

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 732 861**

51 Int. Cl.:

C07K 16/24 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2013 PCT/US2013/073825**

87 Fecha y número de publicación internacional: **19.06.2014 WO14093203**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2013 E 13863590 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2019 EP 2931313**

54 Título: **Formulaciones en solución de anticuerpos anti-IL-23p19 manipulados por ingeniería**

30 Prioridad:

13.12.2012 US 201261737035 P

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

26.11.2019

73 Titular/es:

**MERCK SHARP & DOHME CORP. (100.0%)
126 East Lincoln Avenue
Rahway, NJ 07065-0907, US**

72 Inventor/es:

**KASHI, RAMESH, S. y
BADKAR, ANIKET**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones:

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

ES 2 732 861 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulaciones en solución de anticuerpos anti-IL-23p19 manipulados por ingeniería.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere en general a formulaciones en solución de alta concentración de anticuerpos terapéuticos, y a su uso en el tratamiento de diversos trastornos.

10 Antecedentes de la invención

La interleuquina-23 (IL-23) es una citoquina heterodimérica compuesta por dos subunidades, p19 que es exclusiva de IL-23, y p40, que se comparte con la interleuquina-12 (IL-12). La subunidad p19 está relacionada estructuralmente con la IL-6, el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) y la subunidad p35 de la IL-12. IL-23 media la señalización mediante la unión a un receptor heterodimérico que comprende dos subunidades, IL-23R, única para el receptor de IL-23, e IL-12R β 1, que se comparte con el receptor de IL-12. Una serie de estudios iniciales demostró que las consecuencias de una deficiencia genética en p40 (ratón knock-out de p40; ratón p40KO) fueron más graves que las observadas con la deficiencia de p35, por ejemplo, en un ratón p35KO. Estos resultados se explicaron finalmente por el descubrimiento de IL-23 y la comprensión de que el p40KO evita la expresión no solo de IL-12, sino también de IL-23. Véase, por ejemplo, Oppmann et al. (2000) *Immunity* 13:715-725; Wiekowski et al. (2001) *J. Immunol.* 166: 7563-7570; Parham et al. (2002) *J. Immunol.* 168: 5699-708; Frucht (2002) *Sci STKE* 2002, E1-E3; Elkins et al. (2002) *Infection Immunity* 70: 1936-1948).

Estudios recientes, a través del uso de ratones p40 KO, han demostrado que el bloqueo tanto de IL-23 como de IL-12 es un tratamiento eficaz para varios trastornos inflamatorios y autoinmunes. Sin embargo, el bloqueo de IL-12 a través de p40 parece tener consecuencias sistémicas indeseables, como una mayor susceptibilidad a infecciones microbianas oportunistas o un mayor riesgo de tumores. Bowman et al. (2006) *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19: 245; Langowski et al. (2006) *Nature* 442:461. Por consiguiente, se prefiere el bloqueo específico de la subunidad p19 de IL-23 en el tratamiento de enfermedades humanas porque interfiere con la actividad inflamatoria patógena de IL-23 sin interferir con las actividades beneficiosas de IL-12, por ejemplo, en la lucha contra las infecciones y en la inmunovigilancia.

Los anticuerpos terapéuticos pueden usarse para bloquear la actividad de las citoquinas. Una limitación significativa en el uso de anticuerpos como agente terapéutico in vivo es la inmunogenicidad de los anticuerpos. Para anticuerpos monoclonales derivados de especies no humanas, el uso repetido en humanos da como resultado la generación de una respuesta inmune contra el anticuerpo terapéutico. Dicha respuesta inmune da como resultado una pérdida de eficacia terapéutica como mínimo, y potencialmente una respuesta anafiláctica fatal. Por consiguiente, los anticuerpos de inmunogenicidad reducida en seres humanos, tales como anticuerpos humanizados o completamente humanos, son preferidos para el tratamiento de sujetos humanos. Los anticuerpos terapéuticos de ejemplo para IL-23p19 se describen en la publicación de solicitud de patente U. S. N° 2007/0009526 y en las publicaciones de patentes internacionales Nros. WO 2007/076524, WO 2007/024846, WO 2007/147019 y WO 2009/043933. Se divulgan anticuerpos anti-IL-23p19 humanizados adicionales en solicitudes comúnmente asignadas publicadas como las publicaciones de patentes internacionales Nros. WO 2008/103432 y WO 2008/103473, y en la publicación de solicitud de patente U. S. N° 2007/0048315 comúnmente asignada.

Los fármacos de anticuerpos para uso en humanos pueden diferir algo en la secuencia de aminoácidos de sus dominios constantes, o en sus secuencias marco dentro de los dominios variables, pero típicamente difieren más dramáticamente en las secuencias de CDR. Incluso los anticuerpos que se unen a la misma proteína, el mismo polipéptido, o incluso potencialmente el mismo epítipo pueden comprender secuencias CDR completamente diferentes. Los anticuerpos terapéuticos para uso en seres humanos también se pueden obtener a partir de la secuencia de anticuerpos de la línea germinal humana o de secuencias de anticuerpos de la línea germinal no humana (por ejemplo, roedor), como en los anticuerpos humanizados, lo que conduce a una diversidad aún mayor en las posibles secuencias de CDR. Estas diferencias de secuencia dan como resultado distintas estabildades en la solución y diferente capacidad de respuesta a los parámetros de la solución. Además, los pequeños cambios en la disposición de los aminoácidos o los cambios en uno o unos pocos residuos de aminoácidos pueden dar como resultado una estabilidad y susceptibilidad de anticuerpos radicalmente diferentes a las vías de degradación específicas de la secuencia. Como consecuencia, en la actualidad no es posible predecir las condiciones de solución necesarias para optimizar la estabilidad del anticuerpo. Cada anticuerpo debe ser estudiado individualmente para determinar la formulación óptima de la solución. Bhambhani et al. (2012) *J. Pharm. Sci.* 101: 1120.

Los anticuerpos también son proteínas de peso molecular relativamente alto (~150.000 Da), por ejemplo, en comparación con otras proteínas terapéuticas como las hormonas y las citoquinas. Como consecuencia, frecuentemente es necesario dosificar con cantidades de peso relativamente altas de fármacos de anticuerpos para lograr las concentraciones molares deseadas de fármaco. Además, a menudo es deseable administrar fármacos de anticuerpos por vía subcutánea, ya que esto permite la autoadministración. La autoadministración evita el tiempo y los gastos asociados con las visitas a un centro médico para administración, por ejemplo, por vía intravenosa. La

administración subcutánea está limitada por el volumen de solución que puede administrarse prácticamente en el sitio de inyección en una sola inyección, que en general es de aproximadamente 1 a 1,5 ml. La autoadministración subcutánea se realiza típicamente utilizando una jeringa precargada o un autoinyector llenado con una formulación en solución líquida del fármaco, en lugar de una forma liofilizada, para evitar la necesidad de que el paciente vuelva a suspender el fármaco antes de la inyección. Para el suministro de dosis más altas de fármaco, esta limitación de volumen otorga una importancia superior al desarrollo de formulaciones en solución de alta concentración. Sin embargo, tales concentraciones elevadas de anticuerpos exhiben efectos de apiñamiento macromolecular y mayores interacciones de proteína-proteína, lo que da como resultado inestabilidades físicas como opalescencia, autoasociación, agregación, despliegue y separación de fases. Estas soluciones de anticuerpos de alta concentración también pueden exhibir una alta viscosidad (por ejemplo, >10 centipoises), lo que reduce la capacidad de jeringa en jeringas precargadas y dispositivos de autoinyección. Los fármacos de anticuerpos deben ser estables durante el almacenamiento para garantizar una eficacia y una dosificación coherente, por lo que es fundamental que cualquiera que sea la formulación elegida respalde las propiedades deseables, tales como alta concentración, claridad y viscosidad aceptable, y eso también mantiene estas propiedades y la eficacia del fármaco durante una vida útil aceptablemente prolongada en condiciones de almacenamiento típicas.

Como consecuencia, existe la necesidad de formulaciones en solución estables y de alta concentración de anticuerpos terapéuticos, como los anticuerpos que se unen a la IL-23p19 humana. Dichas formulaciones en solución estable exhibirán preferiblemente estabilidad durante meses a años en condiciones típicas para el almacenamiento de fármacos para autoadministración, es decir, a temperatura de refrigerador en una jeringa, dando como resultado una larga vida útil para el producto farmacológico correspondiente. Estas formulaciones en solución estables y de alta concentración permitirían el empaquetamiento del fármaco de anticuerpo para una inyección subcutánea de alta concentración mediante autoadministración.

Las formulaciones de anticuerpos terapéuticos que comprenden regulador de histidina a pH 6, polisorbato 80 y sacarosa se describen en los documentos WO 2008/157409, WO 2012/135408 y Nicholas Warne ED-Lehr Claus-Michael et al. (European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, Vol. 78, No. 2, 208-212). Las formulaciones liofilizadas de anticuerpos anti-IL-23p19 se describen en el documento US 2011/0229490.

Sumario de la invención

La presente invención proporciona formulaciones en solución de alta concentración de anticuerpo anti-IL-23p19 humanizado 13B8-b ("hum13B8-b"). El anticuerpo hum13B8-b comprende dos cadenas livianas idénticas a la secuencia de la SEQ ID NO: 2 y dos cadenas pesadas idénticas a la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

En una realización, la formulación en solución comprende a) al menos 50 mg/ml de anticuerpo hum13B8-b anti-IL-23p19; b) regulador de histidina 10 mM, pH 6,0; c) 0,05% de polisorbato 80; y d) 7% de sacarosa, en donde dicho anticuerpo hum13B8-b comprende:

i) un polipéptido de cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2; y

ii) un polipéptido de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1.

En diversas realizaciones, las formulaciones en solución de la presente invención comprenden al menos 50, 80, 90, 100, 110 o 120 mg/ml de anticuerpo hum13B8-b. En otras realizaciones, las formulaciones en solución de la presente invención comprenden aproximadamente 80-120 mg/ml de anticuerpo hum13B8-b, 80-120 mg/ml de anticuerpo hum13B8-b, aproximadamente 100 mg/ml de anticuerpo hum13B8-b y 100 mg/ml de anticuerpo hum13B8-b.

En otro aspecto, la invención se refiere a las formulaciones en solución de alta concentración del anticuerpo hum13B8-b anti-IL-23p19 de la presente invención para usar en el tratamiento de trastornos que incluyen, pero no se limitan a enfermedad inflamatoria, enfermedad autoinmune, trastornos proliferativos, cáncer, enfermedades infecciosas (por ejemplo, infección bacteriana, micobacteriana, viral o fúngica, incluyendo infecciones crónicas), artritis, psoriasis, artritis psoriásica, entesitis, espondilitis anquilosante, enfermedad inflamatoria del intestino, incluyendo enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa, esclerosis múltiple, uveítis, enfermedad de injerto contra huésped, lupus eritematoso sistémico y diabetes. En otro aspecto más, la invención se refiere al uso de formulaciones en solución de alta concentración de anticuerpo hum13B8-b anti-IL-23p19 en la fabricación de un medicamento para uso en el tratamiento de estos mismos trastornos.

Breve descripción de los dibujos

FIG. 1 muestra los datos utilizados para determinar el regulador y las condiciones de pH óptimos para formulaciones que comprenden hum13B8-b. FIG. 1A muestra la temperatura de despliegue, según lo determinado por calorimetría diferencial de barrido (DSC), y el porcentaje de pureza, medido por RP-HPLC, para diversas formulaciones de anticuerpos de 1 mg/ml, y la FIG. 1B muestra el porcentaje de monómero y el porcentaje de picos de elución tardía, medido por HP-SEC, en función del pH para varios reguladores diferentes (acetato, citrato, fosfato y Tris). Se

proporcionan breves análisis de DSC y HP-SEC en los Ejemplos 2 y 3, respectivamente.

FIGS. 1C-1E muestran diversas propiedades de las formulaciones de citrato 10 mM en función del pH, incluida la opalescencia (OD_{350}), la distribución del tamaño hidrodinámico (nm), medida por la dispersión dinámica de la luz (DLS) y la temperatura de fusión, según lo determinado por DSC, respectivamente. Se proporcionan breves análisis sobre DLS y DSC en los Ejemplos 4 y 2, respectivamente.

FIGS. 1F y 1G muestran el porcentaje de picos de elución tardía y el porcentaje del pico principal, respectivamente, a lo largo del tiempo, según lo determinado por la cromatografía de intercambio iónico de alto rendimiento (HP-IEX). Se proporciona un breve análisis de HP-IEX en el Ejemplo 5.

FIGS. 1H y 1I muestran opalescencia (OD_{350}) y tamaño hidrodinámico (nm), medido por dispersión de luz dinámica (DLS), respectivamente, para formulaciones de anticuerpos de baja concentración (1 mg/ml) en varios reguladores a diferentes pH, mientras que la FIG. 1J muestra la distribución del tamaño hidrodinámico (nm) para formulaciones de anticuerpos más concentradas (50 y 100 mg/ml), según lo determinado por DLS. Se proporciona un breve análisis de DLS en el Ejemplo 4.

FIG. 1K muestra el porcentaje de picos de elución tardía en diversos reguladores a diferentes pH a lo largo del tiempo, según lo determinado por HP-SEC. Se proporciona un breve análisis de HP-SEC en el Ejemplo 3.

FIGS. 2A y 2B muestran la temperatura de despliegue, según lo determinado por DSC, y los cambios en la opalescencia, respectivamente, para formulaciones de hum13B8-b que contienen diversos excipientes (NaCl 100 mM, 7% de sacarosa, 7% de trehalosa y 6% de manitol). DS se refiere a la sustancia farmacológica. Se proporciona un breve análisis de DSC en el Ejemplo 2.

FIGS. 3A y 3B muestran el porcentaje de anticuerpos y el porcentaje de picos de elución temprana, según lo determinado por HP-SEC, respectivamente, y la FIG. 3C muestra opalescencia, antes y después de cinco días de agitación, en función de la presencia o ausencia de tensioactivo (0,05% de polisorbato 20, 0,05% de polisorbato 80 o Pluronic F-68). El valor de 5 días de agitación para la muestra sin tensioactivo (NS) es en realidad superior a 3 y, por lo tanto, bien fuera de escala. Se proporciona un breve análisis de HP-SEC en el Ejemplo 3.

La FIG. 4 muestra la estabilidad de las formulaciones de anticuerpo de acetato e histidina, que comprenden 10 mM de regulador, 7% de sacarosa y 0,05% de polisorbato 80, cuando se almacenan en diversas condiciones. Las muestras se almacenaron como muestras de 1,5 ml en viales de vidrio de 2,0 ml. FIG. 4A muestra la estabilidad de 50 y 100 mg/ml de preparaciones de anticuerpos, como se refleja en el porcentaje de anticuerpos monoméricos medidos por HP-SEC, cuando se almacenan a 5°C (humedad relativa ambiente) o en condiciones de RH4 (40°C, 75% de humedad relativa). Se proporciona un breve análisis de HP-SEC en el Ejemplo 3.

FIGS. 4B-4D son gráficos del porcentaje de monómero, especies de HMW y de LMW, respectivamente, según lo determinado por HP-SEC, en una variedad de condiciones de almacenamiento "25H" se refiere al almacenamiento a 25°C, 60% de humedad relativa. Tener en cuenta que las ordenadas (ejes de tiempo) de las Figs. 4B-4D no son lineales. Se proporciona un breve análisis de HP-SEC en el Ejemplo 3.

Las figuras 4E y 4F son gráficos de los resultados de los experimentos HP-IEX que monitorean la estabilidad de los anticuerpos al medir los porcentajes del pico principal y las variantes ácidas, respectivamente. Se proporciona un breve análisis de HP-IEX en el Ejemplo 5.

FIGS. 4G-4I son gráficos de opalescencia después del almacenamiento a 5°C, 25°C (25H) y 40°C (RH4), respectivamente. FIGS. 4J y 4K muestran la oxidación, medida por el mapeo de péptidos, después del almacenamiento en RH4 (40°C, 75% de humedad relativa) y 5°C, y a 40°C y 5°C, respectivamente. Un breve análisis del mapeo de péptidos se proporciona en el Ejemplo 6.

FIGS. 4L y 4M son gráficos de despliegue de experimentos de DSC en formulaciones de acetato e histidina, respectivamente, para muestras iniciales y muestras almacenadas durante 4,5 meses a 5°C o condiciones RH4. Se proporciona un breve análisis de DSC en el Ejemplo 2.

Las estabilidades de las formulaciones de acetato 10 mM y de histidina 10 mM se midieron como porcentaje de monómero y como porcentaje de especies de alto peso molecular, según lo medido por HP-SEC. La estabilidad se midió para muestras almacenadas a 5°C ($\pm 3^\circ\text{C}$), 25H (25°C, 60% de humedad relativa) o RH4 (40°C, 75% de humedad relativa). Los resultados se presentan en las Figs. 4A y 4B. Se proporciona un breve análisis de HP-SEC en el Ejemplo 3.

FIG. 5 presenta datos de estabilidad para las formulaciones de anticuerpos de la presente invención cuando se almacenan como sustancias farmacológicas en bolsas de Celsius® Pak de la capa de contacto con fluido de 30 ml de acetato de etileno-acetato de vinilo (EVA). Los datos se presentan para formulaciones que comprenden regulador de histidina 10 mM (pH 6,0), sacarosa al 7%, polisorbato 80 al 0,05% y anticuerpo hum13B8-b. FIGS. 5A-5C son

gráficos de la concentración de proteína, potencia biológica (medida por un ensayo funcional a base de células) y potencia biológica (según se mide por ELISA), respectivamente, para tres preparaciones diferentes de hum13B8-b (lotes A, B y C). Se proporcionan breves análisis sobre la determinación de la concentración de proteínas, los ensayos funcionales a base de células y ELISA en los Ejemplos 7, 8 y 9, respectivamente.

5 FIGS. 5D-5G son gráficos de los resultados de los experimentos HP-IEX que monitorean la estabilidad de los anticuerpos midiendo los porcentajes de variantes ácidas, pico principal, especies del pico posterior principal y variantes básicas, respectivamente. Se proporciona un breve análisis de HP-IEX en el Ejemplo 5.

10 FIG. 5H muestra el porcentaje de monómero, medido por HP-SEC. Se proporciona un breve análisis de HP-SEC en el Ejemplo 3. Las FIGS. 5I y 5J muestran la pureza midiendo el porcentaje de pico principal mediante CE-SDS no reductora, o el porcentaje de cadenas pesadas y livianas por CE-SDS reductora, respectivamente. Se proporciona un breve análisis de CE-SDS en el Ejemplo 10.

15 FIGS. 5K y 5L muestran el porcentaje de especies de HMW y LMW, respectivamente, según lo medido por HP-SEC. Se proporciona un breve análisis de HP-SEC en el Ejemplo 3.

FIG. 6 presenta datos de estabilidad adicionales para las formulaciones de anticuerpos de la presente invención (lotes de anticuerpos A y B) cuando se almacenan como sustancias farmacológicas en bolsas de Celsius® Pak de la capa de contacto de fluido de 30 ml de etileno-acetato de vinilo (EVA). Los datos se presentan para formulaciones que comprenden regulador de histidina 10 mM (pH 6,0), sacarosa al 7%, polisorbato 80 al 0,05% y anticuerpo hum13B8-b. FIGS. 6A y 6B son gráficos de potencia biológica según se midió mediante ELISA y según se midió mediante un ensayo funcional a base de células, respectivamente. Se proporcionan breves análisis sobre ELISA y los ensayos funcionales a base de células en los Ejemplos 9 y 8, respectivamente.

20 FIGS. 6C-6E son gráficos del porcentaje de monómero, especies de HMW y LMW, respectivamente, según lo determinado por HP-SEC, en una variedad de condiciones de almacenamiento. Se proporciona un breve análisis de HP-SEC en el Ejemplo 3.

30 FIGS. 6F y 6G muestran la pureza al medir el porcentaje de pico principal mediante CE-SDS no reductora, o el porcentaje de cadenas pesadas y livianas por CE-SDS reductora, respectivamente. Se proporciona un breve análisis de CE-SDS en el Ejemplo 10.

35 FIGS. 6H-6K son gráficos de los resultados de los experimentos de HP-IEX que monitorean la estabilidad de los anticuerpos midiendo porcentajes de variantes ácidas, pico principal, especies del pico posterior principal y variantes básicas, respectivamente. Un breve análisis de HP-IEX se proporciona en el Ejemplo 5.

FIG. 7 presenta datos de estabilidad para las formulaciones de anticuerpos de la presente invención cuando se almacenan a 5°C (3°C) como producto farmacológico en dosis unitarias en jeringas precargadas, a 100 mg/ml de concentración de anticuerpo y 1,0 ml de volumen de llenado. FIG. 7A es un gráfico de la concentración de proteínas para cuatro preparaciones diferentes de hum13B8-b (lotes D, E, F, G y H) según lo determinado por la absorción UV. Se proporciona un breve análisis de las determinaciones de la concentración de proteínas en el Ejemplo 7.

45 FIGS. 7B y 7C son gráficos de la potencia biológica medida por un ensayo funcional a base de células y medida por ELISA, respectivamente, para cuatro preparaciones diferentes de hum13B8-b (lotes E, F, G y H). Se proporcionan breves análisis sobre los ensayos funcionales a base de células y ELISA en los Ejemplos 8 y 9, respectivamente.

FIGS. 7D-7F son gráficos del porcentaje de especies de HMW, monómeros y especies de LMW, respectivamente, según lo determinado por HP-SEC. Se proporciona un breve análisis de HP-SEC en el Ejemplo 3.

50 FIGS. 7G-7J son gráficos de los resultados de los experimentos de HP-IEX que monitorean la estabilidad de los anticuerpos al medir los porcentajes del pico principal, las variantes ácidas, las variantes básicas y las especies del pico posterior principal, respectivamente. Se proporciona un breve análisis de HP-IEX en el Ejemplo 5.

55 FIGS. 7K y 7L muestran la pureza al medir el porcentaje de pico principal mediante CE-SDS no reductora, o el porcentaje de cadenas pesadas y livianas por CE-SDS reductora, respectivamente. Se proporciona un breve análisis de CE-SDS en el Ejemplo 10.

Descripción detallada

60 Tal como se usa en el presente documento, incluidas las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de palabras como "un", "una", "el" y "ella" incluyen sus correspondientes referencias en plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario. La Tabla 10 a continuación proporciona una lista de los identificadores de secuencia utilizados en esta solicitud. A menos que se indique lo contrario, las proteínas y sujetos referidos aquí son proteínas humanas y sujetos humanos más que otras especies. Como se usa en el presente documento, la "FIG. X" se refiere colectivamente a todas las FIGS. XA-XZ individuales.

I. Definiciones

5 “Actividad proliferativa” abarca una actividad que promueve, que es necesaria o que está específicamente asociada, por ejemplo, con la división celular normal, así como el cáncer, tumores, displasia, transformación celular, metástasis y angiogénesis.

10 Como se usa en el presente documento, la expresión “región hipervariable” se refiere a los residuos de aminoácidos de un anticuerpo que son responsables de la unión del antígeno. La región hipervariable comprende residuos de aminoácidos de una “región que determina la complementariedad” o “CDR” (por ejemplo, residuos 24-34 (CDRL1), 50-56 (CDRL2) y 89-97 (CDRL3) en el dominio variable de la cadena liviana y residuos 31-35 (CDRH1), 50-65 (CDRH2) y 95-102 (CDRH3) en el dominio variable de la cadena pesada (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.) y/o aquellos
15 residuos de un “bucle hipervariable” (es decir, residuos 26-32 (L1), 50-52 (L2) y 91-96 (L3) en el dominio variable de la cadena liviana y 26-32 (H1), 53-55 (H2) y 96-101 (H3) en el dominio variable de la cadena pesada (Chothia y Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196: 901-917). Tal como se usa en el presente documento, el término “marco” o “FR” se refiere a aquellos residuos de dominio variable distintos de los residuos de la región hipervariable definidos aquí como residuos de CDR. La numeración de residuos anterior se refiere al sistema de numeración de Kabat y no se
20 corresponde necesariamente en detalle a la numeración de la secuencia en el listado de secuencias adjunto.

La “condición inmune” o “trastorno inmune” abarca, por ejemplo, inflamación patológica, un trastorno inflamatorio y un trastorno o enfermedad autoinmune. “Condición inmune” también se refiere a infecciones, infecciones persistentes y condiciones proliferativas, como cáncer, tumores y angiogénesis, incluidas infecciones, tumores y
25 cánceres que resisten la erradicación del sistema inmunitario. “Condición cancerosa” incluye, por ejemplo, cáncer, células cancerosas, tumores, angiogénesis y condiciones precancerosas como la displasia.

“Trastorno inflamatorio” significa un trastorno o condición patológica donde la patología resulta, en todo o en parte, de, por ejemplo, un cambio en el número, un cambio en la tasa de migración o un cambio en la activación de las células del sistema inmune. Las células del sistema inmune incluyen, por ejemplo, células T, células B, monocitos o macrófagos, células presentadoras de antígenos (APC), células dendríticas, microglia, células NK, células NKT, neutrófilos, eosinófilos, mastocitos o cualquier otra célula específicamente asociada con la inmunología, por ejemplo, células epiteliales o endoteliales productoras de citoquinas.

35 Como se usa en este documento, las concentraciones deben interpretarse como aproximadas dentro de los intervalos normalmente asociados con tales concentraciones en la preparación de formulaciones farmacéuticas. Específicamente, las concentraciones no necesitan ser exactas, pero pueden diferir de las concentraciones indicadas dentro de las tolerancias típicamente esperadas para los medicamentos fabricados en condiciones GMP. De manera similar, los valores de pH son aproximados dentro de las tolerancias típicamente esperadas para los medicamentos preparados en condiciones GMP y almacenados en condiciones típicas de almacenamiento. Por
40 ejemplo, se hace referencia a las formulaciones de histidina de la presente invención que tienen un pH de 6,0, pero la tolerancia típica es de pH 6,0 (\pm 0,3). A menos que se indique lo contrario, las concentraciones porcentuales son concentraciones de peso/peso.

II. Formulaciones de anticuerpos en solución de alta concentración

45 Los anticuerpos monoclonales terapéuticos típicos comprenden cuatro polipéptidos: dos cadenas livianas (por ejemplo, 214 aminoácidos de longitud) y dos cadenas pesadas (por ejemplo, 446 aminoácidos de longitud). Cada cadena está compuesta, a su vez, de un dominio variable y un dominio constante. Los dominios variables para anti-IL-23p19 hum13B8-b son 108 y 116 aminoácidos para las cadenas livianas y pesadas, respectivamente, y los dominios constantes son 106 y 330 aminoácidos. La especificidad de un anticuerpo para su objetivo está
50 determinada en gran medida por las secuencias que se encuentran dentro de las denominadas regiones “hipervariables” o “determinantes de complementariedad” (CDR), tres de las cuales se encuentran en los dominios variables de cada una de las cadenas pesadas y cadenas livianas. Las CDR pueden variar en longitud entre los diferentes anticuerpos, pero en hum13B8-b, las CDR comprenden 44 aminoácidos en cadenas pesadas y 27 aminoácidos en la cadena liviana. Los residuos de CDR son altamente variables entre diferentes anticuerpos, y pueden originarse a partir de secuencias de la línea germinal humana (en el caso de anticuerpos completamente humanos), o de secuencias de la línea germinal no humanas (por ejemplo, roedores). Las regiones marco también pueden diferir significativamente de anticuerpo a anticuerpo. Las regiones constantes diferirán dependiendo de si el anticuerpo seleccionado tiene una cadena liviana lambda (λ) o kappa (κ), y dependiendo de la clase (o isotipo) del anticuerpo (IgA, IgD, IgE, IgG o IgM) y subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). La suma total es una molécula de anticuerpo de aproximadamente 150.000 Da, compuesta de aproximadamente 650 aminoácidos, de los cuales 224 están en dominios variables, incluyendo 71 aminoácidos en regiones “hipervariables”, con dominios constantes que varían en clase, subclase y dominios constantes de cadena liviana.

65 El anticuerpo de la presente invención (anti-IL-23p19 mAb hum13B8-b) también difiere de muchos anticuerpos terapéuticos desarrollados recientemente en que está humanizado, en lugar de ser completamente humano. Como

5 resultado, las secuencias de CDR se derivan de secuencias de línea germinal no humanas (en este caso de ratón), en lugar de secuencias de línea germinal humana. Las secuencias de la línea germinal comprenden el repertorio de secuencias a partir del cual se derivan las secuencias de CDR de un anticuerpo, además de los cambios derivados de la hipermutación somática, y como consecuencia, se esperaría que las CDR obtenidas a partir de una línea
 10 germinal de ratón difieran sistemáticamente de las que parten de una línea germinal humana. De hecho, esta es la base para el uso de diferentes sistemas inmunes de especies para generar anticuerpos, ya que el uso de diferentes especies aumenta la diversidad potencial en las secuencias de CDR resultantes. El uso de secuencias de línea germinal humana a menudo se justifica sobre la base de que las secuencias de CDR de las líneas germinales humanas serán menos inmunogénicas en los humanos que las derivadas de otras especies, lo que refleja la
 15 creencia subyacente de que las CDR diferirán sistemáticamente dependiendo de su especie de origen. Aunque el aumento en la diversidad de CDR aumenta la probabilidad de encontrar anticuerpos con propiedades deseadas, tales como alta afinidad, aumenta aún más las dificultades para desarrollar una formulación en solución estable del anticuerpo resultante.

20 Incluso los anticuerpos que se unen al mismo antígeno pueden diferir dramáticamente en secuencia, y no es necesario que estén más estrechamente relacionados en secuencia que los anticuerpos a antígenos completamente separados. Por ejemplo, los dominios variables del anticuerpo de la presente invención (hum13B8-b) comparten solo aproximadamente un 50 a un 60% de identidad de secuencia con otro anticuerpo específico anti-IL-23p19 CNTO 1959 (SEQ ID NO: 116 y 106 de la patente U. S. N° 7.993.645). CNTO 1959 es un anticuerpo completamente humano. Sobre la base de la baja similitud de secuencia, las propiedades químicas de los anticuerpos y, por lo tanto, su susceptibilidad a la degradación, no se pueden presumir similares a pesar de su objetivo compartido.

25 Como se demostró anteriormente, los anticuerpos son complejos polipeptídicos grandes y altamente complejos sujetos a diversas formas de degradación e inestabilidad en solución. La diversidad de secuencias y, por lo tanto, la estructura de anticuerpos da lugar a una amplia gama de propiedades químicas. Aparte de las obvias diferencias específicas de secuencia en la especificidad de unión al antígeno, los anticuerpos exhiben una susceptibilidad variable a diversas vías degradantes, agregación y precipitación. Las cadenas laterales de aminoácidos difieren en la presencia o ausencia de grupos reactivos, tales como grupos carboxi (D, E), amino (K), amida (N, Q), hidroxilo (S, T, Y), sulfhidrilo (C), tioéter (M), así como sitios reactivos químicamente en forma potencial en los residuos de
 30 histidina, fenilalanina y prolina. Las cadenas laterales de aminoácidos directamente involucradas en las interacciones de unión al antígeno son candidatos obvios para la inactivación por modificación de la cadena lateral, pero la degradación en otras posiciones también puede afectar a factores tales como la orientación estérica de las CDR (por ejemplo, cambios en los residuos del marco), función efectora (por ejemplo, cambios en la región Fc: ver, por ejemplo, Liu et al. (2008) *Biochemistry* 47:5088), o autoasociación/agregación.

35 Los anticuerpos están sujetos a cualquier número de vías de degradación potencial. La oxidación de los residuos de metionina en los anticuerpos, particularmente en las CDR, puede ser un problema si interrumpe la unión del antígeno. Presta (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.* 116:731; Lam et al. (1997) *J. Pharm. Sci.* 86: 1250. Otras vías de degradación potenciales incluyen la desamidación de asparagina (Harris et al. (2001) *Chromatogr., B* 752:233; Vlasak et al. (2009) *Anal. Biochem.* 392: 145), oxidación de triptófano (Wei et al. (2007) *Anal. Chem.* 79:2797), cisteinilación (Banks et al. (2008) *J. Pharm. Sci.* 97:775), glicación (Brady et al. (2007) *Anal. Chem.* 79:9403), formación de piroglutamato (Yu et al. (2006) *J. Pharm. Biomed. Anal.* 42:455), barajado de disulfuro (Liu et al. (2008) *J. Biol. Chem.* 283:29266) e hidrólisis (Davagnino et al. (1995) *J. Immunol. Methods* 185:177). Analizado en Ionescu & Vlasak (2010) *Anal. Chem.* 82:3198. Véase también Liu et al. (2008) *J. Pharm. Sci.* 97: 2426. Algunas vías de
 45 degradación potenciales dependen no solo de la presencia de un residuo de aminoácido específico, sino también de la secuencia circundante. La desamidación y la formación de isoaspartato pueden surgir de una reorganización intramolecular espontánea del enlace peptídico que sigue a los residuos N o D (C-terminal), con las secuencias N-G y D-G que son particularmente susceptibles. Reissner & Aswad (2003) *CMLS. Mol. Vida sci.* 60:1281.

50 Los anticuerpos también están sujetos a fragmentación no enzimática dependiente de la secuencia durante el almacenamiento. Vlasak & Ionescu (2011) *mAbs* 3:253. La presencia de cadenas laterales reactivas, como D, G, S, T, C o N puede dar lugar a reacciones de escisión intramolecular que cortan el esqueleto del polipéptido. Dichas reacciones de hidrólisis específicas de secuencia suelen depender críticamente del pH. Id. Los anticuerpos también pueden sufrir agregación dependiente de la secuencia, por ejemplo, cuando las CDR incluyen un alto número de
 55 residuos hidrófobos. Perchiacca et al. (2012) *Prot. Ing. Des. Selection* 25:591. La agregación es particularmente problemática para los anticuerpos que necesitan formularse en altas concentraciones para la administración subcutánea, e incluso ha llevado a algunos a modificar la secuencia de anticuerpos agregando residuos cargados para aumentar la solubilidad. *Id.*

60 Reflejando la diversidad de potenciales problemas de estabilidad específicos de secuencia con anticuerpos, las formulaciones potenciales de anticuerpos también son diversas. Una serie de variables diferentes deben optimizarse a medida para cada nuevo anticuerpo. Las formulaciones pueden variar, por ejemplo, en concentración de anticuerpos, regulador, pH, presencia o ausencia de tensioactivo, presencia o ausencia de agentes de tonicidad (iónicos o no iónicos), presencia de ausencia de agente de aglomeración molecular. Los anticuerpos terapéuticos
 65 disponibles comercialmente se comercializan en una amplia gama de formulaciones en solución, en regulador fosfato (por ejemplo, adalimumab), regulador fosfato/glicina (por ejemplo, basilixumab), regulador Tris (por ejemplo,

5 ipilimumab), histidina (por ejemplo, ustekinumab), citrato de sodio (por ejemplo, rituximab); y desde pH 4,7 (por ejemplo, certolizumab) y pH 5,2 (por ejemplo, adalimumab) hasta pH 7,0-7,4 (por ejemplo, cetuximab). También están disponibles en formulaciones que contienen opcionalmente edetato de disodio (por ejemplo, alemtuzumab), manitol (por ejemplo, ipilimumab), sorbitol (por ejemplo, golimumab), sacarosa (por ejemplo, ustekinumab), cloruro de sodio (por ejemplo, rituximab), cloruro de potasio (por ejemplo, alemzumzabab) y trehalosa (por ejemplo, ranibizumab); todos con y sin polisorbato 80, que van desde el 0,001% (por ejemplo, abcixmab) hasta el 0,1% (por ejemplo, adalimumab).

10 Las formulaciones de anticuerpos de ejemplo se encuentran en las patentes U. Ss. Nros. 7.691.379 (mAb anti-IL-9 MEDI-528); 7.592.004 (receptor anti-IL-2, daclizumab); 7.705.132 (anti-EGFR, panitumumab); y 7.635.473 (anti-Ap; bapineuzumab). Se encuentran formulaciones de anticuerpos adicionales a modo de ejemplo en las publicaciones de solicitudes de patente U. S. Nros. 2010/00021461 (anti-a4-integrina, natalizumab); 2009/0181027 (anti-IL-12/IL-23, ustekinumab); 2009/0162352 (anti-CD20, ritumixmab); 2009/0060906 (anti-IL-13); 2008/0286270 (anti-RSV, palivizumab); y 2006/0088523 (anti-Her2, pertuzumab). Sin embargo, se describen formulaciones adicionales en Daugherty & Mrsyn (2006) Adv. Drugs Deliv. Rev. 58: 686; Wang et al. (2007) J. Pharm. Sci. 96: 1; y Lam et al. (1997) J. Pharm. Sci. 86:1250.

20 La variabilidad de la secuencia, que es la base de la especificidad de los anticuerpos, está en el corazón de la respuesta inmune. Esta variabilidad conduce a la heterogeneidad química de los anticuerpos resultantes, lo que resulta en una amplia gama de vías de degradación potencial. La amplia gama de formulaciones de anticuerpos desarrolladas hasta la fecha atestigua el hecho de que las formulaciones deben optimizarse individualmente para cada anticuerpo específico para asegurar una estabilidad óptima. De hecho, todos y cada uno de los anticuerpos terapéuticos comerciales aprobados para su uso en humanos hasta ahora han tenido una formulación única y distinta.

25 III. Actividad biológica del anti-IL-23 humanizado

30 Las formulaciones en solución de mAb anti-IL-23p19 hum13B8-b de la presente invención se usarán en el tratamiento de trastornos en los que se espera que sea beneficioso el antagonismo selectivo de la señalización de IL-23. Las enfermedades inflamatorias de la piel, las articulaciones, el SNC y los trastornos proliferativos provocan respuestas inmunes similares, por lo que el bloqueo de la IL-23 debería proporcionar una inhibición de estos trastornos inflamatorios mediados por el sistema inmune, sin comprender la capacidad del huésped para combatir las infecciones sistémicas. La IL-23 antagonista debe aliviar la inflamación asociada con la enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, artritis reumatoide, artritis psoriásica, psoriasis, espondilitis anquilosante, enfermedad de injerto versus huésped, dermatitis atópica y otros trastornos autoinmunes e inflamatorios. El uso de inhibidores de IL-23 también proporcionará inhibición de trastornos proliferativos, por ejemplo, cáncer y trastornos autoinmunes, por ejemplo, esclerosis múltiple, diabetes de tipo I y SLE. Las descripciones de IL-23 en estos diversos trastornos se pueden encontrar en las siguientes solicitudes PCT publicadas: WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631 y WO 01/18051. Los inhibidores de la IL-23 también pueden ser útiles en el tratamiento de infecciones, incluidas las infecciones crónicas, como las infecciones bacterianas, micobacterianas, virales y micóticas. Véase la patente U. S. N° 8.263.080 y la publicación de solicitud internacional WO 2008/153610.

45 Las formulaciones en solución de alta concentración de la presente invención incluyen anticuerpos que conservan la actividad biológica cuando se almacenan durante largos períodos de tiempo. Tal como se usa en el presente documento, la expresión "biológicamente activo" se refiere a un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que es capaz de unirse al epítipo antigénico deseado y ejercer un efecto biológico directa o indirectamente. Típicamente, estos efectos resultan del fracaso de la IL-23 para unirse a su receptor. Como se usa en este documento, el término "específico" se refiere a la unión selectiva del anticuerpo al epítipo del antígeno diana. Los anticuerpos pueden analizarse para determinar la especificidad de la unión comparando la unión del anticuerpo a IL-23 con la unión a un antígeno irrelevante o una mezcla de antígenos en un conjunto dado de condiciones. Si el anticuerpo se une a la IL-23 al menos 10, y preferiblemente 50 veces más que al antígeno irrelevante o la mezcla de antígenos, entonces se considera que es específico. Un anticuerpo que se une a IL-12 no es un anticuerpo específico de IL-23. Un anticuerpo que "se une específicamente" a IL-23p19 no se une a proteínas que no comprenden las secuencias derivadas de IL-23p19, es decir, "especificidad" como se usa en este documento se refiere a la especificidad de IL-23p19, y no a ninguna otra secuencia que puede estar presente en la proteína en cuestión. Por ejemplo, como se usa en este documento, un anticuerpo que "se une específicamente" a IL-23p19 típicamente se unirá a FLAG®-hIL-23p19, que es una proteína de fusión que comprende IL-23p19 y una etiqueta peptídica FLAG®, pero no se une a la etiqueta peptídica FLAG® solo o cuando se fusiona con una proteína distinta de IL-23p19.

60 Los compuestos de unión específicos de IL-23 de la presente invención pueden inhibir cualquiera de sus actividades biológicas que incluyen, pero no se limitan a la producción de IL-1 β y TNF por macrófagos peritoneales e IL-17 por células T T_H17. Véase Langrish et al. (2004) Immunol. Rev. 202: 96-105. Los anticuerpos anti-IL-23p19 también podrán inhibir la expresión génica de IL-17A, IL-17F, CCL7, CCL17, CCL20, CCL22, CCR1 y GM-CSF. Véase Langrish et al. (2005) J. Exp. Med. 201:233-240. Los compuestos de unión específicos de IL-23 de la presente invención también bloquearán la capacidad de IL-23 para potenciar la proliferación o supervivencia de las células

Th17. Cua y Kastelein (2006) Nat. Immunol. 7:557-559. La actividad inhibitoria de los anticuerpos anti-IL-23p19 diseñados será útil en el tratamiento de trastornos inflamatorios, autoinmunes y proliferativos. Ejemplos de tales trastornos se describen en las publicaciones de solicitud de patente PCT WO 04/081190; WO 04/071517; WO 00/53631; y WO 01/18051.

Las formulaciones en solución de alta concentración de la presente invención son útiles, por ejemplo, para el almacenamiento y administración del anticuerpo hum13B8-b anti-IL-23p19 para usar en el tratamiento o la prevención de un trastorno asociado con una actividad elevada de IL-23 o IL-23p19, como enfermedades mediadas por Th17, trastornos inflamatorios autoinmunes o crónicos, o cánceres.

IV. Formulaciones en solución de anticuerpo anti-IL-23p19 humanizado 13B8-b

La presente invención proporciona formulaciones en solución de alta concentración de anticuerpo hum13B8-b anti-IL-23p19, que comprende dos cadenas livianas idénticas a la secuencia de la SEQ ID NO: 2 y dos cadenas pesadas idénticas a la secuencia de la SEQ ID NO: 1, y que se describen en la patente U. S. N° 8.293.883. La secuencia 13B8 de la cadena liviana humanizada (con región constante kappa) se proporciona en la SEQ ID NO: 2, y el dominio variable de la cadena liviana comprende los residuos 1-108 de esa secuencia. La secuencia de 13B8 de la cadena pesada humanizada (con la región constante gamma1) se proporciona en la SEQ ID NO: 1, y el dominio variable de la cadena pesada comprende los residuos 1-116 de esa secuencia.

Las secuencias de cadenas pesadas y livianas (SEQ ID NO: 1 y 2) se proporcionan sin secuencias señal. Las secuencias señal de cadena pesada y liviana a modo de ejemplo se proporcionan en las SEQ ID NO: 12 y 13, respectivamente. Las secuencias señal o secuencias de ácido nucleico que codifican las secuencias señal pueden adjuntarse al término N de las respectivas cadenas de anticuerpo para crear una proteína precursora para la secreción de una célula huésped. También se pueden usar secuencias señal alternativas, y varias se pueden encontrar en "SPdb: a Signal Peptide Database." Choo et al. (2005) BMC Bioinformatics 6:249.

El 17 de agosto de 2006 se depositó un hibridoma que expresaba el anticuerpo parental 13B8 de conformidad con el Tratado de Budapest con la American Type Culture Collection (ATCC - Manassas, Virginia, EE. UU.) con el Número de acceso PTA-7803. La relación entre el anticuerpo parental 13B8 y hum13B8-b se detalla en la patente U. S. N° 8.293.883.

Las formulaciones en solución de la presente invención se desarrollaron utilizando al menos ocho lotes diferentes de anticuerpo 13B8-b preparados a partir de células de ovario de hámster chino (CHO) en cultivo, en una escala de 500 - 2000 l.

Se consideró un rango de condiciones de solución iniciales para la formulación en solución de la presente invención. Los experimentos se realizaron con varios reguladores, como acetato, citrato, histidina, TRIS y fosfato, a pH que oscilaron entre 4,0 y 8,8. Se probaron excipientes, como sacarosa, trehalosa y manitol, así como diversas concentraciones (y, por lo tanto, fuerzas iónicas) de NaCl, y la inclusión del tensioactivo polisorbato 80. Las formulaciones se seleccionaron en función de la opalescencia mediante la determinación de la D. O. a 350 nm. La agregación se midió mediante cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HP-SEC), dispersión dinámica de la luz (DLS) y ultracentrifugación analítica (AUC). La estabilidad bioquímica se midió mediante cromatografía de intercambio iónico de alto rendimiento (HP-IEX), y la estabilidad térmica se midió mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC).

Los experimentos iniciales de preformulación a 1 mg/ml de hum13B8-b revelaron que el porcentaje de pureza, medido por cromatografía líquida de alto rendimiento en fase inversa (RP-HPLC), aumentó hasta aproximadamente pH 6,0 y luego se mantuvo estable hasta pH 8,8. Véase la FIG. 1A. Sin embargo, la temperatura de despliegue del anticuerpo alcanzó un pico a aproximadamente pH 5. Véase la FIG. 1A. La comparación de especies de regulador entre acetato, citrato, fosfato y TRIS mostró que el regulador de citrato a pH 5,5 daba el mayor porcentaje de monómero y el porcentaje más bajo de picos de elución tardía. Véase la FIG. 1B. Aunque se observó una estabilidad bioquímica y biofísica óptima en el regulador de citrato a pH 5,5, la concentración de anticuerpo en el regulador de citrato a >65 mg/ml de anticuerpo dio lugar a una opalescencia sustancial (datos no mostrados). La opalescencia es indeseable debido a la posibilidad de una menor aceptación por parte del paciente, lo cual es de particular interés para un medicamento que puede formularse para la autoadministración. Aunque esta opalescencia fue reversible al diluirse y al disminuir el pH a 4,8 en regulador citrato (FIG. 1C), al disminuir el pH también se redujo el diámetro hidrodinámico (FIG. 1D), al disminuir el pH también se redujo la estabilidad térmica y bioquímica de la solución, como se refleja en una mayor proporción de formas de bajo punto de fusión (FIG. 1E), mayor acumulación de picos de elución tardía en el tiempo, según lo medido por HP-SEC (FIG. 1F), y una disminución en el pico principal en el tiempo, según lo medido por HP-IEX (FIG. 1G).

Luego se consideró la histidina como un sistema regulador alternativo en un intento por disminuir la opalescencia y la autoasociación sin disminuir la estabilidad térmica y bioquímica. Las muestras se prepararon en acetato 10 mM (pH 4,8 y 5,6), citrato 10 mM (pH 4,8, 5,5 y 6,0) e histidina 10 mM (pH 5,5 y 6,0). La opalescencia y el diámetro hidrodinámico se determinaron mediante DO_{350} y DLS, respectivamente. Véanse las FIGS. 1H y 1I. El reemplazo del

citrato con acetato o histidina minimizó la opalescencia y redujo la autoasociación sin comprometer la estabilidad bioquímica. A concentraciones de anticuerpos más altas (50 a 100 mg/mL), las formulaciones de acetato (pH 5,5) e histidina (pH 6,0) eran transparentes y no tuvieron el tamaño hidrodinámico aumentado que se había observado con citrato (pH 5,5). Véase la FIG. 1J. Las formulaciones de citrato y acetato de bajo pH (4,8) también llevaron a un aumento de la acumulación de picos de elución tardía durante el almacenamiento en condiciones de RH4 (40°C, 75% de humedad relativa), según lo medido por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Véase la FIG. 1K.

También se analizaron varios excipientes (NaCl 100 mM, 7% de sacarosa, 7% de trehalosa y 6% de manitol) para determinar sus efectos sobre la temperatura de despliegue (FIG. 2A) y la opalescencia (FIG. 2B). Se añadió siete por ciento de sacarosa para hacer formulaciones isotónicas, para disminuir la opalescencia y para aumentar la estabilidad térmica (aumentar la T_m). Los tensioactivos polisorbato 20 (PS20), polisorbato 80 (PS80) y PLURONIC® F-68 también se analizaron respecto de sus efectos sobre la agregación (FIGS. 3A y 3B) y la opalescencia (FIG. 3C). Se añadió polisorbato 80 para minimizar la agregación debido al estrés inducido por agitación.

Estos resultados llevaron a un cambio en el sistema regulador preferido. Anti-IL-23 había mostrado autoasociación y opalescencia a altas concentraciones en citrato pH 5,5 y pH 6,0. El reemplazo del citrato con acetato (pH 5,5) o histidina (pH 6,0) minimizó la opalescencia sin comprometer la estabilidad térmica y bioquímica. Se añadió sacarosa (7%) para hacer las formulaciones isotónicas. La sacarosa (7%) también disminuyó la opalescencia y aumentó la estabilidad térmica (aumento de T_m) y disminuyó la pérdida porcentual en el monómero durante los estudios de estabilidad acelerada (datos no mostrados). Se añadió polisorbato 80 (0,05%) para minimizar la agregación debido a la tensión de agitación.

Se seleccionó una formulación a base de histidina que comprende 10 mM de histidina (pH 6,0), 7% de sacarosa y 0,05% de PS-80 como la formulación de alta concentración preferida de hum13B8-b. Se determinaron diversas propiedades de la solución, incluyendo viscosidad, densidad, osmolaridad y partículas, para la formulación de histidina 10 mM (pH 6,0). Véase la Tabla 1. La viscosidad a temperatura ambiente observada (5,65 cP) es aceptable para usar en jeringas precargadas y autoinyectores.

Tabla 1

Propiedades de la solución de la formulación de histidina	
Propiedad de la solución	Histidina (pH 6,0)
Viscosidad (cP)	5,65 (25°C) 14,46 (5°C)
Densidad (g/cm ³)	1,06
Osmolaridad	266
Partículas subvisibles	25 (>10 µm) 2 (>25 µm)

V. Estabilidad de las formulaciones en solución de alta concentración de anticuerpo anti-IL-23p19 humanizado 13B8-b

La estabilidad a largo plazo de las formulaciones seleccionadas de la presente invención se estudió después de 3-24 meses de almacenamiento en una variedad de condiciones de almacenamiento. Las muestras se incubaron en viales de vidrio de 2 ml (FIG. 4), en bolsas de 30 ml (almacenamiento a granel) (FIGS. 5 y 6), o en jeringas precargadas (envase comercial de dosis única) (FIG. 7) a distintas temperaturas y niveles de humedad. Las muestras se analizaron para determinar la presencia de productos de degradación y agregación mediante métodos como cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HP-SEC), cromatografía de intercambio iónico (HP-IEX), electroforesis capilar SDS (CE-SDS, reductora y no reductora) y mapeo de péptidos. La estabilidad del anticuerpo se midió por calorimetría diferencial de barrido (DSC). La actividad biológica se evaluó mediante ELISA de unión a IL-23 y un ensayo funcional a base de células. La concentración de anticuerpo se determinó por absorción UV a 280 nm. La opalescencia se determinó midiendo la densidad óptica a 350 nm (DO_{350}). Los resultados se proporcionan en las FIGS. 4-7.

En un primer grupo de experimentos, se colocaron muestras de 1,5 ml en viales de vidrio de 2,0 ml y se analizaron después del almacenamiento en diversas condiciones. Los resultados se presentan en la FIG. 4. Se observó muy poca degradación o agregación en muestras almacenadas a 5°C y humedad ambiente, lo que corresponde a las condiciones típicas de refrigeración, FIGS. 4A-4F. Las condiciones de degradación acelerada, como RH4 (40°C, 75% de humedad relativa), que se incluyeron como un control positivo para la degradación de la muestra, mostraron la pérdida esperada de monómero y el aumento de los productos de degradación y agregación comenzando tan pronto como el primer punto temporal (un mes), FIGS. 4A-4F. La opalescencia era estable a 5°C (FIG. 4G), pero

aumentó a 25°C y 40°C (FIGS. 4H y 4I). La oxidación fue igualmente mínima a 5°C, pero significativa en condiciones de RH4, o a 40°C, FIGS. 4J y 4K. Estos resultados indican que, aunque los experimentos fueron capaces de detectar la degradación por varios ensayos, como se evidencia, por ejemplo, por los resultados de RH4, el almacenamiento en condiciones típicas de refrigeración llevó a una pérdida pequeña o nula en la calidad del producto durante al menos aproximadamente nueve meses de almacenamiento.

En un grupo de experimentos, las muestras se colocaron en bolsas CELSIUS®-Pak (Sartorius, Göttingen, Alemania) de la capa de contacto fluida de 30 ml de etileno-acetato de vinilo (EVA) y se analizaron después de su almacenamiento en diversas condiciones. Los resultados se presentan en las FIGS. 5 y 6. Estos experimentos se diseñaron principalmente para evaluar la estabilidad de la sustancia farmacológica en condiciones típicas de almacenamiento a granel.

Las muestras de almacenamiento a granel se almacenaron en tres condiciones de congelación (-80°, -45°C y -20°C) y se refrigeraron (2°C- 8°C). Los datos representativos se proporcionan en la FIG. 5 para muestras almacenadas a 5°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) y -45°C hasta por 18 meses. Se observaron aumentos leves en la concentración durante los 12 meses de almacenamiento (FIG. 5A), probablemente debido a la evaporación de las bolsas de almacenamiento en las muestras a 5°C. No hubo tendencias significativas con respecto a la actividad biológica (FIGS. 5B y 5C), y las impurezas relacionadas con las proteínas, los productos de degradación y los agregados estuvieron generalmente dentro de las especificaciones hasta 18 meses, en particular para muestras almacenadas congeladas a -45°C (FIGS. 5D-5L).

La estabilidad en el almacenamiento a granel también se evaluó a temperaturas más altas. Se proporcionan datos representativos en la FIG. 6 para muestras almacenadas a 5°C ($\pm 3^\circ\text{C}$), 25°C, 25H, 40°C y RH4 hasta por 12 meses. Las muestras refrigeradas mostraron una actividad biológica estable durante 12 meses, mientras que las muestras almacenadas a temperatura ambiente (25°C) en realidad mostraron incrementos aparentes en la potencia biológica, un efecto que probablemente se deba a la concentración neta debida a la evaporación, FIGS. 6A y 6B. Las muestras se mantuvieron estables durante 12 meses cuando se almacenaron a 5°C, pero las impurezas relacionadas con las proteínas (productos de degradación y agregados) aumentaron con el tiempo para las muestras almacenadas a 25°C y 25H, y aumentaron dramáticamente para las muestras almacenadas a 40°C y RH4 (condiciones de degradación acelerada), FIGS. 6C-6K.

En un tercer grupo de experimentos, se colocaron muestras de 1 ml de 100 mg/ml de formulación de anticuerpo en jeringas (jeringas precargadas BD Hypak Physiolis) y se analizaron después de su almacenamiento en diversas condiciones. Los resultados se presentan en la FIG. 7 para muestras almacenadas a 5°C ($\pm 3^\circ\text{C}$) por hasta 24 meses. Las concentraciones de anticuerpos permanecieron esencialmente sin cambios (FIG. 7A), al igual que la actividad biológica (FIGS. 7B y 7C). Los niveles de especies de alto peso molecular, porcentaje de monómeros, especies de bajo peso molecular, porcentaje de pico de anticuerpo principal, variantes ácidas, variantes básicas, especies de pico posterior principal, IgG principal y cadenas pesadas y livianas (Figuras 7D-7L, respectivamente) permanecieron esencialmente estables durante al menos 12-24 meses.

Los experimentos de estabilidad a largo plazo presentados en las FIGS. 4-7 revelan que la formulación de histidina de hum13B8-b de la presente invención es estable, tanto en lo que respecta a la actividad biológica como a la integridad física, a altas concentraciones de anticuerpos en condiciones de almacenamiento típicas, ya sea en solución a granel congelada o refrigerada, como como en una jeringa precargada.

Los resultados obtenidos en condiciones de degradación acelerada, como RH4 y 25H, y otras condiciones de temperatura elevada, tienen la intención de ilustrar los posibles productos de degradación y las vías para el anticuerpo hum13B8-b, y no reflejan las tasas de degradación del anticuerpo destinado a uso terapéutico. Las principales vías de degradación para hum13B8-b encontradas durante condiciones de degradación acelerada incluyen la pérdida de pureza observada por CE-SDS, aumentos en las especies de HMW y LMW y disminución en el porcentaje de monómero observado por HP-SEC. Además, la HP-IEX reveló aumentos en las variantes ácidas y en las especies de pico principal posterior, con disminuciones en las variantes básicas y en el pico principal. El almacenamiento prolongado de formulaciones en solución de fármacos de anticuerpos, como el hum13B8-b, a una temperatura elevada es muy poco probable. El almacenamiento a largo plazo de hum13B8-b, por ejemplo, es probable que se conserve en bolsas CELSIUS®-Pak congeladas a -45°C, en cuyas condiciones se espera que los atributos de calidad permanezcan estables durante al menos 18 meses. Es probable que las jeringas o autoinyectores precargados que contienen dosis individuales de hum13B8-b se almacenen a aproximadamente 5°C ($\pm 3^\circ\text{C}$), y también se espera que permanezcan estables durante al menos 18 meses.

VI. Dosificación y administración

Aunque las formulaciones en solución de alta concentración de la presente invención son particularmente adecuadas para la administración subcutánea en dosis altas, dichas formulaciones también pueden administrarse de otras maneras. Las vías adecuadas de administración pueden incluir, por ejemplo, la administración oral, rectal, transmucosa o intestinal; administración parenteral, incluidas las inyecciones intramusculares, intradérmicas, intramedulares, así como las inyecciones intratecales, intraventriculares directas, intravenosas, intraperitoneales,

intranasales o intraoculares.

De modo alternativo, se puede administrar el anticuerpo de manera local en lugar de sistémica, por ejemplo, mediante la inyección del anticuerpo directamente en una articulación artrítica o lesión inducida por patógeno caracterizada por inmunopatología, a menudo en un depósito o formulación de liberación sostenida. Además, se puede administrar el anticuerpo en un sistema de administración de fármacos dirigido, por ejemplo, en un liposoma recubierto con un anticuerpo específico del tejido, dirigiéndose, por ejemplo, a una articulación artrítica o una lesión inducida por patógenos caracterizada por inmunopatología. Los liposomas serán dirigidos y absorbidos selectivamente por el tejido afectado.

La administración subcutánea se puede realizar mediante inyección utilizando una jeringa, un autoinyector, un bolígrafo inyector o un dispositivo de inyección sin aguja.

Aunque las formulaciones en solución de alta concentración de la presente invención son particularmente ventajosas para los usos que requieren una alta concentración de anticuerpo, no hay razón para que las formulaciones no puedan usarse en concentraciones más bajas en circunstancias donde no se requieren altas concentraciones o no son deseables. Las concentraciones más bajas de anticuerpos pueden ser útiles para la administración subcutánea de dosis bajas, o en otros modos de administración (como la administración intravenosa) donde el volumen que puede administrarse es sustancialmente de más de 1 ml. Tales concentraciones más bajas pueden incluir 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10, 5, 2, 1 mg/ml o menos.

La selección de un régimen de administración para un tratamiento terapéutico depende de varios factores, entre ellos, la tasa de recambio de suero o tejido de la entidad, el nivel de los síntomas, la inmunogenicidad de la entidad y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. Preferiblemente, un régimen de administración maximiza la cantidad de agente terapéutico administrado al paciente de acuerdo con un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de agente biológico administrado depende en parte de la entidad en particular y de la gravedad de la condición que se está tratando. Se dispone de orientación para seleccionar las dosis adecuadas de anticuerpos, citoquinas y moléculas pequeñas. Véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido; Kresina (ed.) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (ed.) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom et al. (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon et al. (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky et al. (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602; *Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 57th Ed)*; Medical Economics Company; ISBN: 1563634457; 57th edition (noviembre de 2002).

El médico realiza la determinación de la dosis adecuada, por ejemplo, utilizando parámetros o factores conocidos o sospechados en la técnica para afectar el tratamiento o predecir que afectará el tratamiento. La dosis apropiada ("cantidad terapéuticamente eficaz") de la proteína dependerá, por ejemplo, de la condición por tratar, la gravedad y el curso de la misma, si la proteína se administra con fines preventivos o terapéuticos, terapia previa, historia clínica del paciente y respuesta a la proteína, el tipo de proteína utilizada y la discreción del médico tratante. En algunas circunstancias, se selecciona una dosis inicial baja y la dosificación se aumenta en pequeños incrementos a partir de ese momento hasta que se logre el beneficio terapéutico deseado u óptimo en relación con cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen las de los síntomas, por ejemplo, de la inflamación o el nivel de citoquinas inflamatorias producidas. La proteína se administra adecuadamente al paciente de una vez o repetidamente. La proteína se puede administrar sola o junto con otros medicamentos o terapias.

Los anticuerpos pueden administrarse por infusión continua o por dosis a intervalos, por ejemplo, de un día, 1-7 veces por semana, una semana, dos semanas, mensual, bimestral, trimestral, semestral o anual, etc. Un protocolo de dosis preferido es uno que involucra la dosis máxima o la frecuencia de la dosis que evita los efectos secundarios importantes no deseados. Una dosis semanal total es en general de al menos 0,05 µg/kg, 0,2 µg/kg, 0,5 µg/kg, 1 µg/kg, 10 µg/kg, 100 µg/kg, 0,2 mg/kg, 1,0 mg/kg, 2,0 mg/kg, 10 mg/kg, 25 mg/kg, 50 mg/kg de peso corporal o más. Véase, por ejemplo, Yang et al. (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herald et al. (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu et al. (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji et al. (2000) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144.

VII. Usos

La presente invención proporciona formulaciones en solución de alta concentración de IL-23p19 mAbHum13B8-b antihumana para uso en el tratamiento de trastornos y afecciones inflamatorias, por ejemplo, del sistema nervioso central, sistema nervioso periférico y tracto gastrointestinal, así como trastornos autoinmunes y proliferativos.

Las formulaciones de la presente invención se pueden usar en el tratamiento, por ejemplo, de esclerosis múltiple (EM), incluida EM recurrente-remitente y EM primaria progresiva, enfermedad de Alzheimer, esclerosis lateral amiotrófica (también conocida como ELA; enfermedad de Lou Gehrig), lesión cerebral isquémica, enfermedades priónicas y demencia asociada al VIH, así como dolor neuropático, neuropatías postraumáticas, síndrome de

Guillain-Barré (SGB), polineuropatía periférica y regeneración nerviosa.

Las formulaciones de la presente invención también pueden usarse en el tratamiento de trastornos inflamatorios del intestino, por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa, enfermedad celíaca y síndrome de intestino irritable. También se pueden usar en el tratamiento de trastornos inflamatorios como la enfermedad de injerto versus huésped, psoriasis, dermatitis atópica, artritis, que incluye artritis reumatoide, osteoartritis y artritis psoriásica, trastornos autoinmunes, como lupus eritematoso sistémico y diabetes de tipo I y trastornos proliferativos como el cáncer. Véanse, por ejemplo, las publicaciones de solicitud de patente PCT WO 04/081190, WO 04/071517, WO 00/53631 y WO 01/18051.

Ejemplos

Ejemplo 1

Formulación en solución

En una realización, la formulación en solución de hum13B8-b de la presente invención se proporciona como una solución de anticuerpo de 100 mg/ml en un volumen de 1,0 ml en una jeringa precargada o un autoinyector. El volumen de 1,0 mL es el volumen extraíble, en lugar del volumen de llenado, que puede incluir un llenado excesivo suficiente para garantizar el suministro de la dosis completa de 1,0 ml. En la Tabla 2, se proporciona una receta de ejemplo para 1,0 ml de la formulación de la presente invención. En una realización, se prepara un lote de producto farmacológico en una escala de 15 a 30 L, o aproximadamente 15.000 a 30.000 dosis.

Tabla 2

1.0 mL de formulación en solución		
Componente	Grado	Cantidad
hum13B8-b	especificaciones del producto	100 mg
L-Histidina	Ph. Eur./USP	0,683 mg
L-Histidina HCl	Ph. Eur.	1,17 mg
Polisorbato 80	Ph. Eur./NF/JP	0,500 mg
Sacarosa	Ph. Eur./NF/JP	70,0 mg
Agua para inyección	USP	c. s.

En algunas realizaciones, las cantidades de los componentes del regulador (L-histidina y L-histidina HCl) se desvían ligeramente de las cantidades en peso enumeradas en la Tabla 2 debido a la necesidad de ajustar el pH a aproximadamente 6,0. Específicamente, en algunas realizaciones, más o menos de las formas ácidas o básicas de histidina, en comparación con las cantidades en la Tabla 2, se agregan para ajustar el pH al valor deseado de aproximadamente 6,0. En otras realizaciones adicionales, se agregan cantidades de L-histidina y L-histidina HCl que se aproximan a las de la Tabla 2 para obtener un pH cercano, pero un poco más alto que 6,0, y luego se agrega HCl para disminuir el pH de la formulación resultante a aproximadamente 6,0.

Ejemplo 2

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Se usó la calorimetría diferencial de barrido (DSC) de Valerian-Plotnikov para monitorear la estabilidad térmica de los anticuerpos en las formulaciones de la presente invención. DSC mide directamente los cambios de calor que se producen en las proteínas durante un aumento o disminución controlados de la temperatura. Una proteína en solución está en equilibrio entre la conformación nativa (plegada) y su estado desnaturalizado (desplegado). La DSC se utiliza para determinar la temperatura a la que se desnaturaliza el 50% de la proteína (punto medio de transición térmica, T_m). Las proteínas con mayor T_m son, en general, más estables. Por ejemplo, se proporciona una curva de DSC en la FIG. 1E, que muestra dos transiciones, la primera (T_{m1}) se produce alrededor de 64-70°C, dependiendo del pH, y la segunda, la transición principal (T_{m2}) de aproximadamente 80°C. La transición principal se puede atribuir al despliegue del fragmento Fc. Los eventos térmicos que preceden a la transición principal (es decir, a una temperatura más baja) se deben probablemente al despliegue de varios otros dominios dentro del anticuerpo (por ejemplo, Fab), que está en línea con los elementos estructurales esperados de los anticuerpos IgG1 descritos en la bibliografía. Vermeer (2000) Biophys. J. 78:394.

Ejemplo 3

Cromatografía de exclusión por tamaño de alto rendimiento (HP-SEC)

5 El porcentaje de especies de alto peso molecular (HMW), de bajo peso molecular (LMW) y monómero en las formulaciones de hum13B8-b de la presente invención se detectó mediante HP-SEC. La solución de prueba se diluyó y se separó por HPLC usando una columna de exclusión por tamaño (paquete de YMC Diol-200, tamaño de poro 200 Å, 300 x 8,0 mm, 5 µm, o equivalente; YMC Co. Ltd., Kioto, Japón). Las áreas de los picos se utilizan para determinar el porcentaje de monómero, especies de HMW y especies de LMW.

10 Los picos de elución de SEC se caracterizaron mediante dispersión de luz láser de múltiples ángulos (SEC-MALLS), que se puede usar para estimar el peso molecular y monitorear los agregados. Después de la separación del pico de monómero de los fragmentos y agregados en la columna SEC, la muestra se pasa a través de detectores ultravioleta (UV), MALLS e índice de refracción (RI), lo que permite el cálculo de la concentración de analito y la estimación posterior de su peso molecular (MW). La intensidad de la luz dispersada (detectada por MALLS) es proporcional al producto de la concentración de proteína (determinada por RI) y el peso molecular. SEC-MALLS muestra un pico principal predominante con un peso molecular de aproximadamente 138 kDa. Esto se corresponde bastante bien con el peso molecular teórico calculado del monómero de hum13B8-b, y también la masa del monómero de hum13B8-b como se detectó usando espectrometría de masas, al tomar en cuenta la resolución cromatográfica de SEC y la precisión de la detección de dispersión de luz. Una especie de alto peso molecular (HMW1), que tiene un peso molecular de aproximadamente 300 kDa, probablemente representa una especie de dímero. Un segundo pico de HMW (HMW2), que no se observa en todos los lotes, contiene especies con un peso molecular estimado de aproximadamente 465 kDa, que corresponde a una especie de trímero. Se detecta una especie de bajo peso molecular (LMW) con un peso molecular aproximado de 108-117 kDa, que puede representar un producto de fragmentación, por ejemplo, el producto de fragmentación bisagra.

Ejemplo 4

Dispersión de luz dinámica (DLS)

30 La dispersión de luz dinámica (DLS) es una técnica que puede proporcionar información sobre el perfil de distribución de tamaño de los anticuerpos monoclonales en un intervalo de 0,5 nm a 6 µm en solución. El anticuerpo monoclonal hum13B8-b muestra un diámetro hidrodinámico promedio de aproximadamente 9,5 nm de intensidad (y 6,5 nm de volumen). Esto es consistente con los valores para otros anticuerpos monoclonales. Las formulaciones de mayor potencia iónica tienden a tener diámetros hidrodinámicos más bajos que las formulaciones de baja potencia iónica, y pueden verse influidas por otros parámetros de la solución, como el regulador y el pH. Véanse FIGS. 11 y 1J. Los anticuerpos en las formulaciones de la presente invención son esencialmente monodispersos. El diámetro hidrodinámico para los anticuerpos de la presente invención es reversible, como lo demuestran los experimentos en los cuales un anticuerpo se diluye en un regulador de potencia iónica mayor o menor (datos no mostrados). Estos resultados sugieren que el diámetro hidrodinámico se equilibrará con el entorno local del sitio de inyección cuando se administre a un sujeto.

Ejemplo 5

Cromatografía de intercambio catiónico de alto rendimiento (HP-ICX)

45 Las variantes de carga para hum13B8-b fueron detectadas por HP-ICX, que se basa en interacciones electrostáticas entre proteínas en una muestra y cargas inmovilizadas en una resina. Las variantes de 13B8-b cargadas positivamente se unen a una resina cargada negativamente en una columna de intercambio catiónico débil (Dionex ProPac WCX-10, 4 x 250 mm, o equivalente; Thermo Scientific, Bannockburn, Ill., EE. UU.) y se separan por HPLC. El anticuerpo se eluye incrementando el pH y la concentración de sal, disminuyendo efectivamente la carga de las variantes de anticuerpo y reemplazándolas con iones de carga equivalente. La presencia de hum13B8-b y las variantes en el eluyente se determinan por detección UV. Las áreas de los picos se utilizan para determinar el porcentaje de variantes ácidas, picos principales, picos principal posterior y variantes básicas.

55 Todas las especies detectadas antes del pico principal, que duran alrededor de 23 minutos, se denominan variantes ácidas, mientras que las que eluyen después del pico principal se denominan variantes básicas. El análisis de las variantes ácidas y los picos ácidos revela que no tienen modificaciones en el extremo N o C, mientras que el pico principal muestra una escisión completa de lisina en el extremo C y una formación completa de piroglutamato en el extremo N. El pico principal conserva la actividad biológica completa. El pico principal posterior exhibe una escisión completa de lisina y una amidificación con prolina limitada en el extremo C, la formación completa de piroglutamato en el extremo N, la oxidación de Met251 y Met427, y exhibe una potencia reducida según lo medido por ELISA de unión. El pico básico 1 muestra una escisión completa de lisina y algo de α-amidación de prolina en el extremo C-terminal, y una formación completa de piroglutamato en el extremo N-terminal. El pico básico 3, el más abundante de los picos básicos, muestra una escisión completa de lisina en el extremo C-terminal y una formación incompleta de piroglutamato en el extremo N-terminal. Las variantes básicas muestran una escisión completa de lisina y niveles variables de α-amidación de la prolina en el extremo C, e incompletas para completar la formación de piroglutamato

en el extremo N. La mayoría de las variantes de carga conservan la actividad biológica.

Ejemplo 6

5 Mapeo de péptidos

El mapeo de péptidos proporciona información sobre la estructura primaria de hum13B8-b, y puede usarse para evaluar si se ha producido oxidación. Para aumentar la cobertura de la secuencia, se utilizaron dos mapas de péptidos enzimáticos diferentes para caracterizar hum13B8-b. El primero fue el mapeo de péptidos después de la digestión con endoproteinasa Lys-C. Se obtuvo un mapa de péptidos tratando una muestra de hum13B8-b con clorhidrato de guanidina para desnaturalizar la proteína y con 1,4-ditiotreitol (DTT) para reducir los enlaces disulfuro. Las muestras se trataron luego con yodoacetamida (IAM) para alquilar los tioles libres resultantes del tratamiento con DTT. Las muestras fueron digeridas luego con endoproteinasa Lys-C. El análisis de los péptidos resultantes se realizó mediante cromatografía líquida en fase reversa (Xbridge C18, 5 µm, tamaño de poro 130 Å, 2,1 x 150 mm o equivalente; Waters Corporation, Milford, Mass., EE. UU.) acoplada a espectrometría de masas con electronebulización. Las secuencias peptídicas que se originan a partir de las cadenas liviana (L) y pesada (H), así como sus masas que se detectaron mediante espectrometría de masas, se presentan en la Tabla 3. Los tiempos de retención se determinaron por absorción ultravioleta a 214 nm durante la cromatografía en un lapso de 90 minutos. Las masas se corrigieron para determinar la alquilación de residuos de cisteína mediante la adición de una masa neta de 57 Da por cada residuo de cisteína alquilado por IAM. Cinco péptidos que se originan en la región determinante de la complementariedad (CDR) de hum13B8-b son de particular interés. También se observaron péptidos modificados postraduccionalmente comunes, tales como el péptido de la cadena pesada N-terminal piroglutamada, el péptido de la cadena pesada C-terminal recortada con lisina y varios péptidos desamidados y oxidados con metionina. Ninguna de estas modificaciones se encuentra en las CDR de la molécula. Se pueden realizar experimentos de mapeo de péptidos de rutina sin el uso de espectrometría de masas, y los tiempos de retención de los picos observados se pueden usar para comparar muestras, como una muestra de estabilidad (prueba) y una muestra de control (referencia).

Se desarrolló un segundo método de mapeo de péptidos, que emplea digestión con tripsina, para agregar cobertura sobre los residuos 64-120 de la cadena pesada, que no estaba bien representada en el mapa de péptidos Lys-C. Además del sitio de escisión C-terminal de los residuos de lisina que se comparte con la endoproteinasa C, la tripsina también escinde la C-terminal de los residuos de arginina (a menos que el siguiente residuo sea P), dando como resultado un conjunto de péptidos más pequeños. Los péptidos que surgen de los residuos 64 a 120 de la cadena pesada se detectaron utilizando cromatografía líquida de fase inversa acoplada a la detección de absorbancia UV y espectrometría de masas (para la anotación de picos). Los fragmentos peptídicos trípticos relevantes de hum13B8-b se incluyen en la Tabla 3.

Tabla 3

Mapeo de péptidos con endoproteinasa Lys-C y tripsina				
Cadena	Péptido	Tiempo de retención (min)	Masa observada (Da)	Observaciones
H	13-19	17,15	685,42	
H	334-337	8,94	447,27	
H	213-217	13,12	599,37	
H	14-19	17,15	557,32	
H	409-413	23,95	574,34	
H	439-445	35,96	659,35	Término C -K
H	326-333	37,23	837,50	
H	1-12	41,37	1267,68	1 pE
H	340-359	43,49	2310,19	
H	338-359	43,49	2509,32	
H	133-146	43,81	1320,68	
H	414-438	45,04	3059,36	M427 oxidado
H	360-369	47,39	1160,62	
H	121-132	47,97	1185,65	

H	274-287	50,08	1676,80	
H	414-438	52,65	3043,37	
H	370-391	56,90	2544,09	N383 isoD
H	370-391	57,27	2543,10	
H	370-391	58,13	2544,10	N383D
H	248-273	60,30	2970,41	M251 oxidado
H	392-408	62,47	1872,92	
H	248-273	63,11	2954,42	
H	288-316	70,98	5066,36	
H	288-316	71,19	4904,28	
H	288-316	71,39	4758,17	
H	222-247	71,74	2843,43	
H	274-325	73,05	6096,43	
H	222-245	73,88	2618,29	
H	147-209	82,40	6712,66	
H	13-63	93,78	5696,78	
H	20-63	95,45	5029,36	Derivado de CDR
H	24-63	96,01	4555,12	Derivado de CDR
L	184-188	9,76	624,28	
L	208-214	19,92	868,36	
L	104-107	22,96	487,30	
L	146-149	26,46	559,32	Derivado de CDR
L	150-169	29,11	2134,95	
L	191-207	39,01	1874,92	
L	46-52	40,79	833,51	Derivado de CDR
L	170-183	47,39	1501,76	
L	108-126	64,81	2101,11	
L	1-42	68,14	4765,28	
L	127-145	68,79	2125,05	
L	1-39	68,90	4483,13	
L	53-103	77,20	5559,57	Derivado de CDR

Ejemplo 7

Concentración de proteínas por espectroscopia UV

5

La concentración de proteína del anticuerpo hum13B8-b en las formulaciones en solución de la presente invención se determina mediante espectroscopia UV. La determinación se basa en la absorbancia de la luz UV a 280 nm por aminoácidos como los residuos de triptófano, tirosina y cisteína. La absorbancia a 280 nm se corrige para la dispersión de la luz utilizando la absorbancia a 320 nm. El método comprende una dilución gravimétrica de la muestra en agua y el registro de un espectro UV para establecer la absorbancia a 280 nm y la absorbancia a 320 nm. Estos valores de absorbancia y el coeficiente de extinción determinado experimentalmente de $1,44 \text{ ml mg}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ se utilizan para calcular la concentración de hum13B8-b.

10

Ejemplo 8

Actividad biológica - Ensayo funcional a base de células

5 Se desarrolló un ensayo a base de células para evaluar la capacidad de hum13B8-b en formulaciones de la presente invención para bloquear las actividades biológicas de la IL-23 humana. Este ensayo evalúa la capacidad de hum13B8-b para inhibir la activación de STAT3 inducida por IL-23 en una línea celular sensible a IL-23 (Kit 225). Las diluciones en serie de un material de referencia de hum13B8-b y una muestra de prueba se incuban con una concentración fija de IL-23 humana, seguido de incubación con células sensibles a Kit225 IL-23. La inhibición de la fosforilación de STAT3 por hum13B8-b se mide en lisados celulares mediante ELISA utilizando el par de anticuerpos de detección de anti-p-STAT3 y captura de STAT3, seguido de incubación con anti-IgG conjugado con peroxidasa y adición de sustrato quimioluminiscente. Se genera una curva de respuesta de inhibición (“curva estándar”) utilizando un ajuste logístico de cuatro parámetros de regresión no lineal, donde el valor de IC_{50} representa la concentración de anti-IL-23 que inhibe el 50% de la respuesta máxima. La potencia relativa de la muestra de prueba se evalúa mediante la comparación de la curva de respuesta de inhibición de la muestra de prueba con la curva estándar y se calcula como el porcentaje de referencia. Los valores de potencia relativa para múltiples replicados de la misma muestra se combinan en un solo valor informable, una media geométrica de la potencia relativa.

Ejemplo 9

20 Actividad biológica – ELISA de unión

La afinidad de hum13B8-b en las formulaciones de la presente invención para IL-23 humana se evalúa en un ELISA de unión en equilibrio, donde se aplican diluciones seriadas de material de referencia y muestras de prueba a placas de ensayo recubiertas con citoquina IL-23 humana. Este ensayo se puede usar, por ejemplo, para evaluar la retención de actividad biológica en varias formulaciones terapéuticas potenciales. La potencia relativa de la muestra de prueba se evalúa mediante la comparación de la curva de respuesta a la dosis de la muestra de prueba con la curva de respuesta a la dosis del material de referencia y se calcula como porcentaje de la referencia.

30 Los ELISA se realizan mediante métodos bien conocidos en la técnica. Brevemente, las diluciones en serie de hum13B8-b en una formulación de la presente invención se agregan a los pocillos de una placa de microtitulación que se había recubierto previamente con proteína IL-23 humana y luego se bloquearon. Después de un período de incubación, los pocillos se lavan y se agrega un reactivo de detección del anticuerpo anti-IgG(Fc) de cabra conjugado con peroxidasa. Los pocillos se lavan de nuevo y se agrega un sustrato de peroxidasa quimioluminiscente. La señal se lee por quimioluminiscencia. Se genera una curva de respuesta a la dosis sigmoidal mediante el ajuste logístico de regresión no lineal de cuatro parámetros, donde el valor de EC_{50} representa la concentración necesaria para alcanzar el 50% de la señal de unión máxima de IL-23. La potencia biológica relativa se calcula comparando los resultados obtenidos con las muestras de prueba con una curva estándar basada en los niveles de señal obtenidos con una muestra de referencia. Los resultados se presentan como porcentaje de potencia biológica en comparación con la solución de anticuerpo de referencia. Los valores de potencia relativa para múltiples replicados de la misma muestra se combinan en un solo valor informable, una media geométrica de la potencia relativa.

Ejemplo 10

45 Electroforesis capilar SDS (CE-SDS)

La electroforesis capilar con dodecilsulfato de sodio (CE-SDS) separa las proteínas según el tamaño. La CE-SDS se puede realizar en condiciones no reductoras o en condiciones reductoras. La CE-SDS no reductora resuelve los anticuerpos intactos de otras especies en la muestra, mientras que la CE-SDS reductora resuelve las cadenas pesadas y livianas disociadas entre sí, y también de otras especies potenciales en la muestra. Véase, por ejemplo, Rustandi et al. (2008) Electrophoresis 29:3612.

55 La CE-SDS no reductora implica la desnaturalización por calor de las muestras del anticuerpo hum13B8-b en presencia de N-etilmaleimida, para alquilar residuos de cisteína libres y SDS. Posteriormente, la muestra se separa en un capilar que contiene una matriz de polímero de SDS reemplazable, que proporciona la selectividad de tamizado para la separación. Todos los picos en la muestra de prueba están integrados y las áreas de los picos se utilizan para determinar el porcentaje de IgG principal (anticuerpo intacto) en la muestra.

60 La reducción de CE-SDS implica la desnaturalización por calor de muestras del anticuerpo hum13B8-b en presencia de 2-mercaptoetanol, para reducir los enlaces disulfuro y SDS. Posteriormente, la muestra se separa en un capilar que contiene una matriz de polímero de SDS reemplazable, que proporciona la selectividad de tamizado para la separación. Todos los picos en la muestra de prueba están integrados y las áreas de los picos se utilizan para determinar el porcentaje de cadenas pesadas y livianas intactas en hum13B8-b.

65

Ejemplo 11

Ultracentrifugación analítica de velocidad de sedimentación (SV-AUC)

5 Se utilizó SV-AUC para investigar la estructura cuaternaria del anticuerpo hum13B8-b en las formulaciones de la presente invención. La SV-AUC mide la velocidad a la que las moléculas se sedimentan en respuesta a una fuerza centrífuga. Esta velocidad de sedimentación proporciona información sobre el peso molecular de las moléculas presentes en la muestra. Hum13B8-b predomina sobre los sedimentos como una especie con un coeficiente de sedimentación ($S_{20,w}$) de 7,0S. Esta especie tiene un peso molecular estimado de aproximadamente 150 kDa, que está en línea con el peso molecular esperado del monómero. La relación de fricción, que depende de la hidratación y la forma de la macromolécula, es similar entre los lotes.

Ejemplo 12

Estabilidad extendida de las formulaciones de anticuerpos

15 Se obtuvieron datos adicionales de estabilidad a largo plazo para las formulaciones de anticuerpos de la presente invención. Los datos de estabilidad a modo de ejemplo hasta 24 meses se presentan en las Tablas 4-9 a continuación para los lotes E y D.

20

Tabla 4

Condición de almacenamiento	5C						
	Intervalo de prueba de estabilidad (meses)						
Lote D	Inicial	1M	3M	6M	12M	18M	24M
Prueba							
Ensayo - UV (A280nm) mg/mL	95,1	96,1	100,4	99,4	93,6	97,7	103,8
HP-IEX [%]							
Variantes ácidas	10,1	10,2	10,2	10,6	9,3	11,5	11,6
Pico 1 ácido	9,7	9,8	10,7	10,5	10,7	11,4	11,5
Pico principal previo							
Pico principal	63,2	63,3	62,3	62,0	62,2	60,3	60,4
Pico principal posterior							
Pico 1 básico	9,3	8,9	8,9	9,2	9,7	9,0	8,7
Pico 2 básico	3,9	4,0	4,4	3,9	2,9	3,4	3,1
Variantes básicas	3,8	3,2	3,5	3,8	5,3	3,9	4,0
Otros	ND	0,6	ND	ND	ND	0,5	0,6
HP-SEC [%]							
Especies de alto peso molecular	0,79	0,83	0,95	0,51	0,84	1,16	1,24
Monómero	99,2	99,1	99,0	99,5	98,9	98,6	98,5
Picos de elución tardía	NQ	0,11	0,07	NQ	0,25	<QL	0,27
HIAC [partículas/mL]							
2 mM	2827	1805	11905	3701	2895	1081	1879
5 mM	292	168	1474	712	612	201	644
10 mM	35	32	326	211	168	36	123
25 mM	0	1	13	9	6	2	4

ND - No detectado; NQ - No cuantificado; QL - Límite de cuantificación; 5C: 5°C (\pm 3°C); QL = 0,25%

25

Tabla 5

Condición de almacenamiento	25H				
Lote D	Intervalo de prueba de estabilidad (meses)				
Prueba	Inicial	1 M	3M	6M	12 M
Ensayo - UV (A280nm) mg/mL	95,1	96,4	98,6	102,8	96,3
HP-IEX [%]					
Variantes ácidas	10,1	11,5	15,3	18,5	25,4
Pico 1 ácido	9,7	11,6	13,8	14,8	17,9
Pico principal previo					
Pico principal	63,2	60,3	56,0	51,7	42,2
Pico principal posterior					
Pico 1 básico	9,3	9,5	8,5	8,7	8,7
Pico 2 básico	3,9	3,3	2,2	1,7	1,6
Pico principal posterior					
Variantes básicas	3,8	3,8	3,6	4,5	4,2
Condición de almacenamiento	25H				
Lote D	Intervalo de prueba de estabilidad (meses)				
Prueba	Inicial	1 M	3M	6M	12 M
Otros	ND	ND	0,5	ND	ND
HP-SEC [%]					
Especies de alto peso molecular	0,79	1,47	2,05	1,35	2,69
Monómero	99,2	98,4	97,7	97,9	96,2
Pico de elución tardía	NQ	0,14	0,30	0,77	1,15
ND - No detectado; NQ - No cuantificado; 25H: 25°C/60% de humedad relativa					

Tabla 6

Condición de almacenamiento	RH4			
Lote D	Intervalo de prueba de estabilidad (meses)			
Prueba	Inicial	1 M	3M	6M
Ensayo - UV (A280nm) mg/mL	95,1	95,0	103,6	102,7
HP-IEX [%]				
Variantes ácidas	10,1	20,4	46,3	58,4
Pico 1 ácido	9,7	15,9	17,8	15,0
Pico principal previo				
Pico principal	63,2	49,4	24,7	15,8
Pico principal posterior				
Pico 1 básico	9,3	8,2	5,0	5,8
Pico 2 básico	3,9	1,5	1,8	ND
Variantes básicas	3,8	3,7	4,4	5,0

Otros	ND	0,8	ND	ND
HP-SEC [%]				
Especies de alto peso molecular	0,79	2,34	4,91	3,68
Monómero	99,2	97,1	93,3	93,3
Picos de elución tardía	NQ	0,56	1,74	3,00
ND - No detectado; NQ - No cuantificado; RH4: 40°C/75% de humedad relativa				

Tabla 7

Condición de almacenamiento	5C						
Lote E	Intervalo de prueba de estabilidad (meses)						
Prueba	Inicial	1 M	3 M	6 M	12 M	18 M	24 M
Ensayo - UV (A280nm) [mg/mL]	94,1	97,5	97,3	99,0	91,9	101,3	98,2
HP-IEX [%]							
Variantes ácidas	8,1	7,7	7,8	8,0	7,9	8,5	8,6
Pico 1 ácido	8,3	8,8	8,8	8,8	9,1	9,5	9,6
Pico principal previo							
Pico principal	66,0	66,0	66,0	65,8	65,6	65,2	65,2
Condición de almacenamiento	5C						
Lote E	Intervalo de prueba de estabilidad (meses)						
Prueba	Inicial	1 M	3 M	6 M	12 M	18 M	
Pico principal posterior							
Pico 1 básico	9,5	9,5	9,7	9,8	9,9	9,4	9,4
Pico 2 básico	4,3	4,7	4,2	4,0	3,7	3,6	3,3
Variantes básicas	3,3	3,3	3,4	3,5	3,6	3,4	3,4
Otros	0,5	ND	ND	ND	ND	0,5	0,5
HP-IEX %							
Variantes ácidas	16,9	NT	17,2	17,8	18,2	NT	19,1
Pico principal	63,8	NT	63,5	62,7	63,1	NT	63,3
Pico principal posterior	2,0	NT	2,1	2,4	2,1	NT	1,9
Variantes básicas	17,3	NT	17,1	17,0	16,8	NT	15,8
ELISA de unión Potencia relativa al control [%]	112	NT	NT	96	NT	NT	NT
ELISA de unión Potencia relativa al control [%]	NT	NT	NT	NT	98	100	103
Potencia biológica por ensayo funcional a base de células	NT	NT	NT	NT	113	106	90
HP-SEC %							
Especies de alto peso molecular	0,21	0,27	0,17	0,37	0,37	0,46	0,51
Monómero	99,8	99,7	99,8	99,5	99,5	99,3	99,3
Picos de elución tardía	NQ	0,05	NO	0,13	<QL	<QL	<QL

HP-SEC [%]							
Especies de alto peso molecular	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0,47
Monómero	NT	NT	NT	NT	NT	NT	99,2
Picos de elución tardía	NT	NT	NT	NT	NT	NT	0,36
HIAC [partículas/mL]							
2 mm	1646	2307	2759	2240	5752	923	4491
5 mm	199	343	524	240	1352	265	1733
10 mm	15	96	136	30	275	48	585
25 mm	0	3	4	1	15	0	11
CE-SDS (no reducida) [%]							
Pureza total	NT	NT	NT	NT	NT	NT	96,6
CE-SDS (reducida) %							
Pureza total	NT	NT	NT	NT	NT	NT	96,6
ND - No detectado; NQ - No cuantificado; NT - No ensayado; QL – límite de cuantificación; QL = 0,25%; 5C: 5°C (± 3°C)							

Tabla 8

Condición de almacenamiento	25H				
	Intervalo de prueba de estabilidad (meses)				
LotE	Inicial	1 M	3 M	6 M	12 M
Prueba					
Ensayo - UV (A280nm) [mg/mL]	94,1	98,0	98,2	96,0	92,9
HP-IEX [%]					
Variantes ácidas	8,1	9,1	10,9	14,5	20,0
Pico 1 ácido	8,3	9,4	11,2	13,6	16,8
Pico principal previo					
Pico principal	66,0	64,3	61,8	56,8	49,5
Pico principal posterior					
Pico 1 básico	9,5	9,6	9,9	9,5	7,7
Pico 2 básico	4,3	4,1	2,3	1,8	0,9
Variantes básicas	3,3	3,4	3,5	3,8	3,9
Otros	0,5	ND	ND	ND	1,1
ELISA de unión Potencia relativa al control [%]	112	NT	NT	99	NT
ELISA de unión Potencia relativa al control [%]	NT	NT	NT	NT	105
Potencia biológica por ensayo funcional a base de células	NT	NT	NT	NT	103
HP-SEC [%]					
Especies de alto peso molecular	0,21	0,51	0,49	1,19	1,87
Monómero	99,8	99,4	99,1	98,3	97,6
Especie de bajo peso molecular	NQ	0,12	0,43	0,50	0,86

ND - No detectado; NT - No ensayado; NQ - No cuantificado; 25H:25°C/60% de humedad relativa

Tabla 9

Condición de almacenamiento	RH4			
	Intervalo de prueba de estabilidad (meses)			
Lote E	Inicial	1 M	3 M	6 M
Prueba				
Ensayo - UV (A280nm) [mg/mL]	94,1	94,9	98,4	95,5
HP-IEX [%]				
Variantes ácidas	8,1	18,5	36,3	56,7
Pico 1 ácido	8,3	15,1	19,4	16,5
Pico principal previo				
Pico principal	66,0	51,6	32,6	16,9
Pico principal posterior				
Pico 1 básico	9,5	8,8	7,3	5,5
Pico 2 básico	4,3	1,7	0,4	ND
Variantes básicas	3,3	3,6	4,1	4,4
Otros	0,5	0,7	ND	ND
ELISA de unión Potencia relativa al control [%]	112	NT	NT	104
HP-SEC [%]				
Especies de alto peso molecular	0,21	1,39	1,66	4,86
Monómero	99,8	98,1	96,7	92,7
Especie de bajo peso molecular	NQ	0,51	1,60	2,44
ND- No detectado; NQ- No cuantificado; NT - No ensayado; RH4:40°C/75% de humedad relativa				

5 La Tabla 10 enumera las secuencias en el listado de secuencias.

Tabla 10

Identificadores de secuencia	
SEQ ID NO:	Descripción
1	hum13B8-b HC
2	hum13B8-b LC
3	13B8-b CDRH1
4	13B8-b CDRH2
5	13B8-b CDRH3
6	13B8-b CDRL1
7	13B8-b CDRL2
8	13B8-b CDRL3
9	IL-23p 19 humana
10	hum13B8-b HC ADN

11	hum13B8-b LC ADN
12	Secuencia señal de cadena pesada
13	Secuencia señal de cadena liviana

Listado de secuencias

<110> MERCK SHARP & DOHME CORP.
Kashi, Ramesh
Badkar, Aniket

<120> Formulaciones en solución de anticuerpos anti-IL-23p19 manipulados por ingeniería

<130> 23364

<150> US 61/737,035

<151> 2012-12-13

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 446

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Marcos humanos, CDR de roedores

<220>

<221> DOMINIO

<222> (1)..(116)

<223> Dominio variable

<400> 1

ES 2 732 861 T3

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

 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr
 20 25 30

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

 Gly Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

 Glu Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

 Ala Arg Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

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

Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
 130 135 140

Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
 145 150 155 160

Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
 165 170 175

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
 180 185 190

Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
 210 215 220

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 225 230 235 240

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 245 250 255

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
 260 265 270

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
 275 280 285

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
 290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
 305 310 315 320

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
 325 330 335

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
 340 345 350

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
 355 360 365

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly

ES 2 732 861 T3

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

- <210> 3
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 3

Gly Tyr Ile Phe Ile Thr Tyr Trp Met Thr
 1 5 10

- <210> 4
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Secuencia artificial

- <220>
- <223> CDR de roedor con una sustitución de aminoácido
- <400> 4

Gln Ile Phe Pro Ala Ser Gly Ser Ala Asp Tyr Asn Glu Lys Phe Glu
 1 5 10 15

Gly

- <210> 5
- <211> 7
- <212> PRT
- <213> Mus musculus
- <400> 5

ES 2 732 861 T3

Gly Gly Gly Gly Phe Ala Tyr
1 5

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 6

Arg Thr Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 7

Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu
1 5

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

Gln His His Tyr Gly Ile Pro Phe Thr
1 5

<210> 9
<211> 170
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

Arg Ala Val Pro Gly Gly Ser Ser Pro Ala Trp Thr Gln Cys Gln Gln
1 5 10 15

Leu Ser Gln Lys Leu Cys Thr Leu Ala Trp Ser Ala His Pro Leu Val
20 25 30

Gly His Met Asp Leu Arg Glu Glu Gly Asp Glu Glu Thr Thr Asn Asp
35 40 45

Val Pro His Ile Gln Cys Gly Asp Gly Cys Asp Pro Gln Gly Leu Arg
50 55 60

Asp Asn Ser Gln Phe Cys Leu Gln Arg Ile His Gln Gly Leu Ile Phe
65 70 75 80

ES 2 732 861 T3

gtggtggacg tgagccacga agaccctgag gtcaagttca actggtacgt ggacggcgtg 900
gaggtgcata atgccaaagac aaagccgagg gaggagcagt acaacagcac gtaccgtgtg 960
gtcagcgtcc tcaccgtcct gcaccaggac tggctgaatg gcaaggagta caagtgcaag 1020
gtctccaaca aagccctccc agccccatc gagaaaacca tctccaaagc caaagggcag 1080
ccccgagaac cacaggtgta caccctgcc ccatcccggg atgagctgac caagaaccag 1140
gtcagcctga cctgcctggt caaaggcttc tatcccagcg acatcgccgt ggagtgggag 1200
agcaatgggc agccggagaa caactacaag accacgcctc ccgtgctgga ctccgacggc 1260
tccttcttcc tctacagcaa gctcaccgtg gacaagagca ggtggcagca ggggaacgtc 1320
ttctcatgct ccgtgatgca tgaggctctg cacaaccact acacgcagaa gagcctctcc 1380
ctgtctccgg gtaaatga 1398

<210> 11
<211> 702
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Regiones constantes y marco humanas, CDR de roedores

<400> 11

atggctccag tgcagctgct ggggctgctg gtgctgttcc tgccagccat gagatgtgat 60
atccagatga cccagtctcc atcctccctg tctgcctctg tgggagacag agtgaccatc 120
acctgcagga ccagcgagaa catctacagc tacctggcct ggtatcagca gaagccaggg 180
aagggcccta agctgctgat ctataacgcc aagaccctgg ctgaaggggt gccatccagg 240
ttcagcggca gcggctctgg gacagacttc accctgacca tcagcagcct gcagcctgag 300
gacttcgcca cctactactg tcagcaccac tacggaattc cattcacctt cgccagggc 360
accaaggtgg agatcaagcg tacggtggct gcaccatctg tgttcattct ccctccatct 420
gatgagcagc tgaagtctgg aactgcctcc gtggtgtgcc tgctgaataa cttctatccc 480
agagaggcca aggtgcagtg gaaggtggat aacgcctcc agagcggcaa ctcccaggag 540
agcgtgacag agcaggacag caaggacagc acctacagcc tgagcagcac cctgaccctg 600
agcaaagcag actacgagaa acacaaggtg tacgcctgag aggtgaccca tcagggcctg 660
agcagccccg tgacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aa 702

<210> 12
<211> 19
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 12

ES 2 732 861 T3

Met Ala Val Leu Gly Leu Leu Phe Cys Leu Val Thr Phe Pro Ser Cys

1 5 10 15

Val Leu Ser

<210> 13

<211> 19

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 13

Met Ala Pro Val Gln Leu Leu Gly Leu Leu Val Leu Phe Leu Pro Ala

1 5 10 15

Met Arg Cys

REIVINDICACIONES

1. Una formulación en solución de anticuerpo hum13B8-b anti-IL-23p19 que comprende:
- 5 a) al menos 50 mg/ml de anticuerpo hum13B8-b anti-IL-23p19;
b) regulador de histidina 10 mM, pH 6,0;
c) 0,05% de polisorbato 80; y
d) 7% de sacarosa,
- 10 en donde dicho anticuerpo hum13B8-b comprende:
- i) un polipéptido de cadena liviana que comprende la secuencia de SEQ ID NO: 2; y
ii) un polipéptido de cadena pesada que comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 1.
- 15 2. La formulación en solución de acuerdo con la reivindicación 1 que comprende al menos 80 mg/ml de anticuerpo hum13B8-b anti-IL-23p19.
3. La formulación en solución de acuerdo con la reivindicación 2, que comprende al menos 100 mg/ml de anticuerpo hum13B8-b anti-IL-23p19.
- 20 4. La formulación en solución de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende 80-120 mg/ml de anticuerpo hum13B8-b anti-IL-23p19.
5. La formulación en solución de acuerdo con la reivindicación 4, que comprende 100 mg/ml de anticuerpo hum13B8-b anti-IL-23p19.
- 25 6. La formulación en solución de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 para uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmune, enfermedad inflamatoria o trastorno proliferativo.
- 30 7. La formulación para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la formulación se administra por vía subcutánea.
8. La formulación para el uso de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la administración subcutánea se realiza mediante inyección usando una jeringa, un autoinyector, un bolígrafo inyector o un dispositivo de inyección sin aguja.
- 35 9. La formulación para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la formulación se administra a intervalos trimestrales.
- 40 10. La formulación para el uso de acuerdo con la reivindicación 6, en donde la enfermedad inflamatoria es psoriasis.

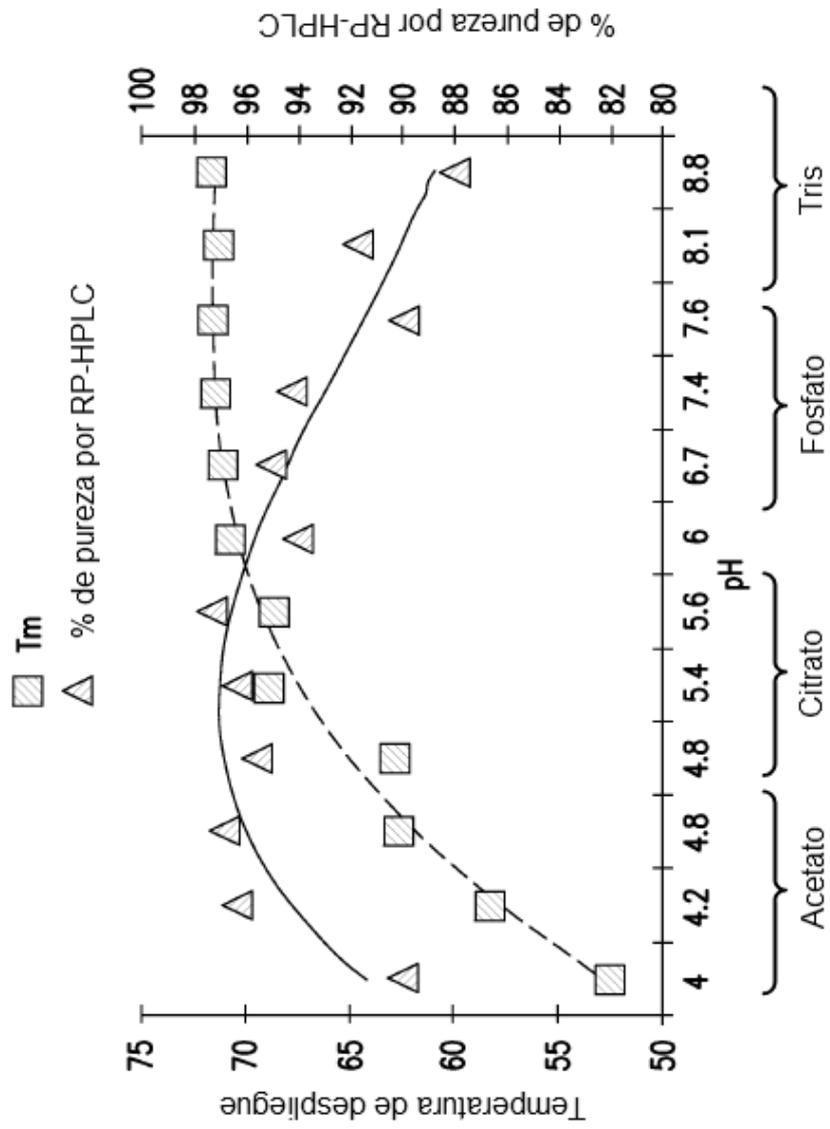


FIG.1A

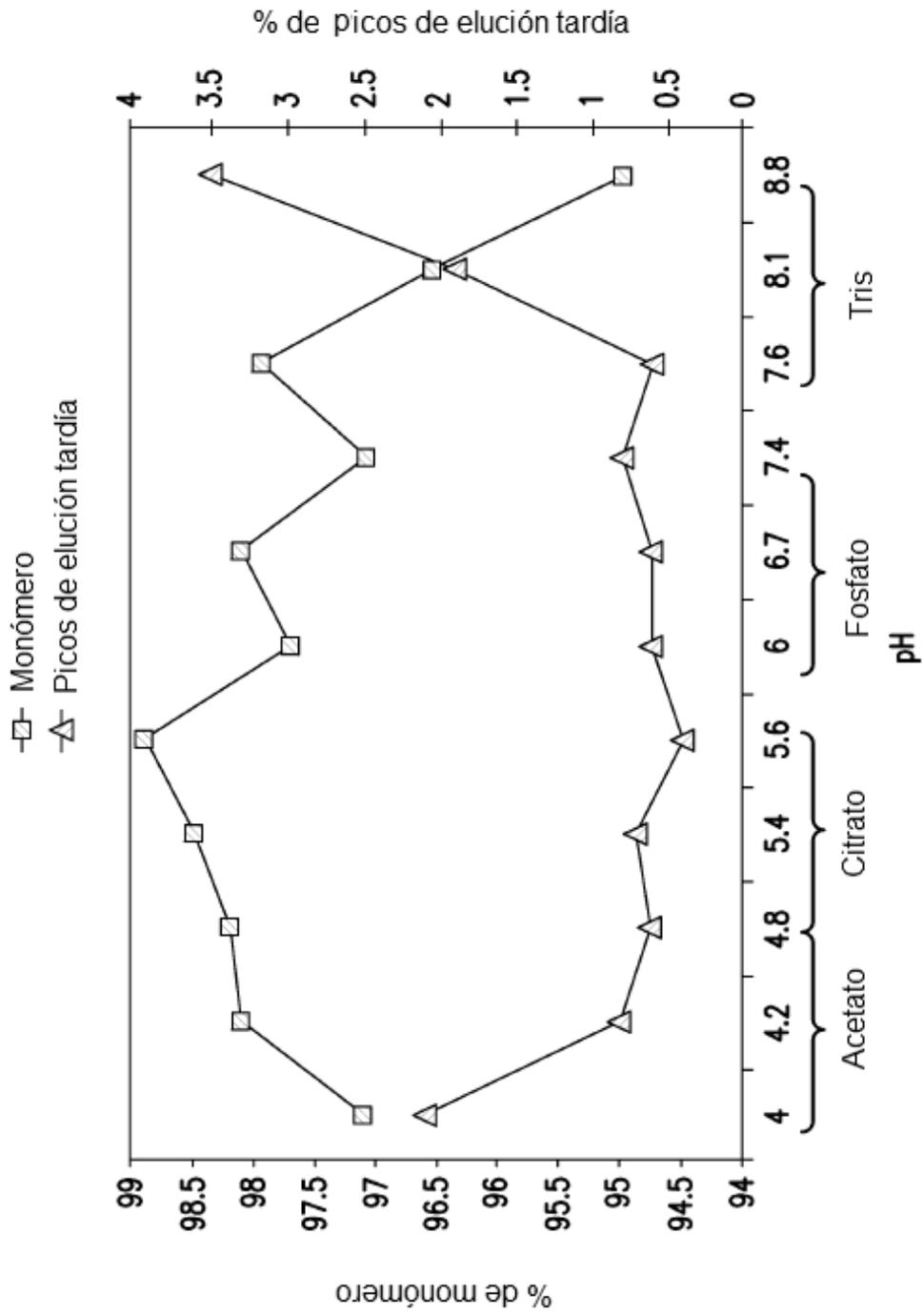


FIG.1B

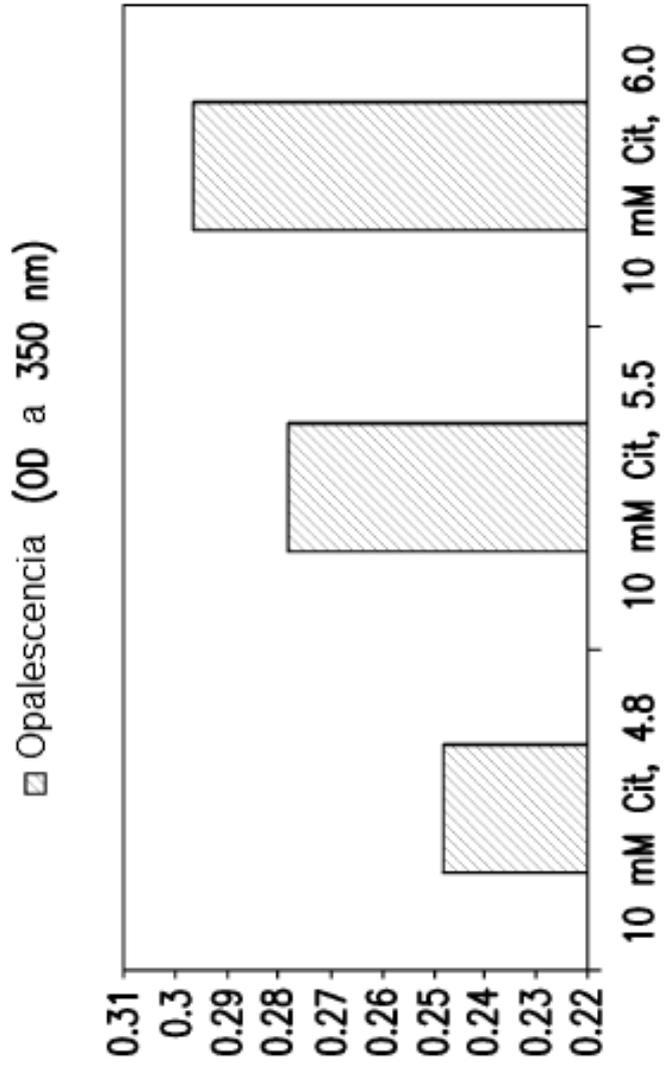


FIG.1C

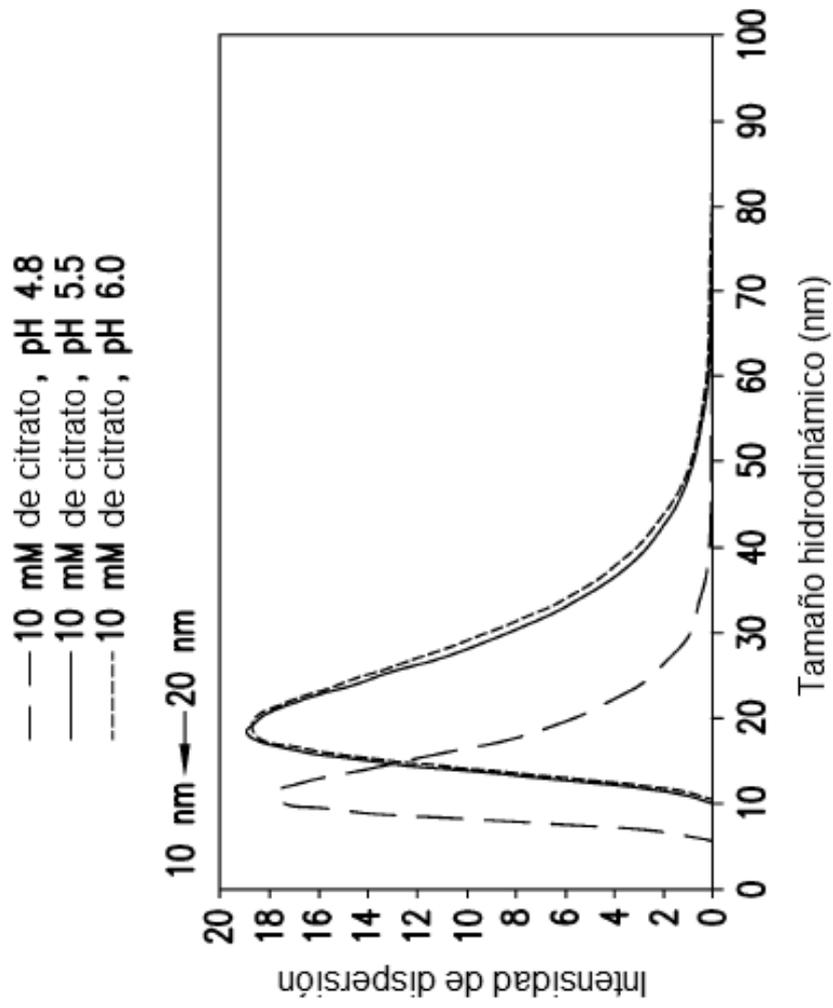
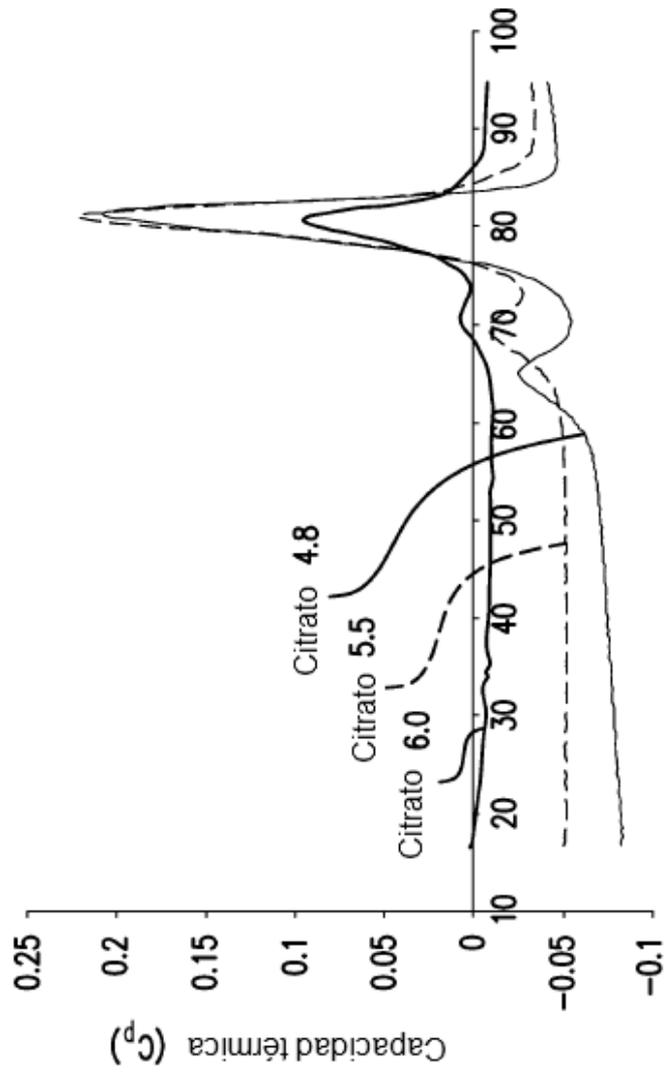


FIG.1D



Temperatura (°C)

FIG.1E

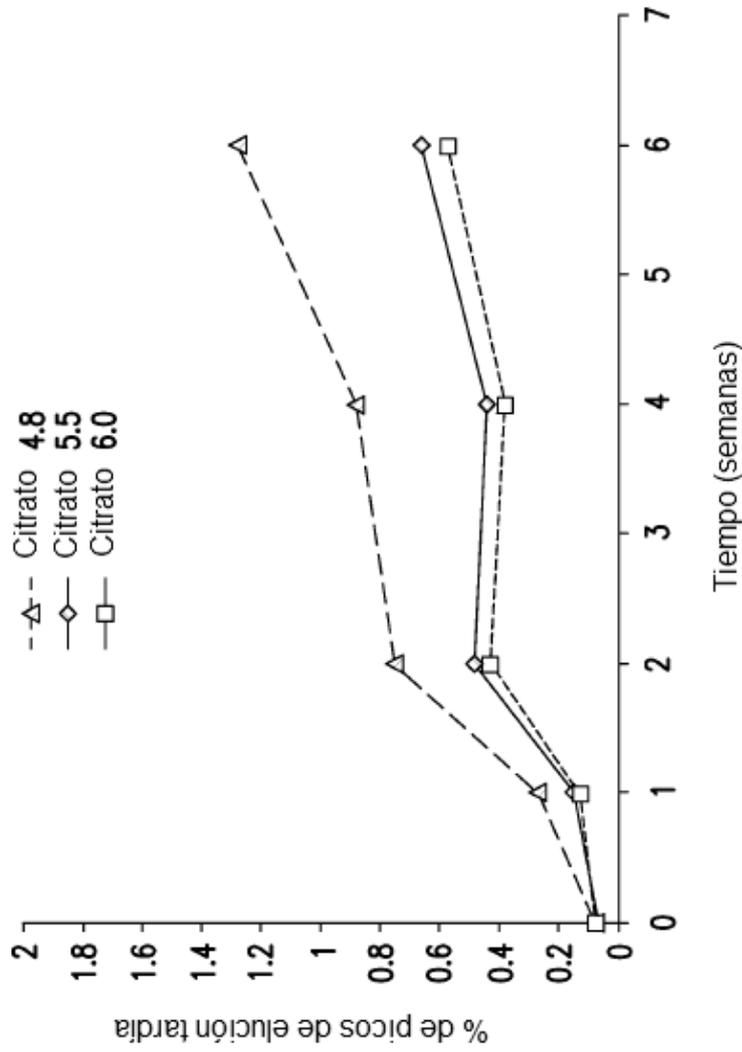


FIG.1F

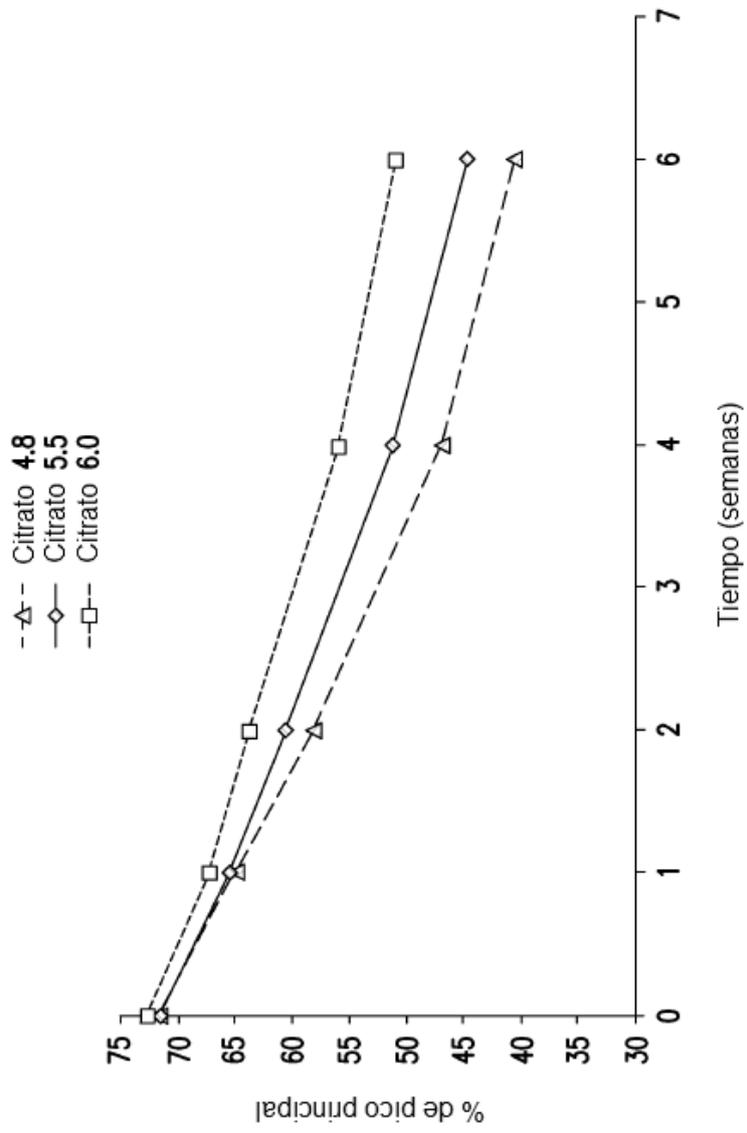


FIG.1G

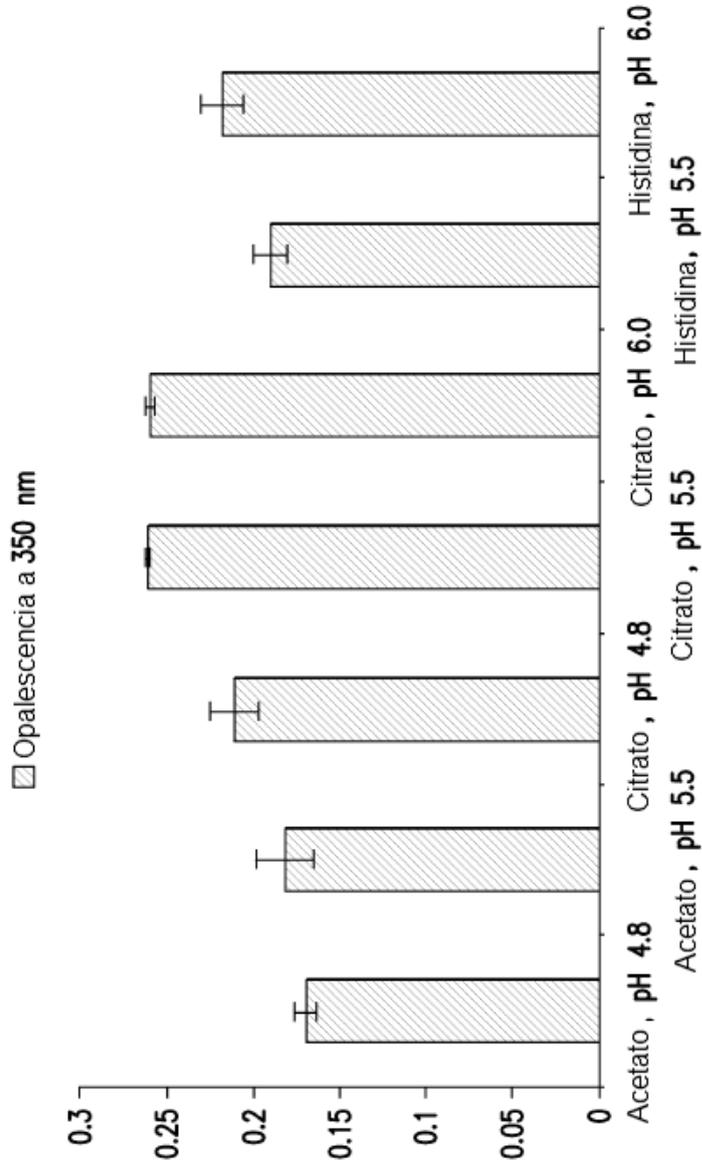


FIG.1H

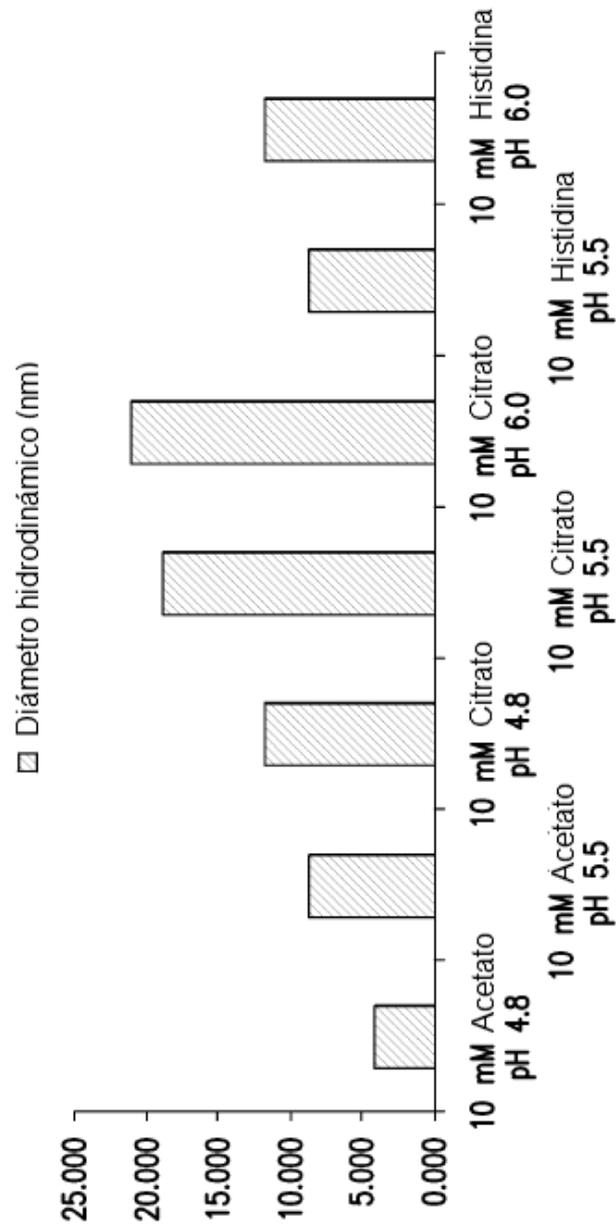


FIG.1I

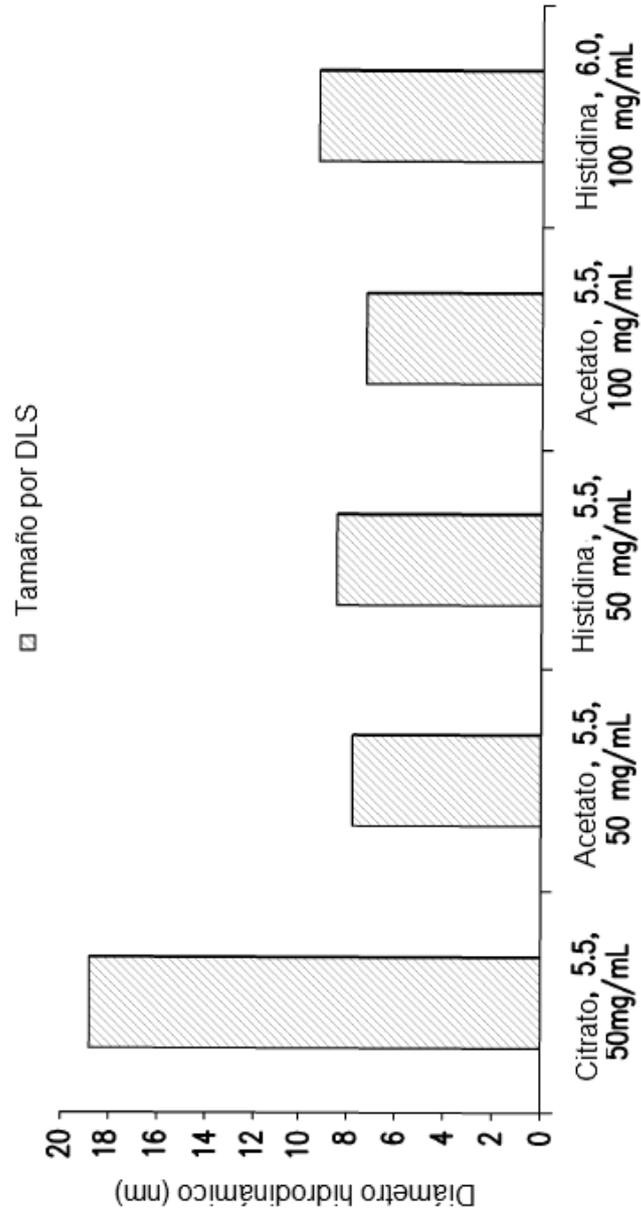


FIG.1J

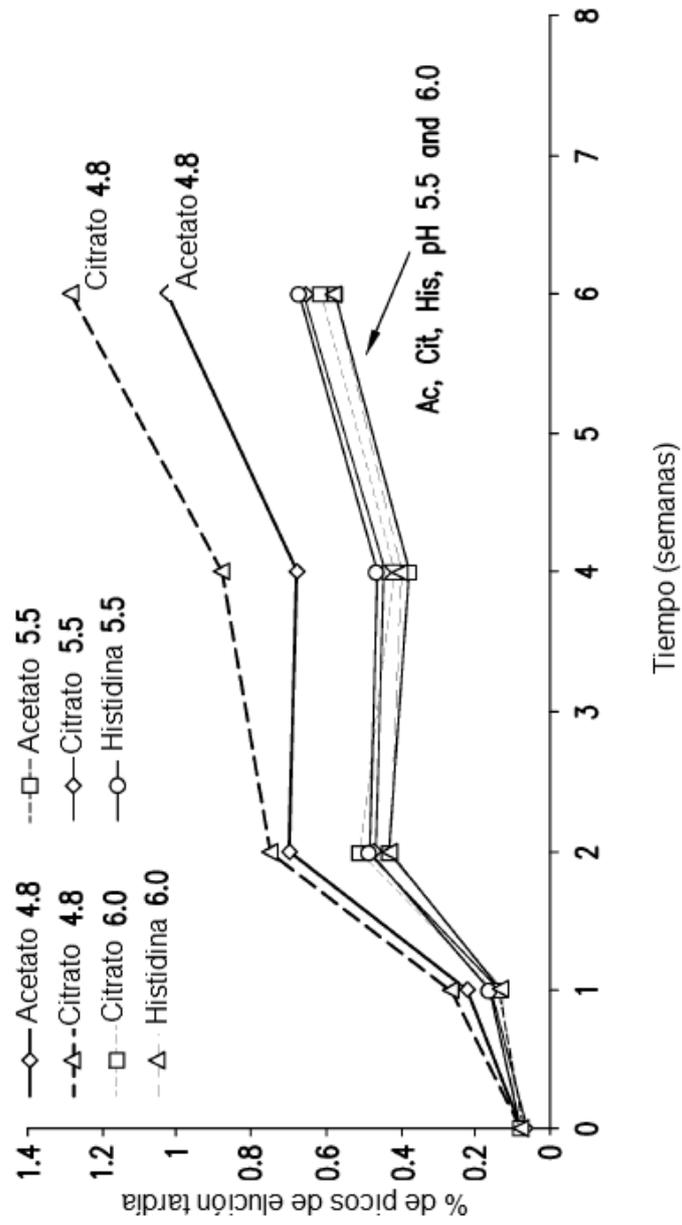


FIG.1K

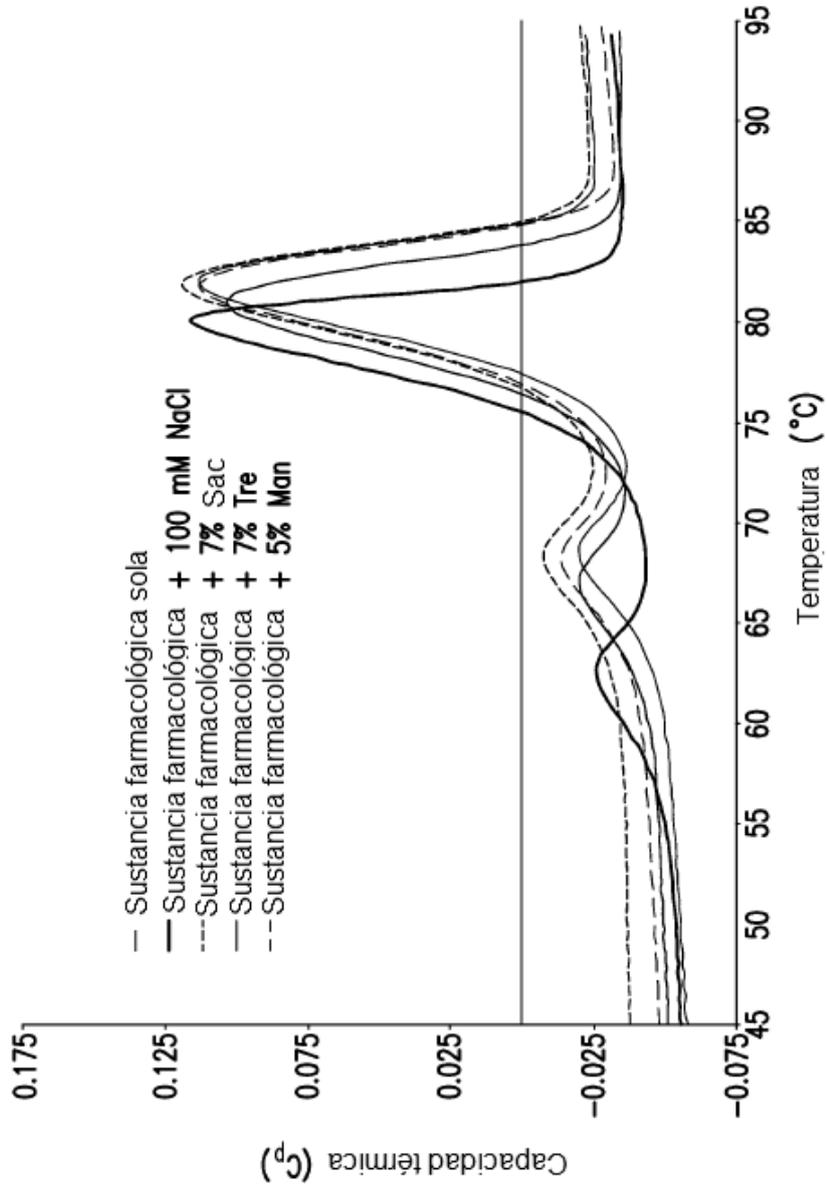


FIG.2A

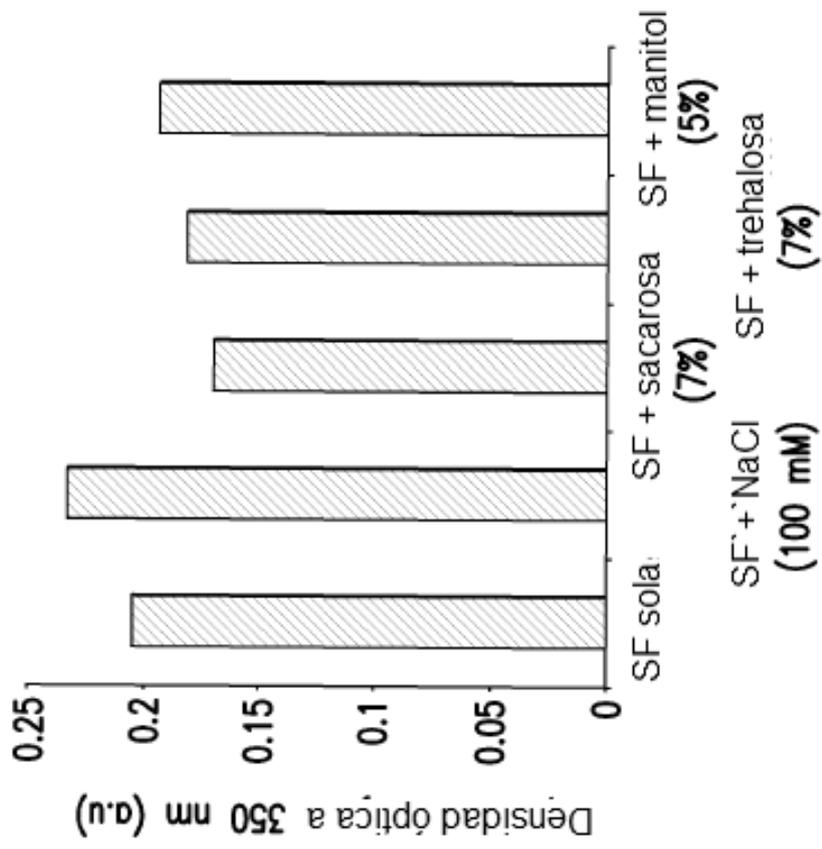


FIG.2B

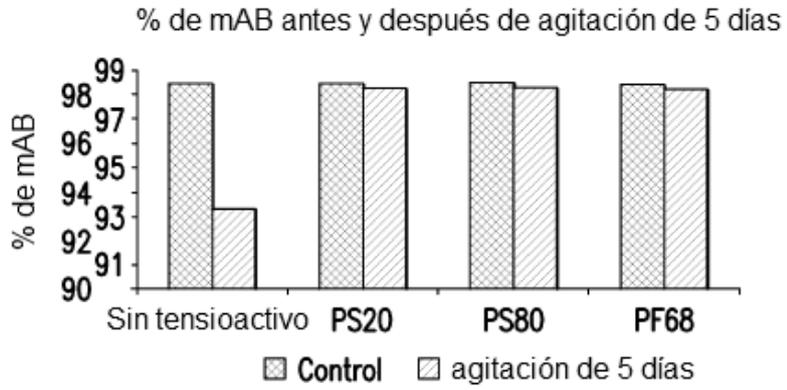


FIG.3A

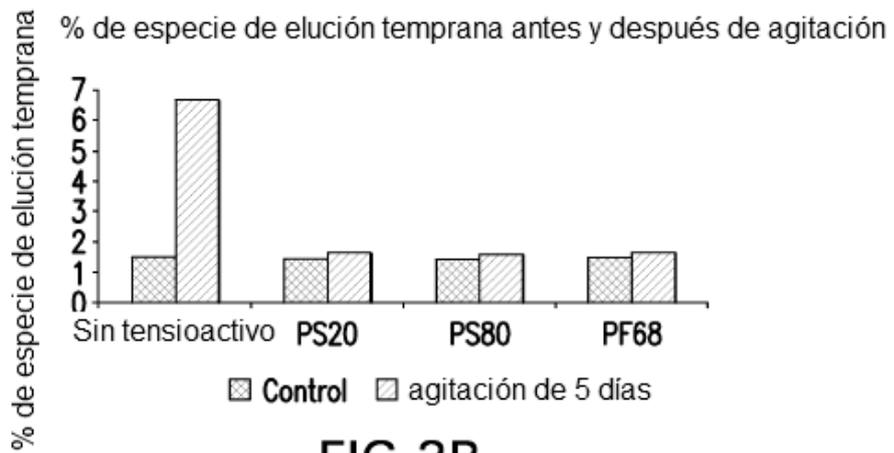


FIG.3B

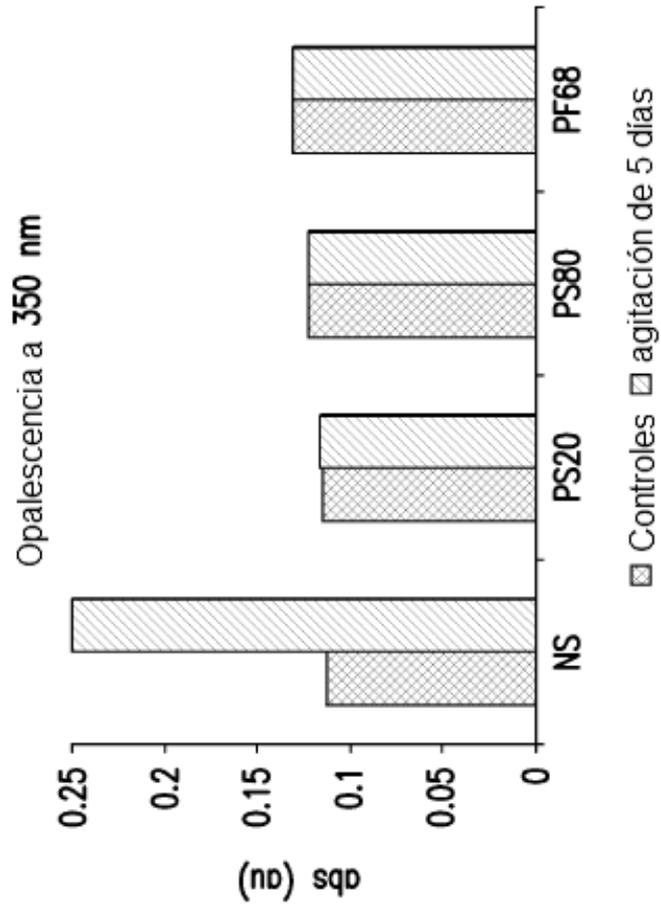


FIG.3C

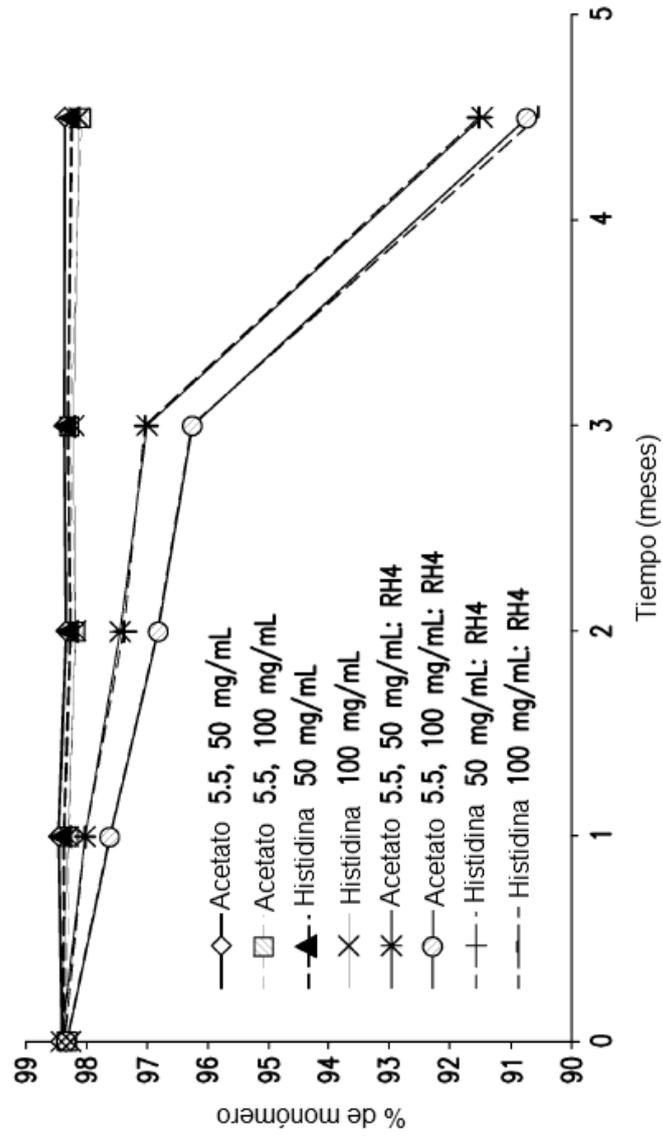


FIG.4A

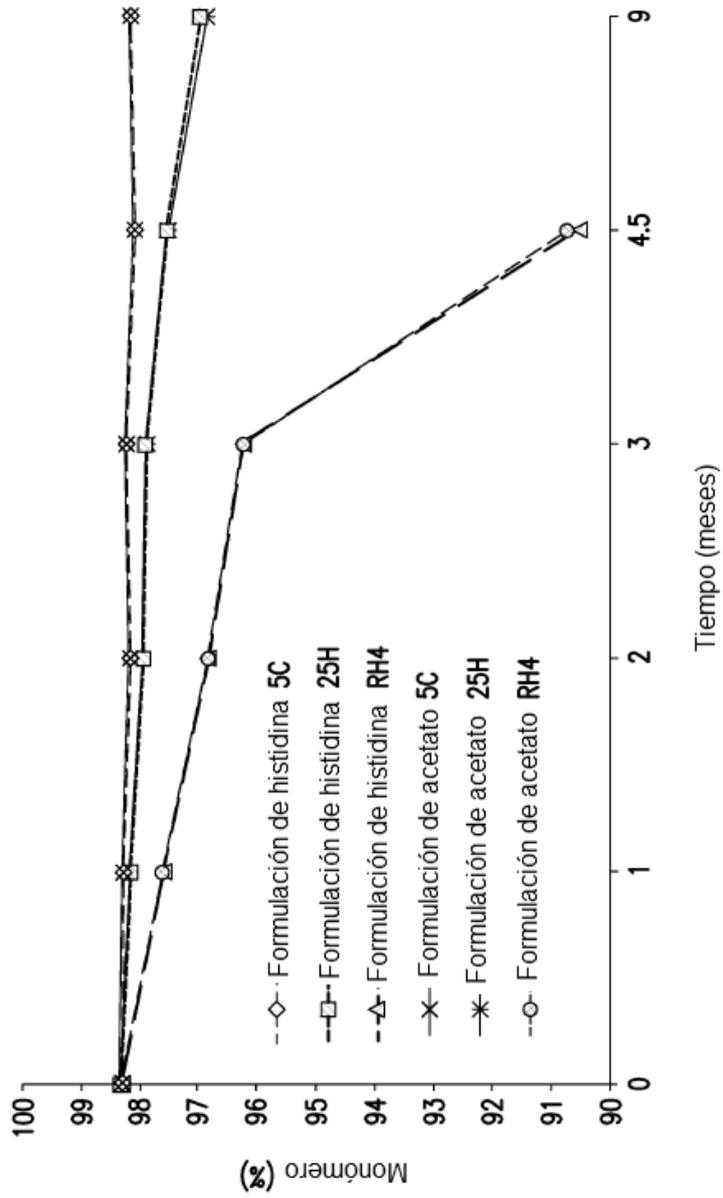


FIG.4B

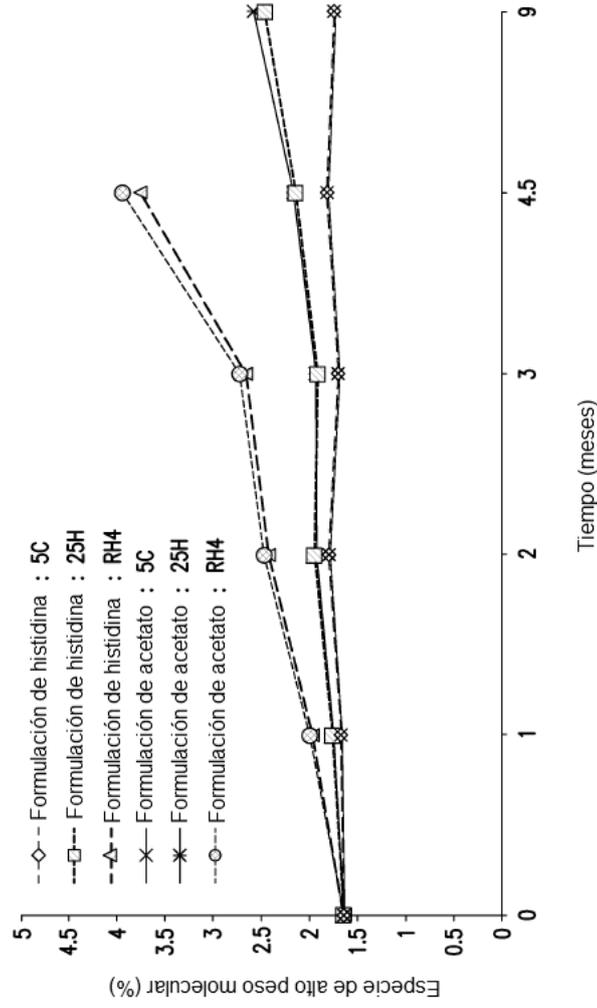


FIG.4C

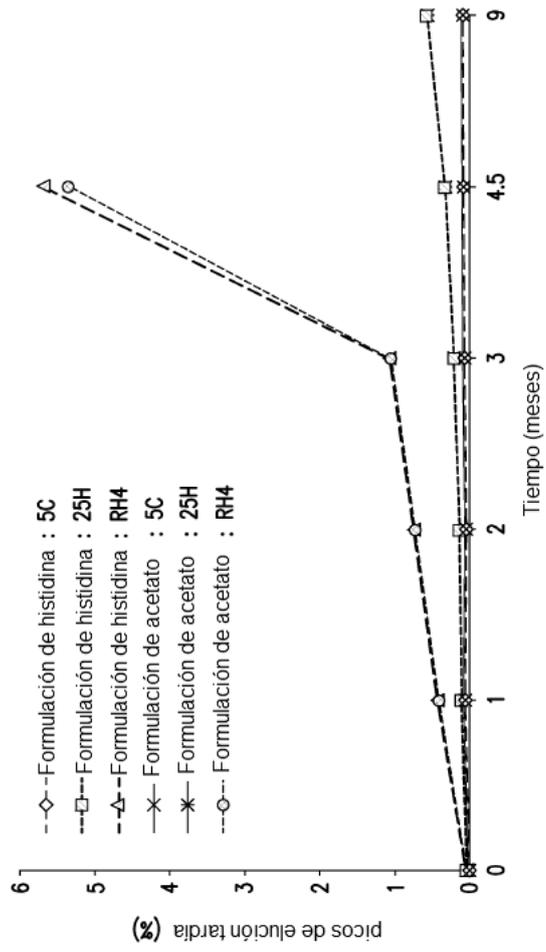


FIG.4D

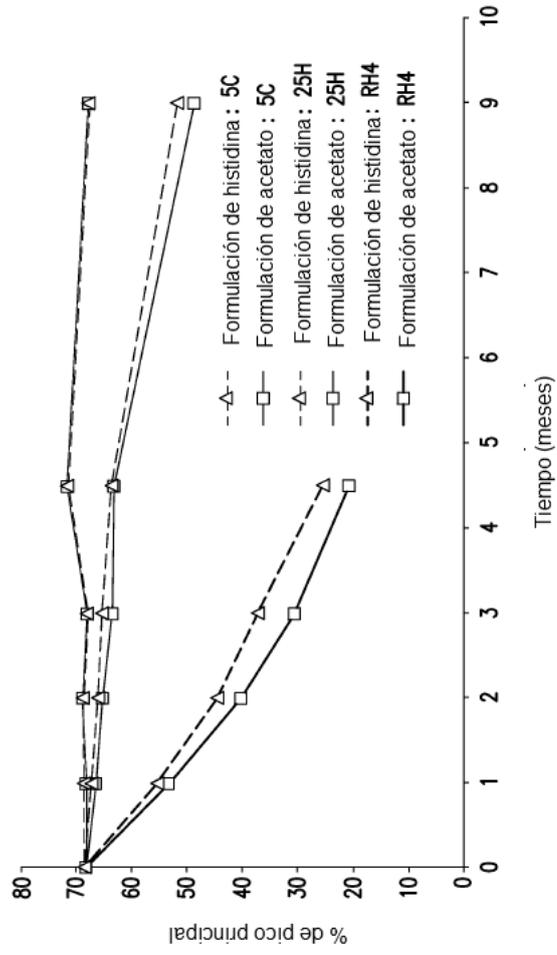


FIG.4E

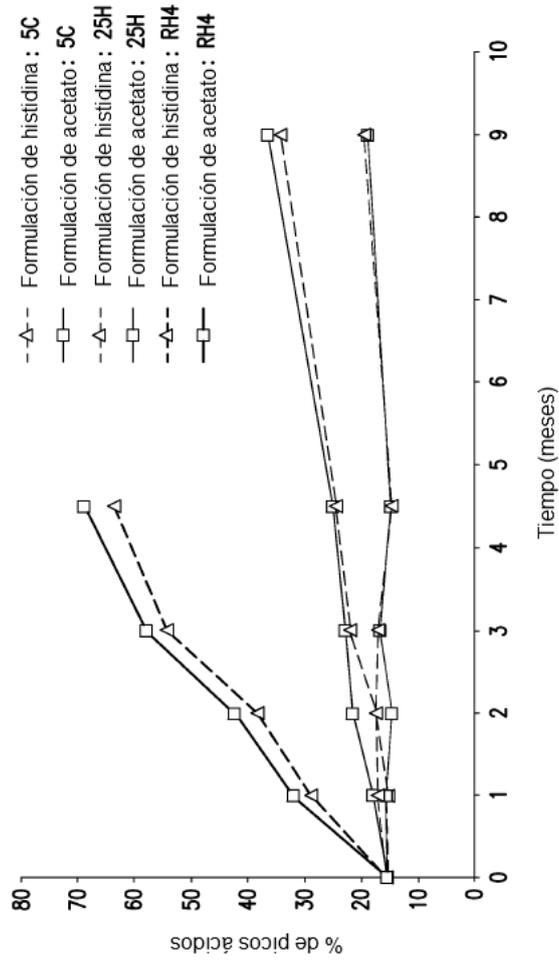


FIG.4F

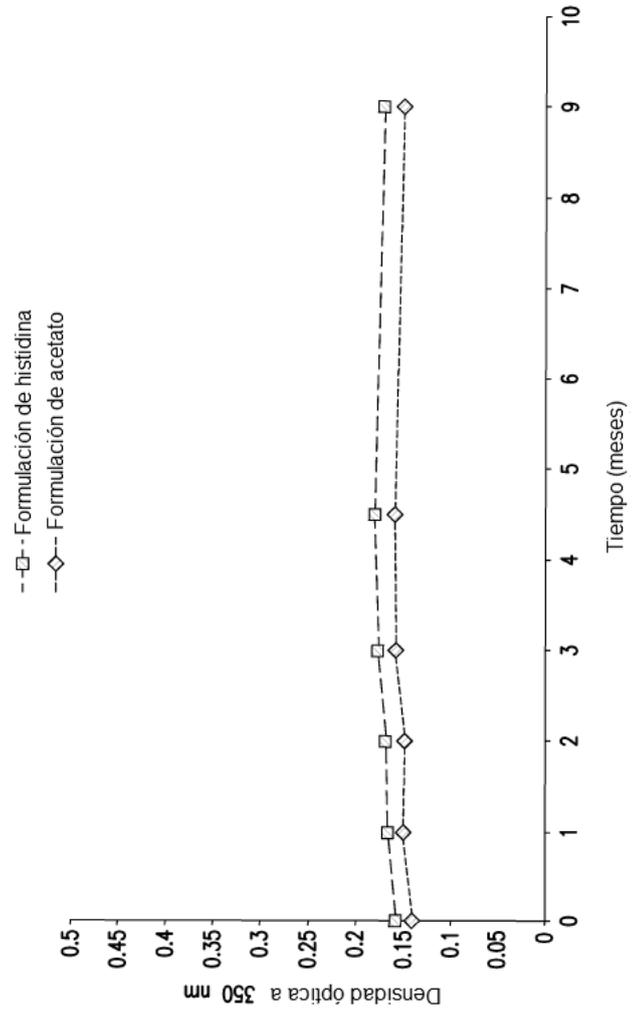


FIG.4G

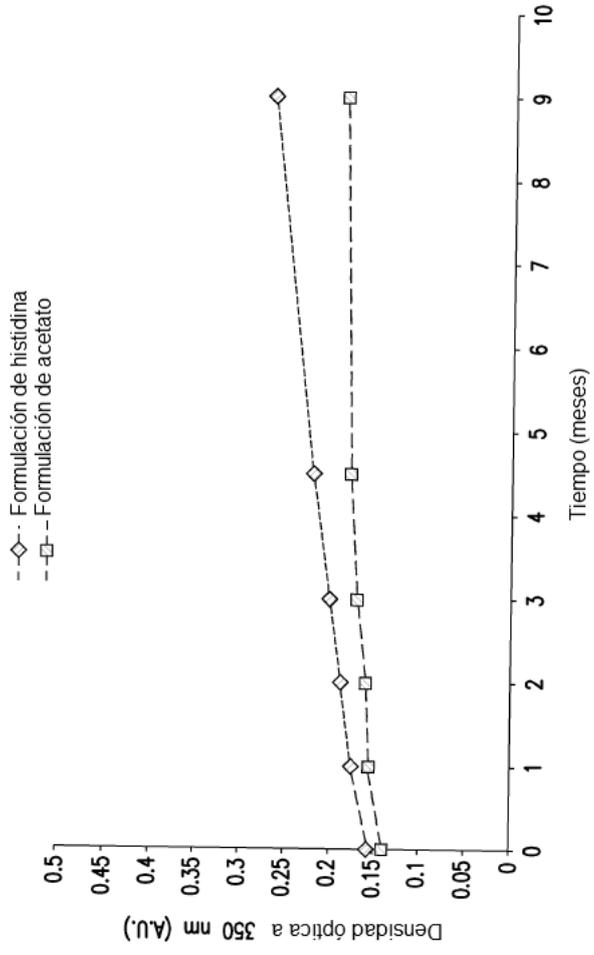


FIG.4H

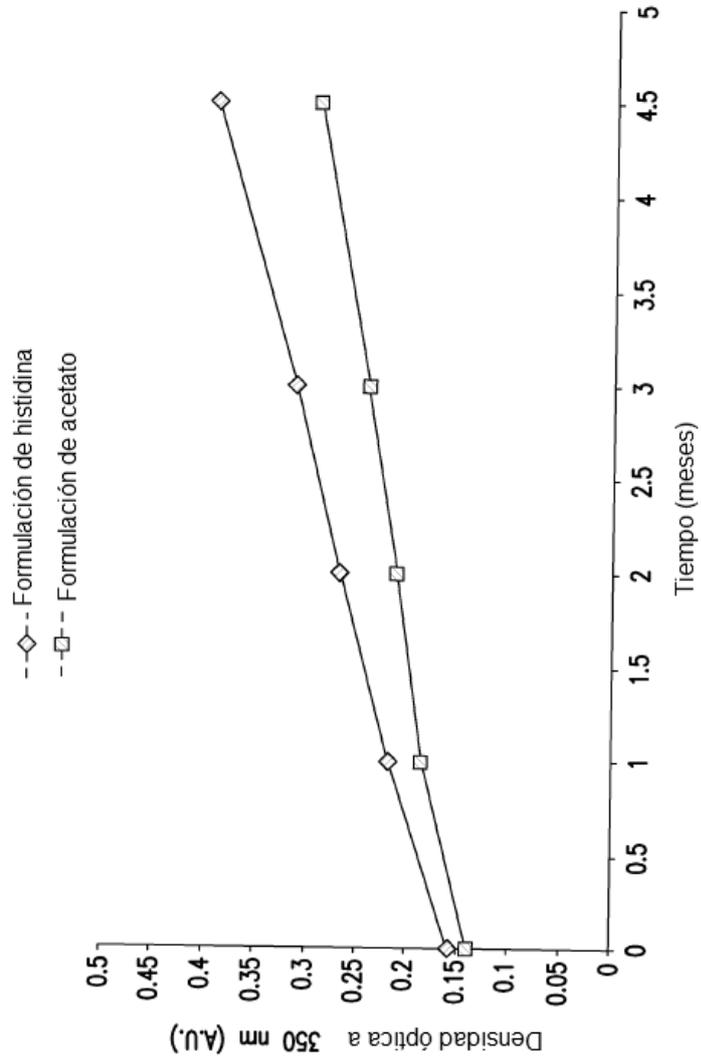


FIG.4I

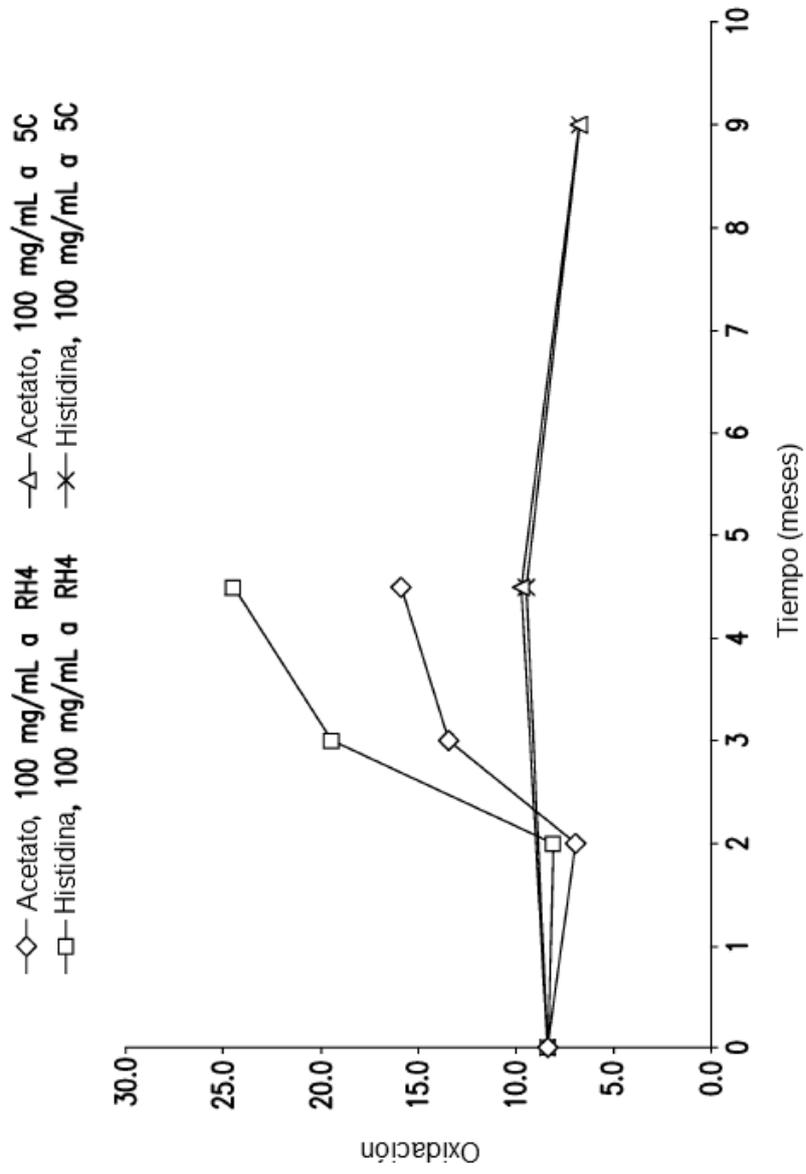


FIG.4J

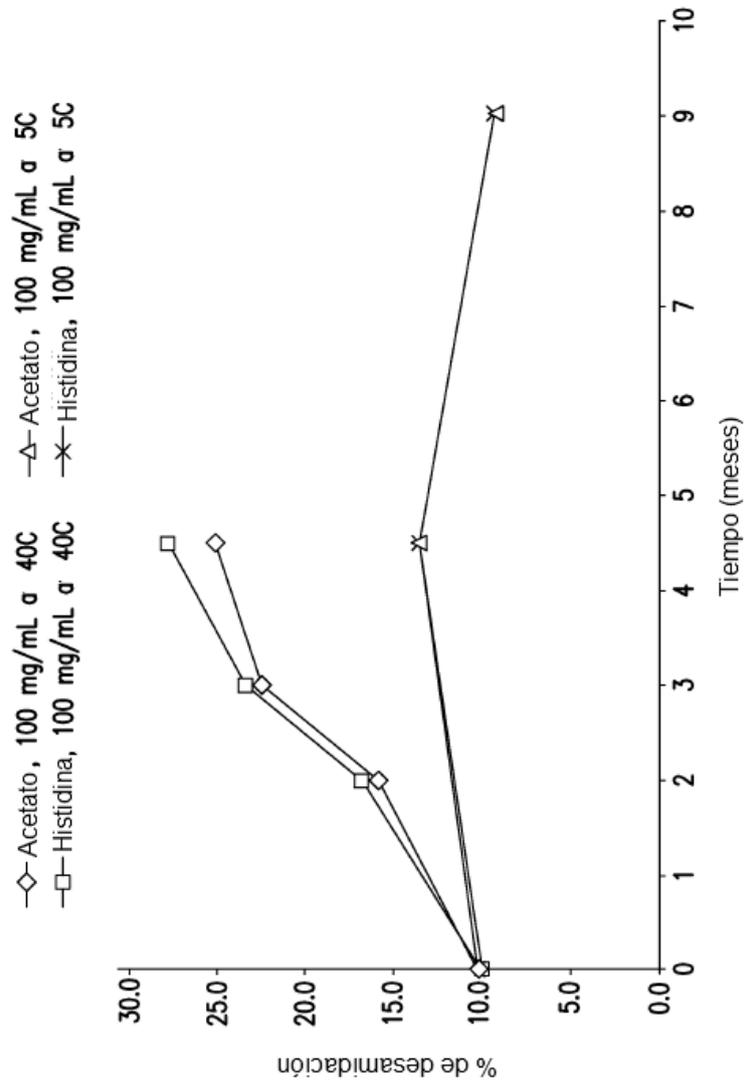


FIG.4K

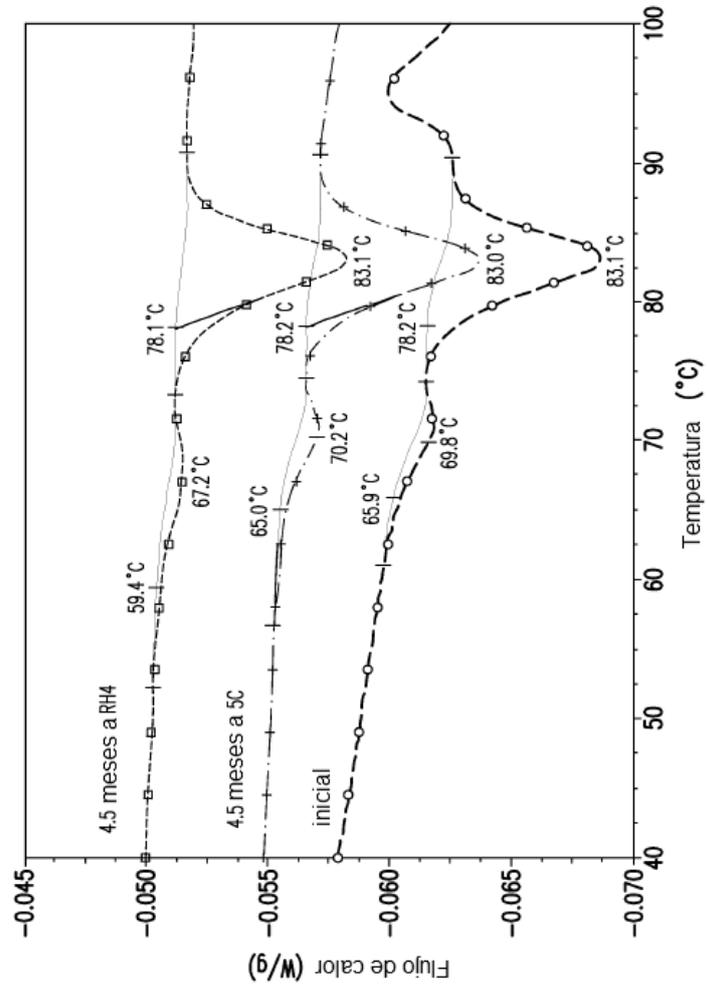


FIG.4L

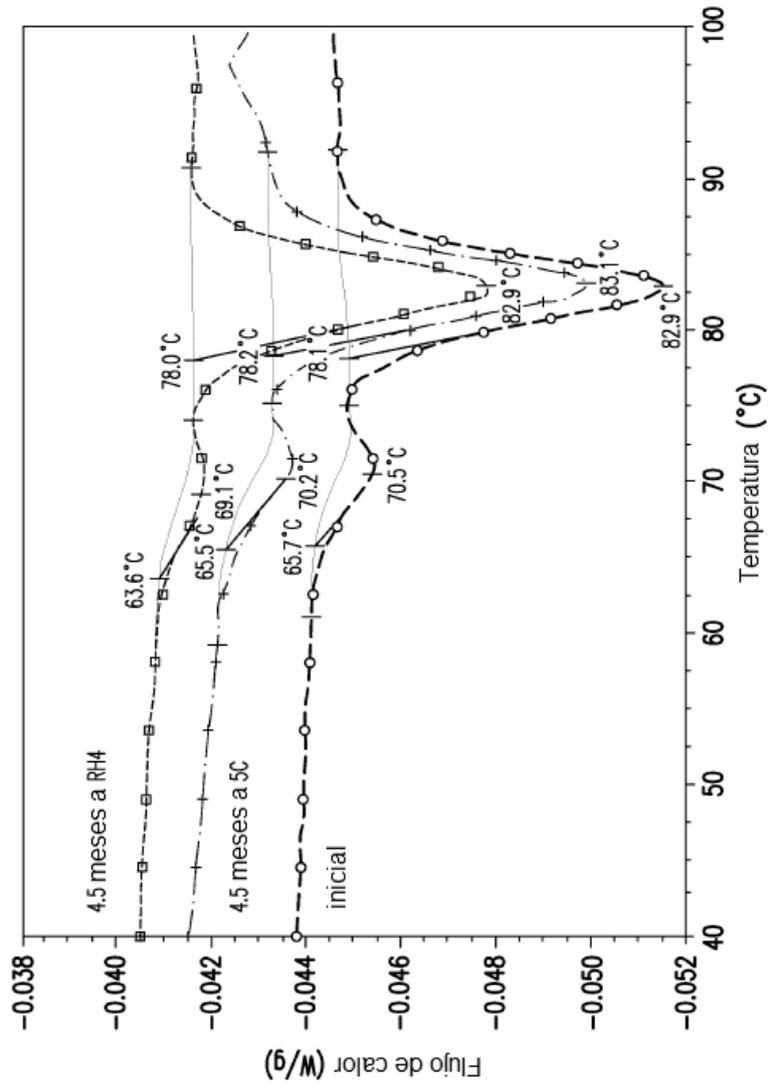


FIG.4M

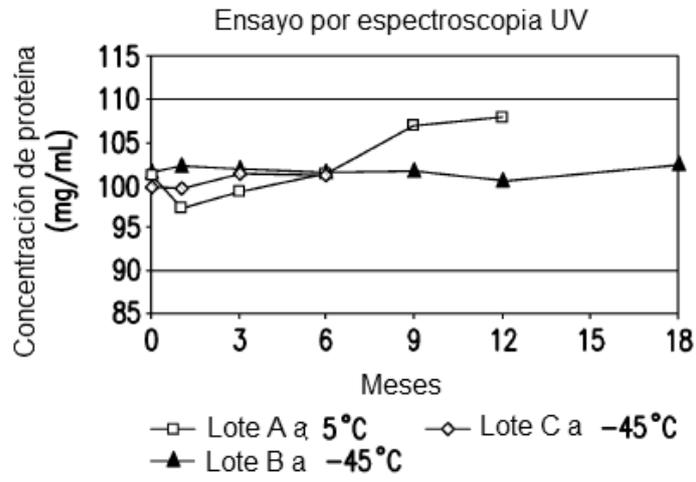


FIG.5A

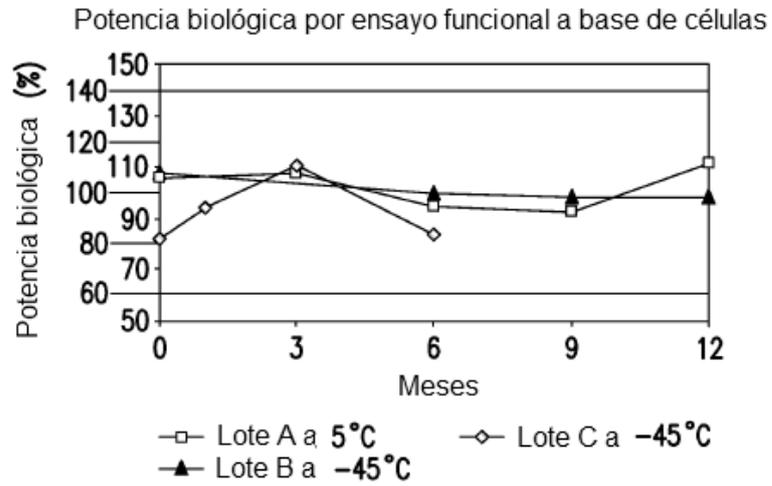


FIG.5B

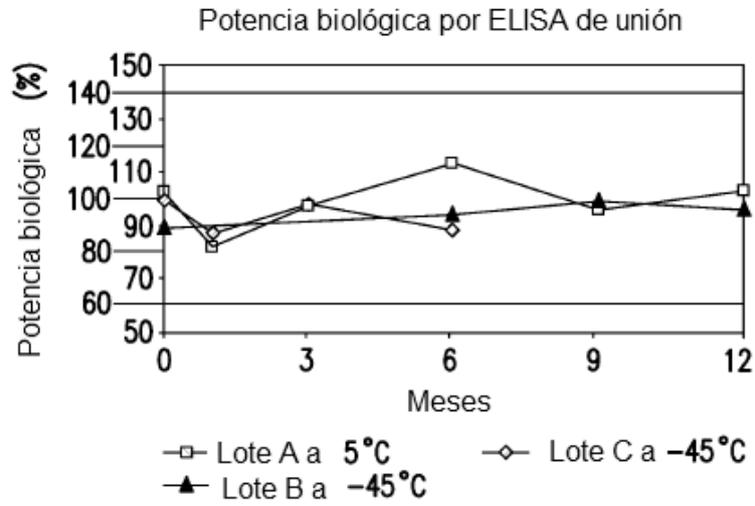


FIG.5C

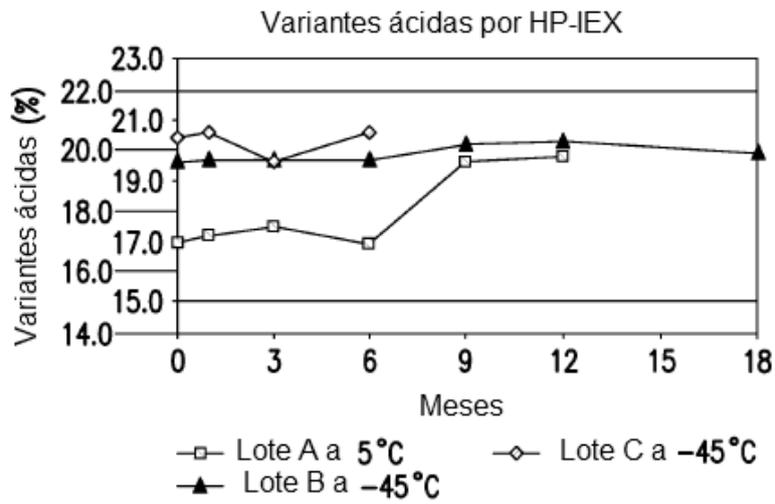


FIG.5D

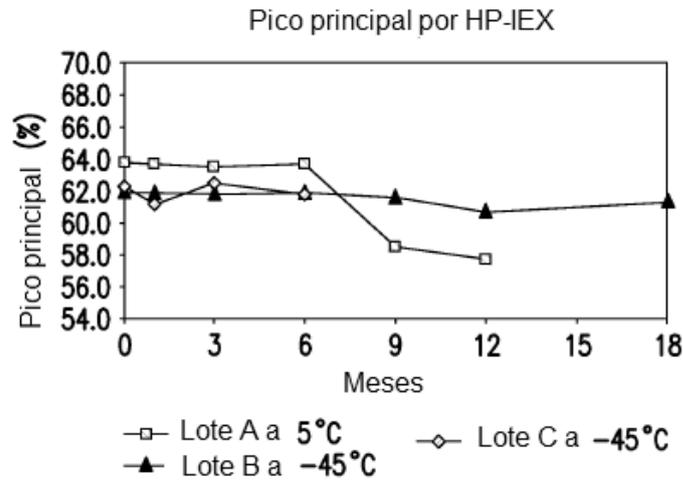


FIG.5E

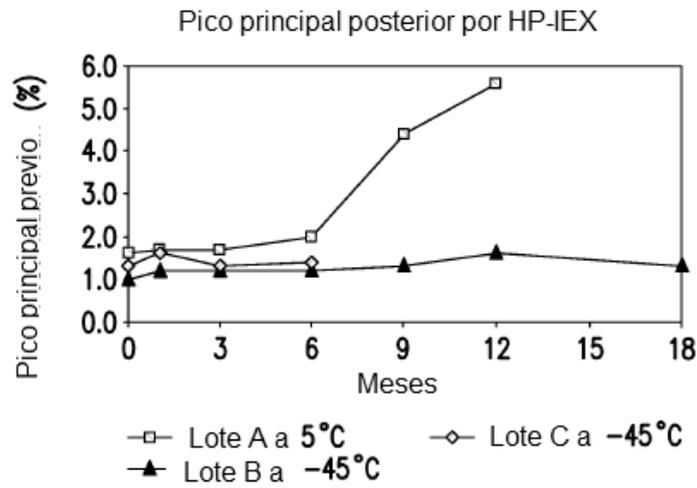


FIG.5F

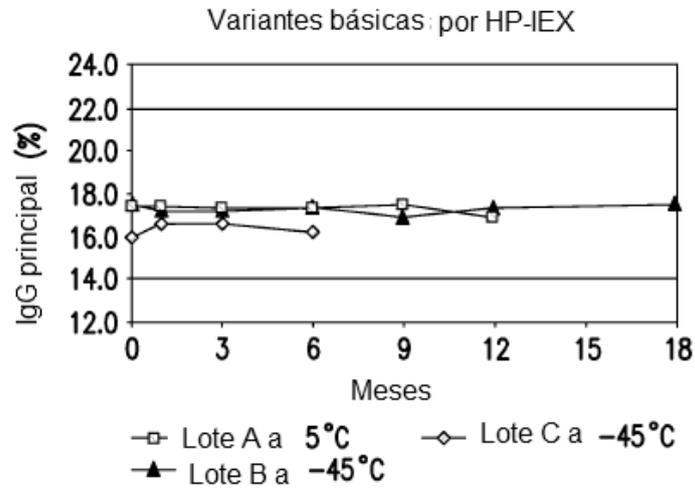


FIG.5G

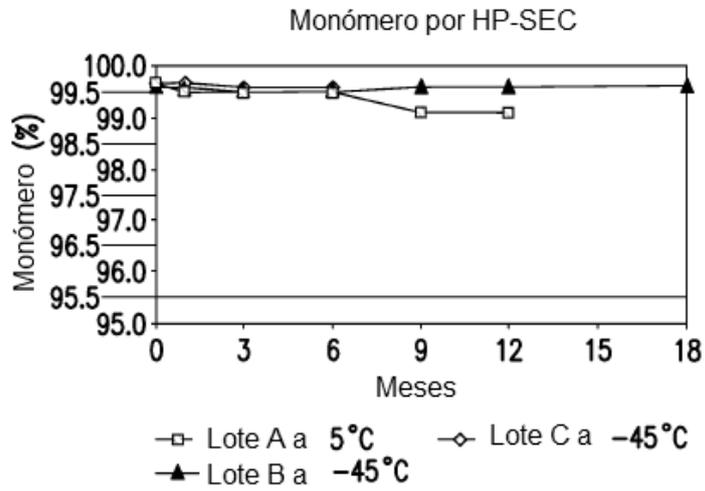


FIG.5H

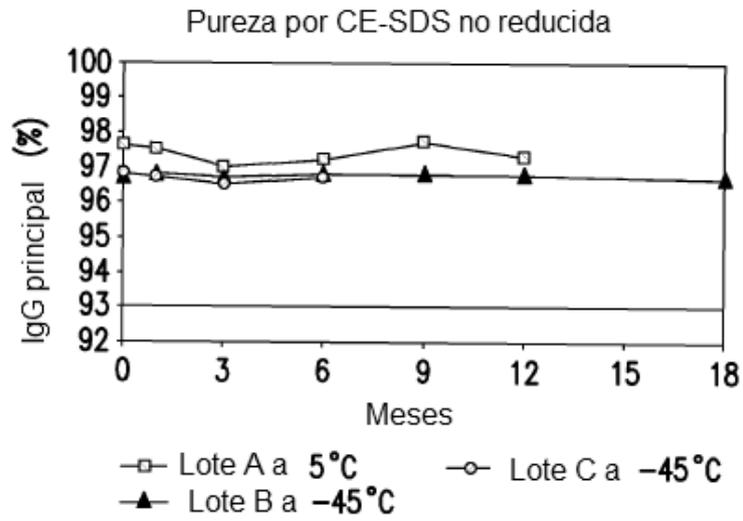


FIG.5I

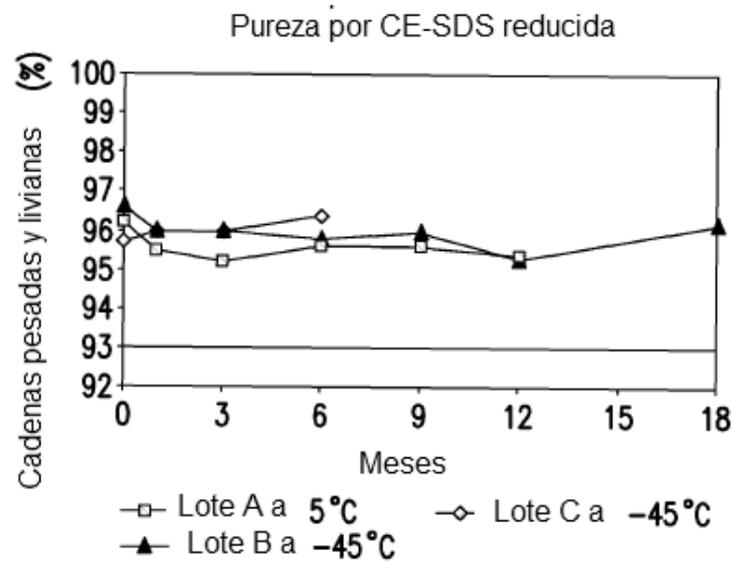


FIG.5J

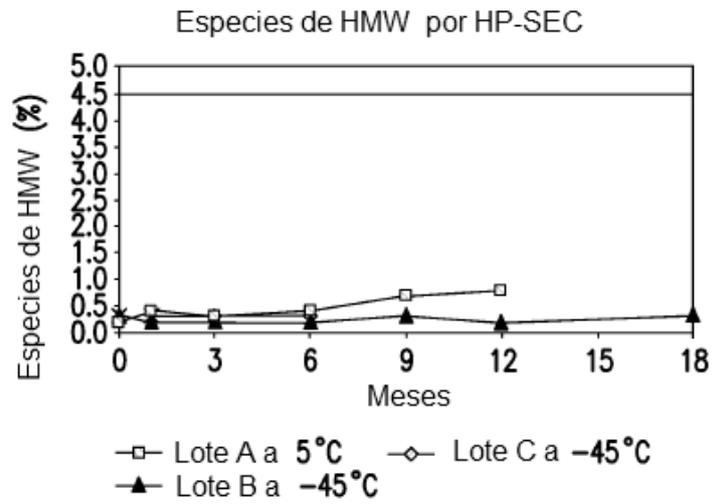


FIG.5K

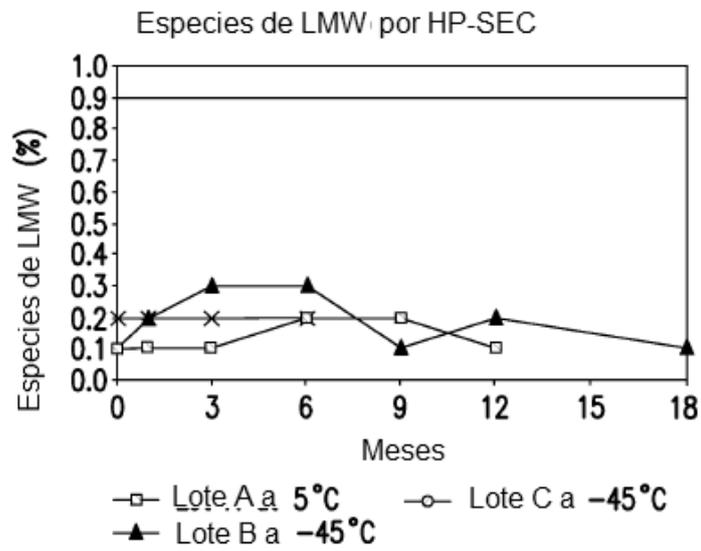


FIG.5L

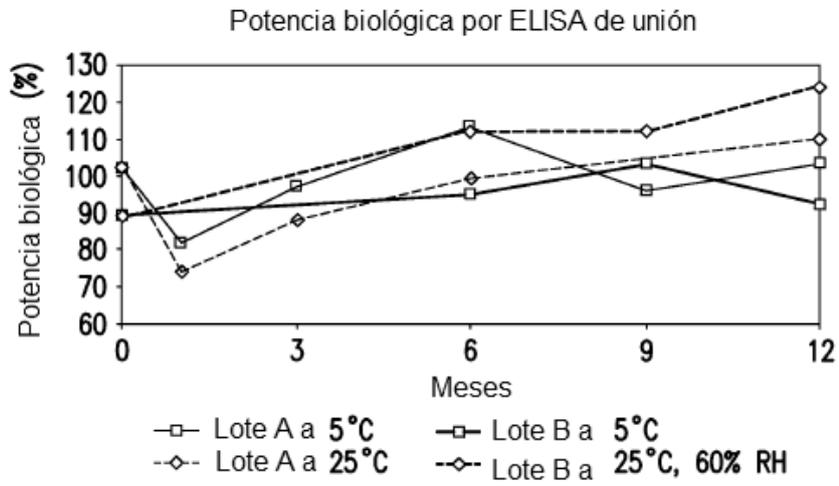


FIG.6A

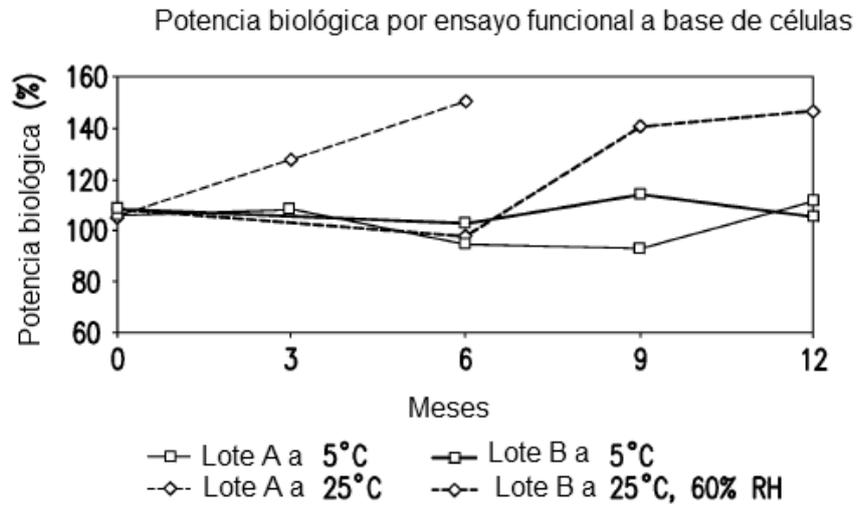


FIG.6B

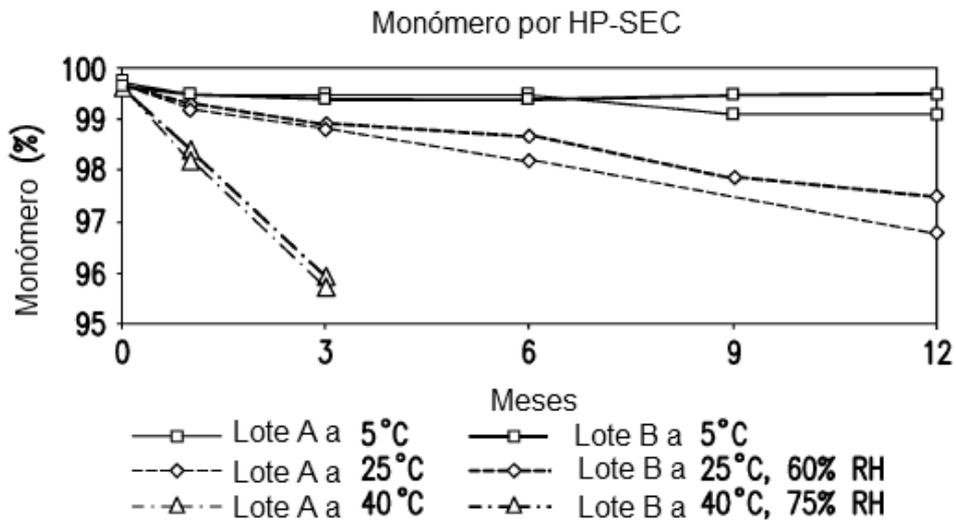


FIG. 6C

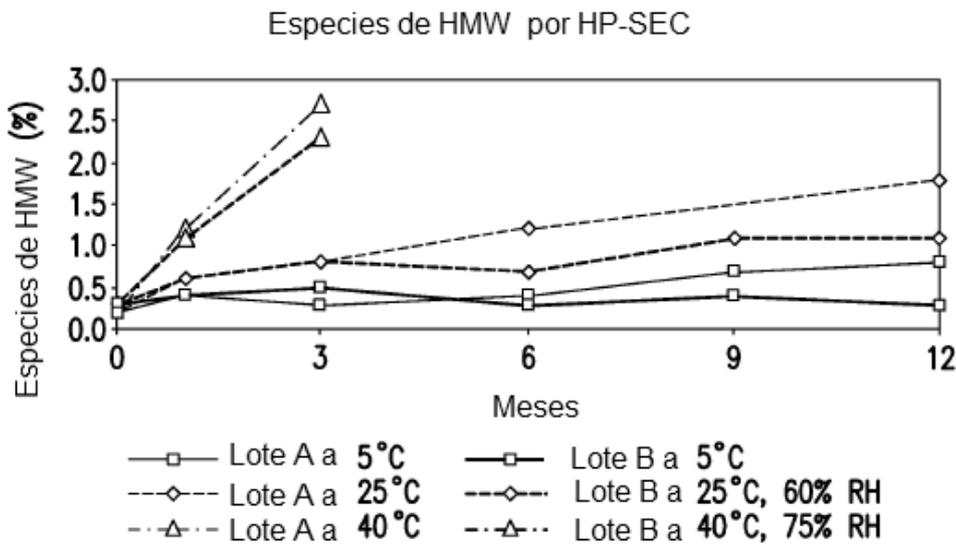


FIG. 6D

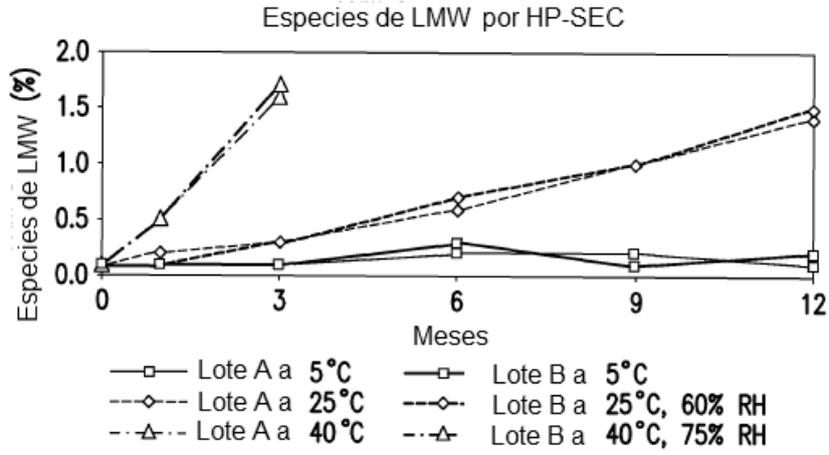


FIG. 6E

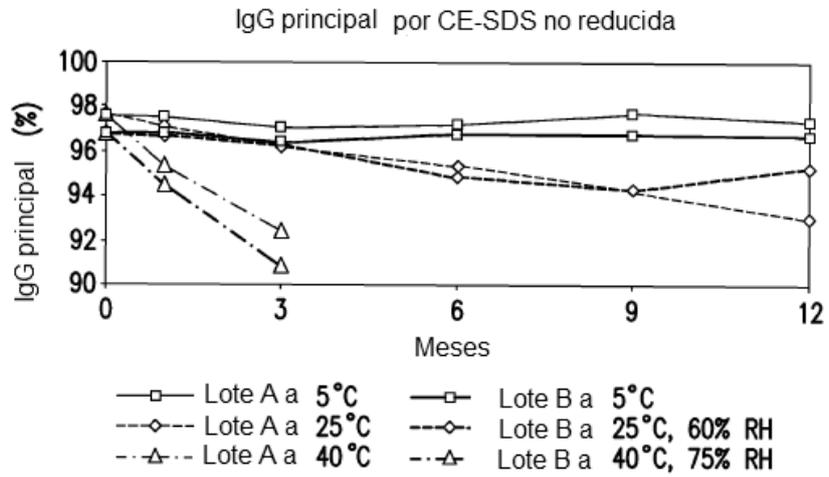


FIG. 6F

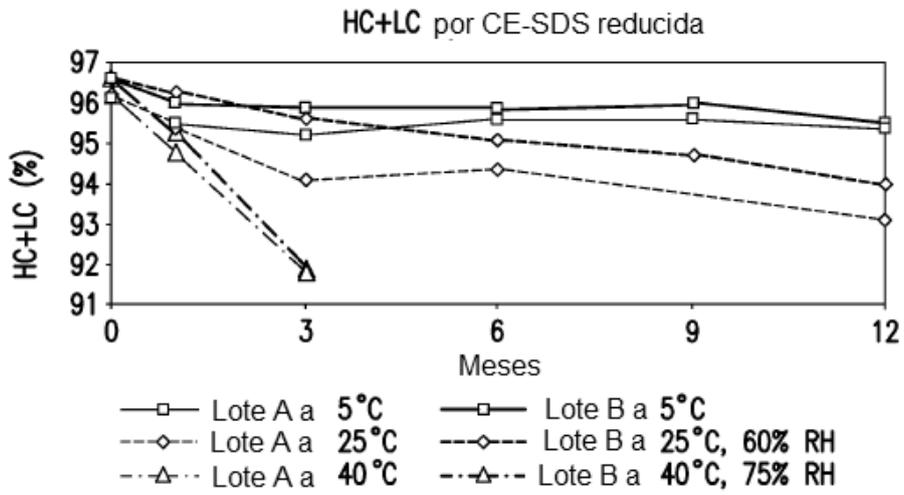


FIG.6G

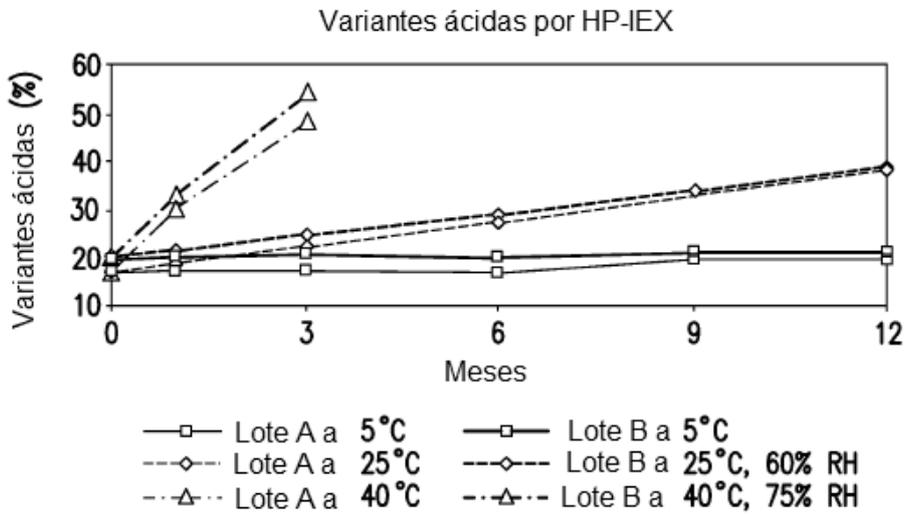


FIG.6H

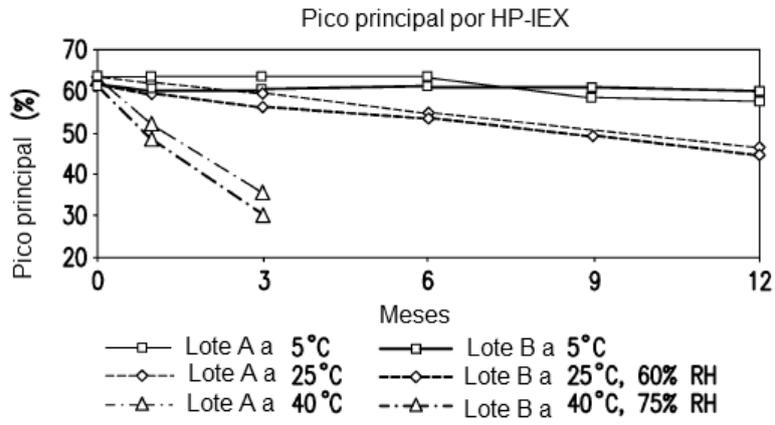


FIG. 6I

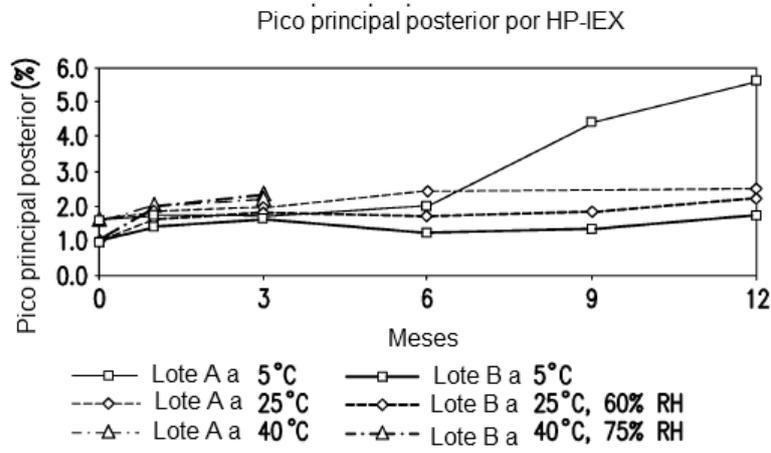


FIG. 6J

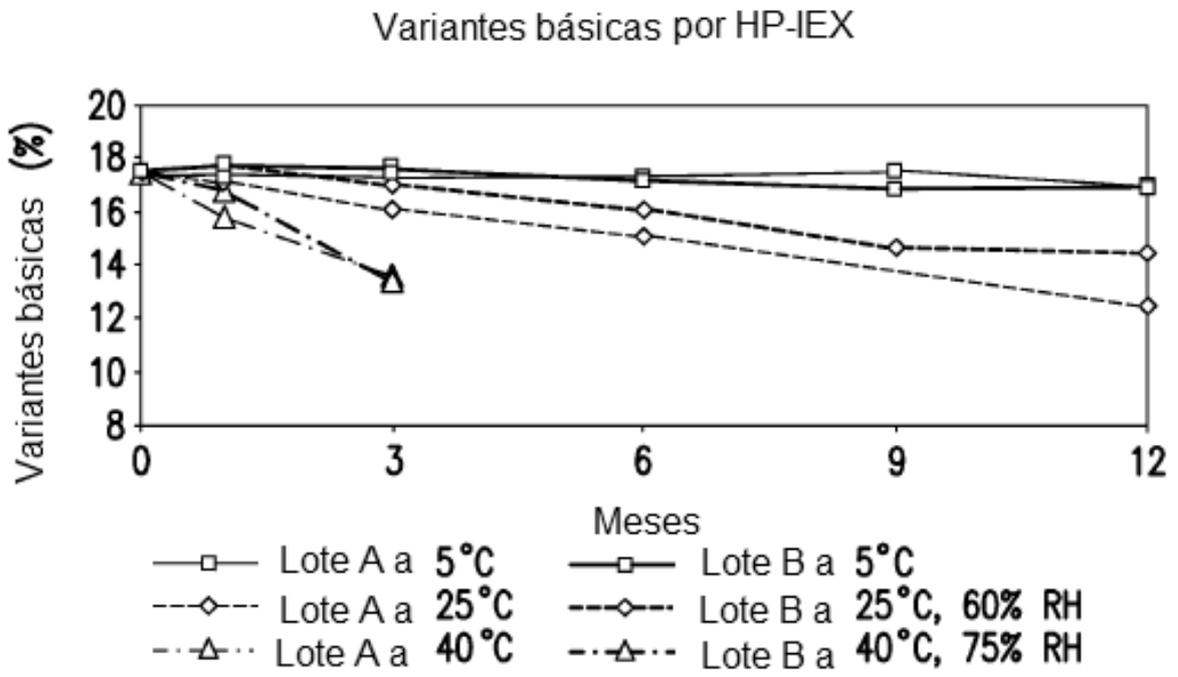


FIG.6K

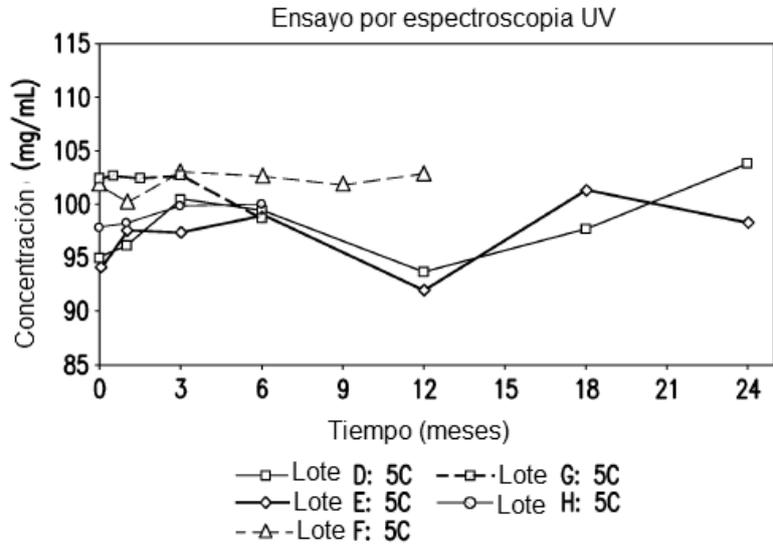


FIG.7A

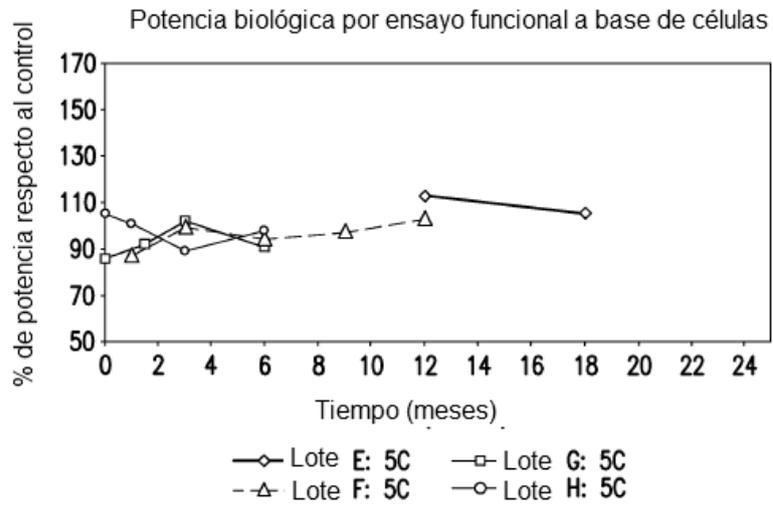


FIG.7B

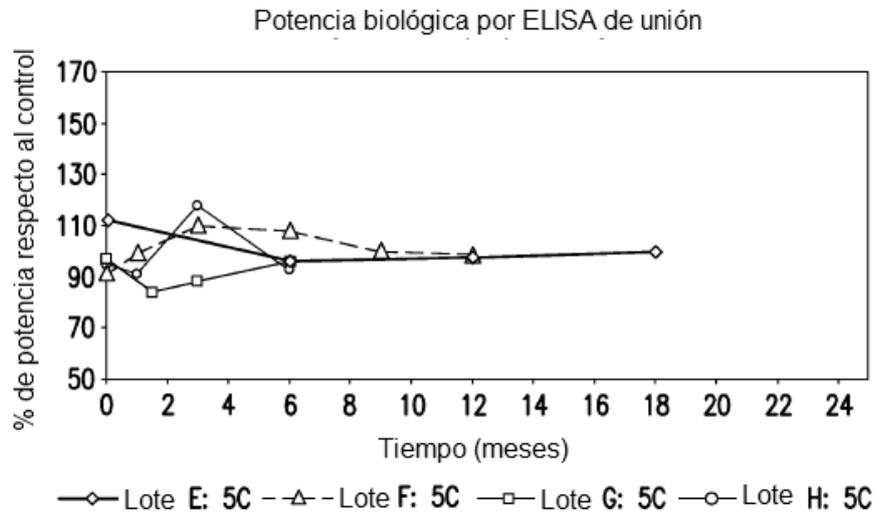


FIG.7C

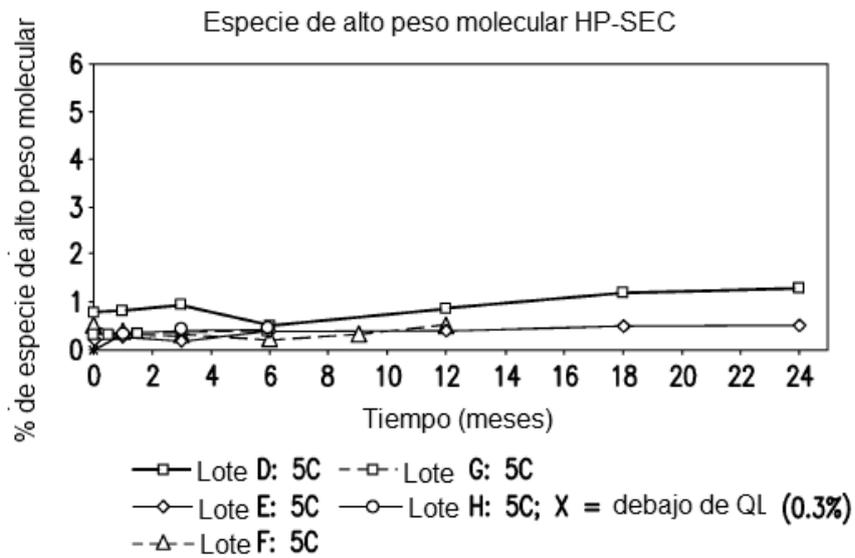


FIG.7D

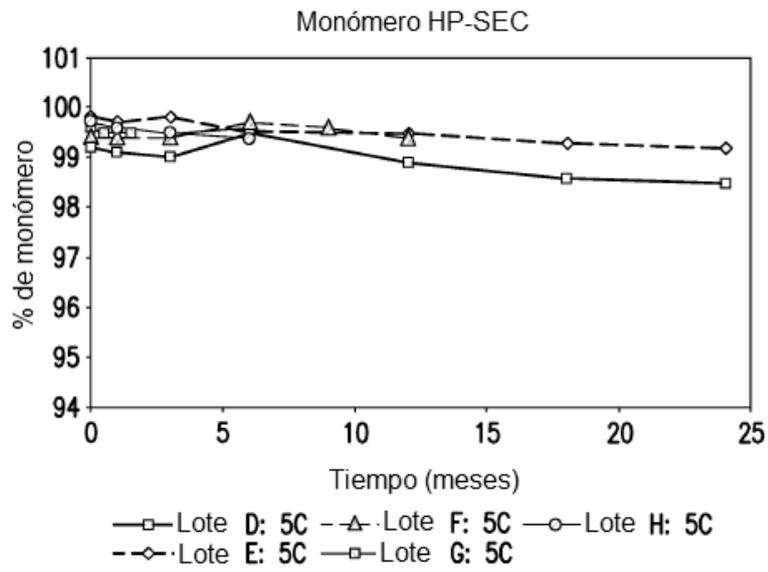


FIG. 7E

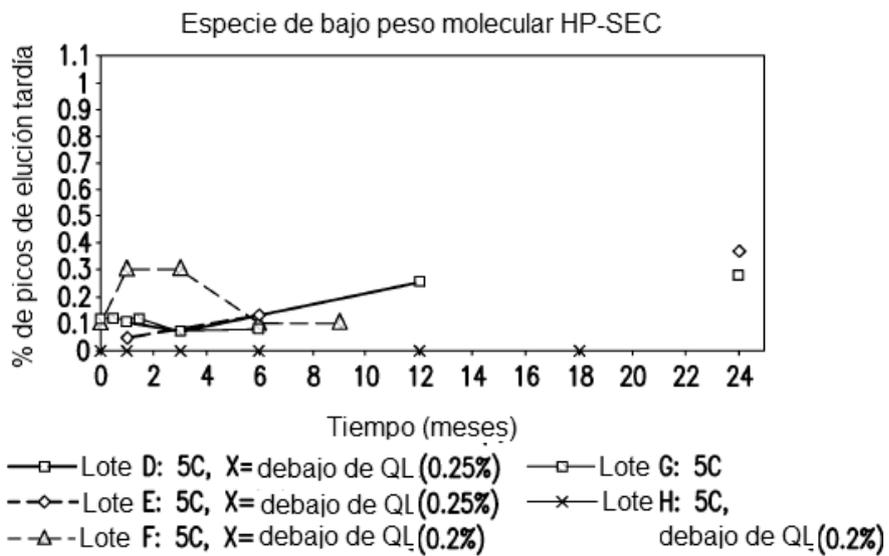


FIG. 7F

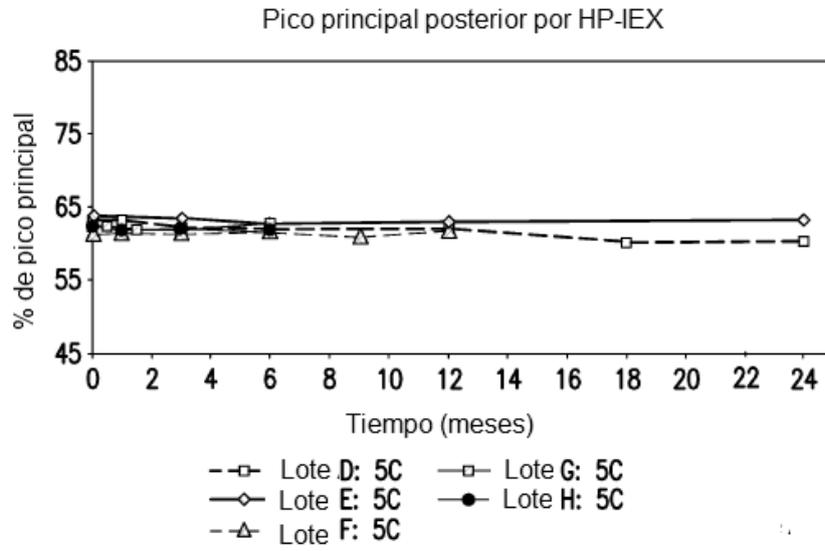


FIG.7G

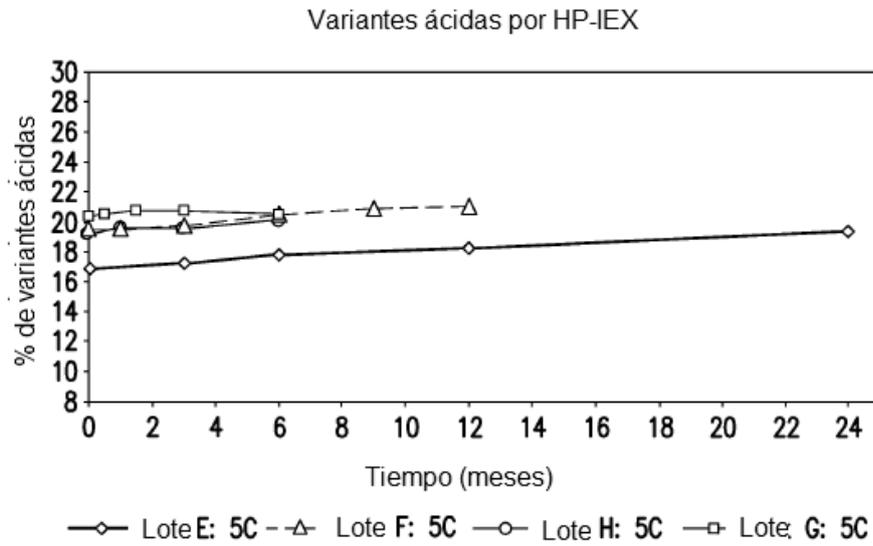


FIG.7H

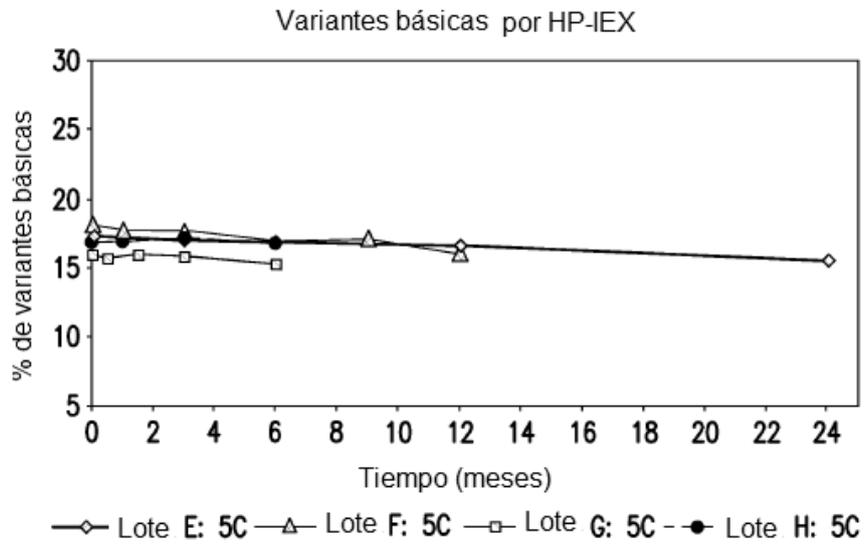


FIG.7I

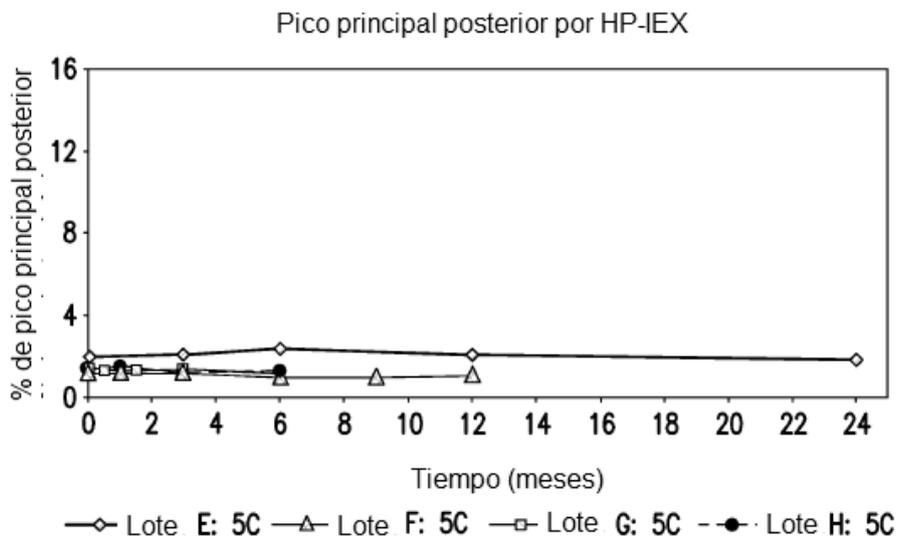


FIG.7J

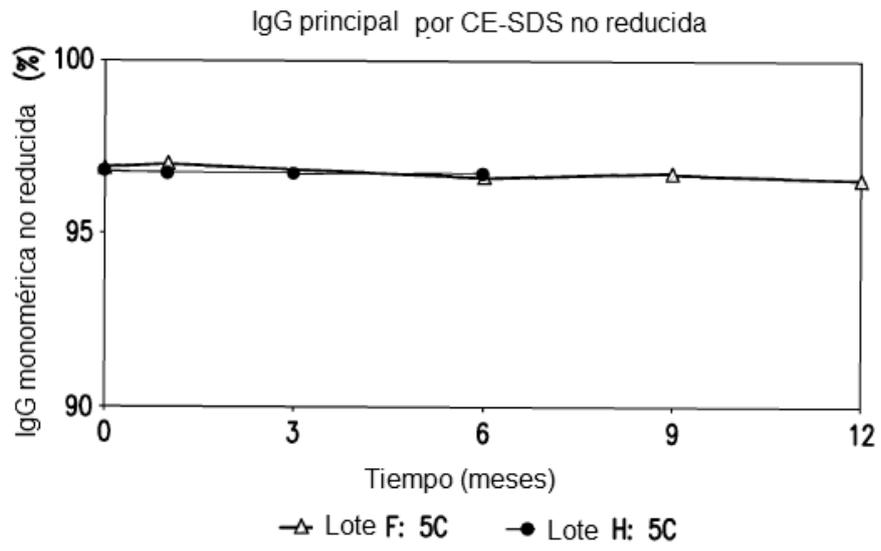


FIG.7K

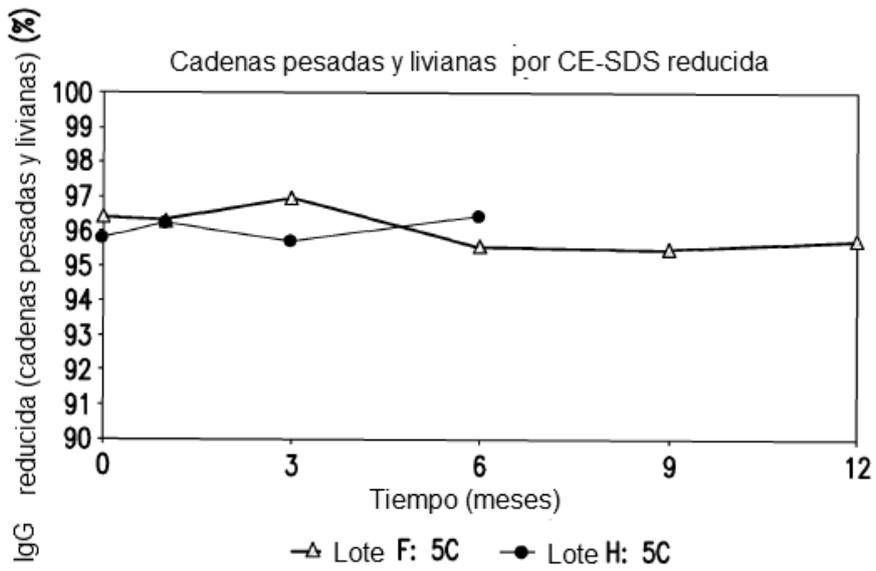


FIG.7L