A V Y I Y H G S G K T I R K E Y A Q R 620

att cca tca ggt ggg gat ggt aag aca ctg aaa ttt ttt ggc cag tct atc cac gga gaa 1920
 I P S G G D G K T L K F F G Q S I H G E 640

FIG. 1C

| | |
|---|------|
| atg gat tta aat ggt gac ggt ctg aca gat gtg act att ggg ggc ctt ggt ggt gct gcc | 1980 |
| M D L N G D G L T D V T I G G L G G A A | 660 |
| ctc ttc tgg tcc cga gat ggc gcc gta gtt aaa gtg acc atg aat ttt gag cca aat aaa | 2040 |
| L F W S R D V A V V K V T M N F E P N K | 680 |
| gtg aat att caa aag aaa aac tgc cat atg gag gga aag gaa aca gta tgc ata aat gct | 2100 |
| V N I Q K K N C H M E G K E T V C I N A | 700 |
| aca gtg tgt ttt gat gtg aaa tta aag tct aaa gaa gac acg att tat gaa gct gat ttg | 2160 |
| T V C F D V K L K S K E D T I Y E A D L | 720 |
| cag tac cgt gtc acc cta gat tca cta aga caa ata tca cga agt ttt ttc tct gga act | 2220 |
| Q Y R V T L D S L R Q I S R S F F S G T | 740 |
| caa gag aga aag gtt caa agg aac atc aca gtt cga aaa tca gaa tgc act aag cac tcc | 2280 |
| Q E R K V Q R N I T V R K S E C T K H S | 760 |
| ttc tac atg ttg gac aag cat gac ttt cag gac tct gtg aga ata acg ttg gac ttt aat | 2340 |
| F Y M L D K E D F Q D S V R I T L D F N | 780 |
| ctt acc gat cca gaa aat ggg cct gtt ctt gat gat tct cta cca aac tca gta cat gaa | 2400 |
| L T D P E N G P V L D D S L P N S V H E | 800 |
| tat att ccc ttt gcc aaa gat tgt gga aat aag gaa aaa tgt atc tca gac ctc agc ctg | 2460 |
| Y I P F A K D C G N K E K C I S D L S L | 820 |
| cat gtc gcc acc act gaa aag gac ctg ctg att gtc cga tcc cag aat gat aag ttc aac | 2520 |
| H V A T T E K D L L I V R S Q N D K F N | 840 |
| gtt agc ctc aca gtc aaa aat aca aag gac agt gcc tat aac acc acg aca ata gtg cat | 2580 |
| V S L T V K N T K D S A Y N I R T I V H | 860 |
| tat tct cca aat cta gtt ttt tca gga att gag gct atc caa aaa gac agt tgt gaa tct | 2640 |
| Y S P N L V F S G I E A I Q K D S C E S | 880 |
| aat cat aat atc aca tgt aaa gtt gga tat ccc ttc ctg aga aga gga gag atg gta act | 2700 |
| N H N I T C K V G Y F F L R R G E M V T | 900 |
| ttc aaa ata ttg ttt cag ttt aac aca tcc tat ctc atg gaa aat gtg acc att tat tta | 2760 |
| F K I L F Q F N T S Y L M E N V T I Y L | 920 |
| agt gca aca agt gac agc gaa gaa cct cct gaa acc ctt tct gat aat gta gta aac att | 2820 |
| S A T S D S E E P P E T L S D N V V N I | 940 |
| tct atc ccg gta aaa tat gaa gtt gga cta cag ttt tac agc tct gca agt gaa tac cac | 2880 |
| S I P V K Y E V G L Q F Y S S A S E Y H | 960 |

FIG. 1D

| | |
|---|------|
| att tca att gct gcc aat gag aca gtc cct gaa gtt att aat tct act gag gac att gga | 2940 |
| I S I A A N E T V P E V I N S T E D I G | 980 |
| aat gaa att aat atc ttc tac ctg att aga aaa agt gga tct ttt cca atg cca gag ctt | 3000 |
| N E I N I F Y L I R K S G S F P M P E L | 1000 |
| aag ctg tca att tca ttc ccc aat atg aca tca aat ggt tac cct gtg ctg tac cca act | 3060 |
| K L S I S F P N M T S N G Y P V L Y P T | 1020 |
| gga ttg tca tct tct gag aat gca aac tgc aga ccc cat atc ttt gag gat cct ttc agt | 3120 |
| G L S S S E N A N C R P H I F E D P F S | 1040 |
| atc aac tct gga aag aaa atg act aca tca act gac cat ctc aaa cga ggc aca att ctg | 3180 |
| I N S G K K M T T S T D H L K R G T I L | 1060 |
| gac tgc aat aca tgt aaa ttt gct acc atc aca tgt aat ctc act tct tct gac atc agc | 3240 |
| D C N T C K F A T I T C N L T S S D I S | 1080 |
| caa gtc aat gtt tgg ctt atc ctg tgg aaa cca act ttt ata aaa tca tat ttt tcc agc | 3300 |
| Q V N V S L I L W K P T F I K S Y F S S | 1100 |
| tta aat ctt act ata agg gga gaa ctt cgg agt gaa aat gca tct ctg gtt tta agt agc | 3360 |
| L N L T I R G E L R S E N A S L V L S S | 1120 |
| agc aat caa aaa aga gag ctt gct att caa ata tcc aaa gat ggg cta ccg ggc aga gtg | 3420 |
| S N Q K R E L A I Q I S K D G L P G R V | 1140 |
| cca tta tgg gtc atc ctg ctg agt gct ttt gcc gga ttg ttg ctg tta atg ctg ctc att | 3480 |
| P L W V I L L S A F A G L L L L M L L I | 1160 |
| tta gca ctg tgg aag att gga ttc ttc aaa aga cca ctg aaa aag aaa atg gag aaa tga | 3540 |
| L A L W K I G F F K R P L K K K M E K * | 1180 |

Gln Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn His Met
Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Trp Thr
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

Id. de sec. n.° 4

FIG. 2A

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly His Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Lys
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
Arg Gly Phe Gly Asp Gly Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
Leu Val Thr Val Ser Ser

Id. de sec. n.° 5

FIG. 2B

Gln Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn His Met
 Phe Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
 Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Gly Asn Pro Trp Thr
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
 Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 Asn Arg Gly Glu Cys

Id. de sec. n.° 1

FIG. 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
 Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly His Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val Lys
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr
 Arg Gly Phe Gly Asp Gly Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
 Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
 Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
 Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
 Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
 Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
 Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
 His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

Id. de sec. n.º 2

FIG. 4

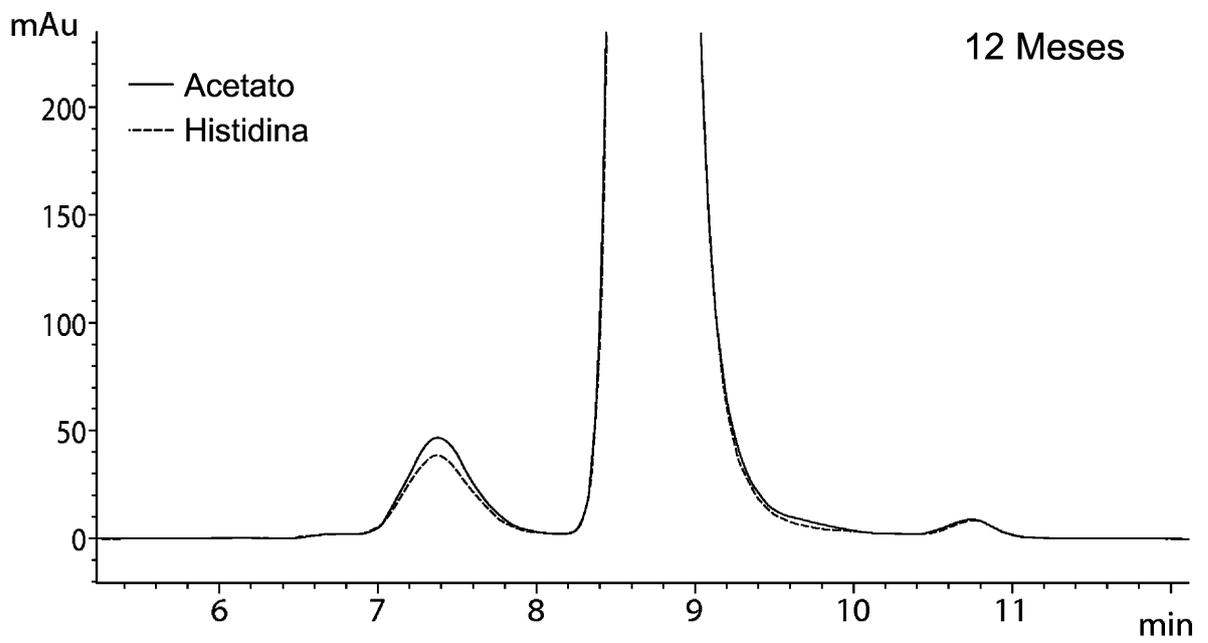
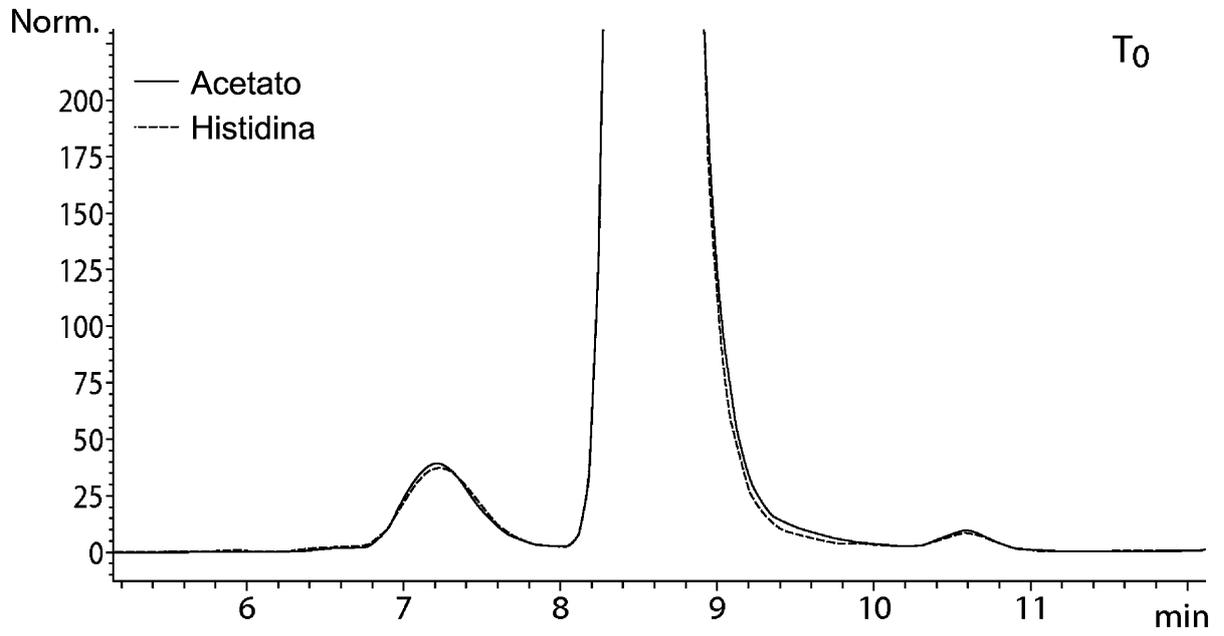


FIG. 5

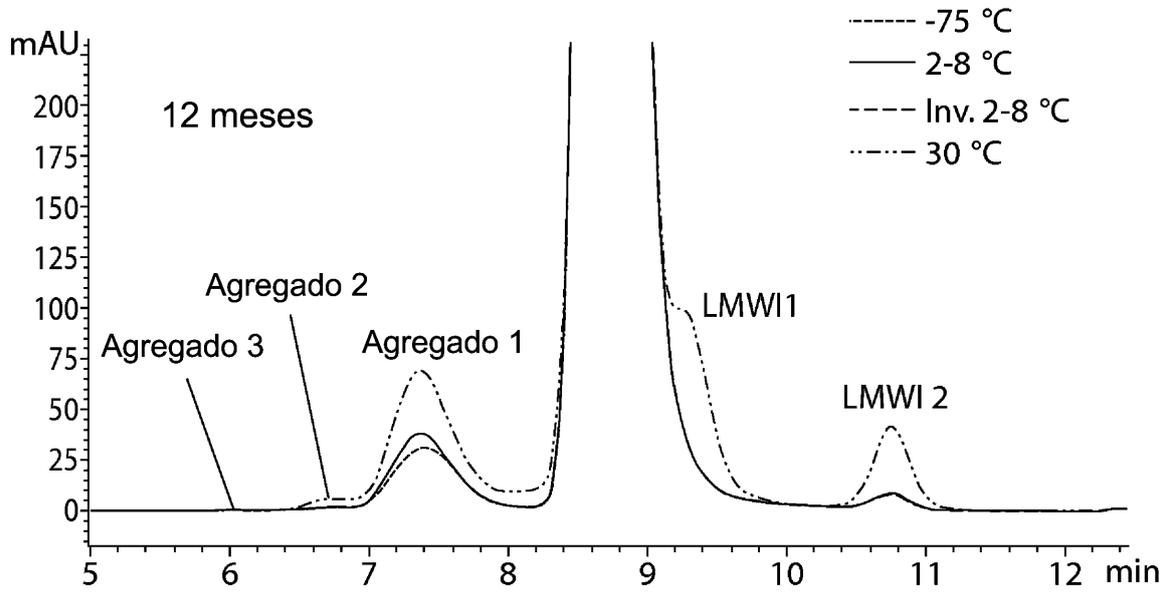
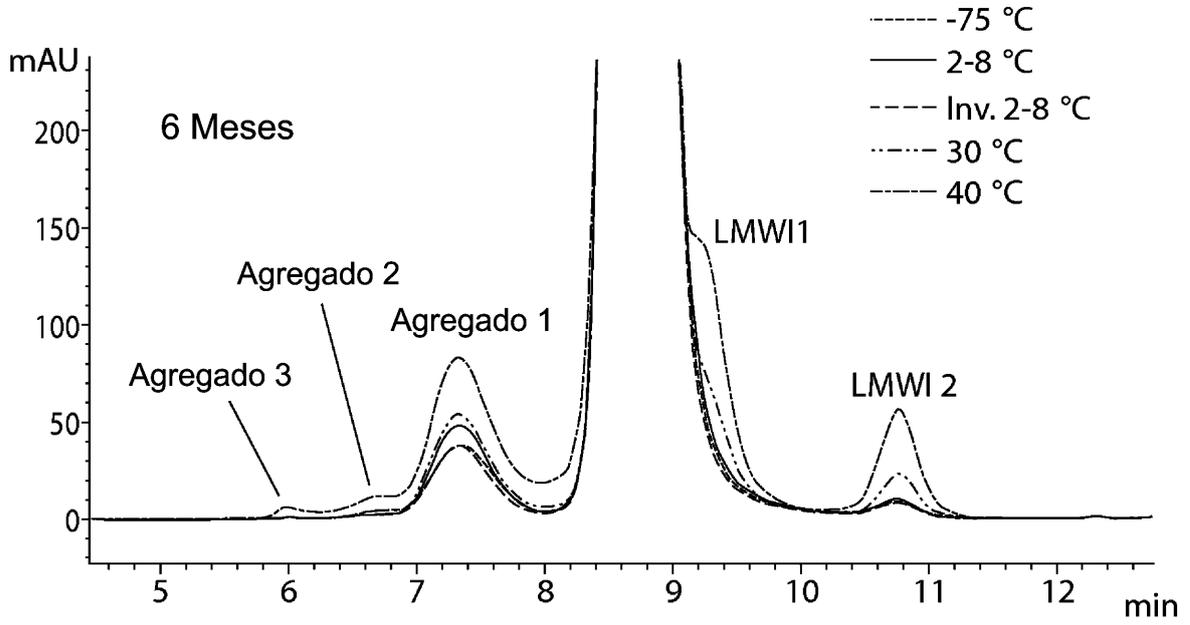


FIG. 6