

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 748 526**

51 Int. Cl.:

A61K 47/22 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 9/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.12.2007 PCT/US2007/026060**

87 Fecha y número de publicación internacional: **03.07.2008 WO08079290**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.12.2007 E 07863175 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.07.2019 EP 2129401**

54 Título: **Formulaciones tamponadas estables que contienen polipéptidos**

30 Prioridad:

21.12.2006 US 876801 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2020

73 Titular/es:

**AMGEN INC. (100.0%)
Patent Operations M/S 28-2-C, One Amgen Center
Drive
Thousand Oaks, California 91320-1799, US**

72 Inventor/es:

**JACOB, JABY;
MATSUMURA, MASAZUMI;
GOKARN, YATIN y
BREMS, DAVID**

74 Agente/Representante:

LEHMANN NOVO, María Isabel

ES 2 748 526 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 tamponadas estables que contienen polipéptidos

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente solicitud se refiere generalmente a medicinas para el tratamiento de enfermedades, por ejemplo, a formulaciones para productos farmacéuticos o productos biofarmacéuticos de molécula biológica.

ANTECEDENTES

10 Con la llegada de la tecnología de ADN recombinante y otros avances en la producción de anticuerpos, los agentes terapéuticos basados en proteínas se han vuelto cada vez más comunes en el repertorio de fármacos disponibles para los profesionales médicos para el tratamiento de una amplia variedad de enfermedades desde cáncer hasta enfermedades autoinmunitarias. La capacidad de emplear moléculas biológicas, por ejemplo, anticuerpos o proteínas recombinantes, como productos farmacéuticos en el tratamiento de enfermedades ha promovido el cuidado médico y la calidad de vida durante el pasado cuarto de siglo. Desde el año 2005, hubo más de ciento cincuenta productos farmacéuticos basados en proteínas autorizados a la venta y se espera que este número aumente espectacularmente en los próximos años.

15 Las proteínas que se sabe que presentan diversas acciones farmacológicas *in vivo* son ahora capaces de ser producidas en grandes cantidades para diversas aplicaciones farmacéuticas. La estabilidad a largo plazo de una proteína terapéutica, por ejemplo un anticuerpo, es un criterio particularmente beneficioso para los tratamientos seguros, coherentes y eficaces. La pérdida de funcionalidad del agente terapéutico dentro de una preparación puede disminuir su concentración eficaz para una administración dada. Similarmente, modificaciones no deseadas de un agente terapéutico pueden afectar la actividad y/o la seguridad de una preparación.

20 Las proteínas son moléculas complejas con estructuras primarias, secundarias, terciarias y en algunos casos cuaternarias, todas las cuales pueden desempeñar una función en conferir función biológica. La complejidad estructural de los productos farmacéuticos biológicos tales como las proteínas los hace susceptibles a diversos procesos que puede dar como resultado inestabilidad estructural y funcional, así como pérdida de seguridad. Con respecto a estos procesos de inestabilidad o vías de degradación, una proteína puede experimentar una variedad de reacciones o modificaciones covalentes y no covalentes en disolución. Por ejemplo, las vías de degradación de las proteínas se pueden clasificar generalmente en dos categorías principales: (i) vías de degradación física, y (ii) vías de degradación química.

25 Los fármacos de proteína pueden ser susceptibles al proceso de degradación física de agregación irreversible. La agregación de proteínas es de particular interés en la producción biofarmacéutica debido a que frecuentemente da como resultado la reducida bioactividad que afecta la potencia del fármaco, y también puede provocar reacciones inmunológicas o antigénicas en los pacientes. La degradación química de una proteína terapéutica, que incluye la degradación de la estructura química por, por ejemplo, modificación química, también participa en aumentar el potencial inmunogénico de un producto biofarmacéutico. Así, las formulaciones de proteína estable deben minimizar tanto las vías de degradación física como química del fármaco de interés.

30 Las proteínas pueden degradarse, por ejemplo, mediante procesos físicos tales como adsorción interfacial y agregación. La adsorción puede afectar la potencia y estabilidad del fármaco de proteína. Puede provocar una pérdida en la potencia de formas farmacéuticas de baja concentración. Una segunda consecuencia es que la adsorción mediada por el desplegamiento en las interfases puede ser frecuentemente una etapa de iniciación para la agregación irreversible en disolución. A este respecto, las proteínas tienden a adsorberse en las interfases líquido-sólido, líquido-aire y líquido-líquido. La suficiente exposición de un núcleo de proteína en una superficie hidrófoba puede dar como resultado la adsorción como consecuencia de estreses inducidos por agitación, temperatura o pH. Además, las proteínas también pueden ser sensibles a, por ejemplo, estreses por pH, fuerza iónica, térmicos, cizallamiento e interfaciales, todos los cuales pueden conducir a agregación y dar como resultado inestabilidad.

35 Las proteínas también se pueden someter a una variedad de reacciones de modificación y/o degradación química, por ejemplo, desamidación, isomerización, hidrólisis, reordenamiento de disulfuros, beta-eliminación, oxidación y formación de aductos. Los principales mecanismos de degradación hidrolítica pueden incluir hidrólisis de enlaces peptídicos, desamidación de asparagina y glutamina, y la isomerización de ácido aspártico. Otras vías de degradación pueden incluir reacciones de beta-eliminación, que pueden ocurrir en condiciones de pH alcalino y conducir a la racemización o pérdida de parte de la cadena lateral para ciertos aminoácidos. También pueden ocurrir oxidaciones de restos de metionina, cisteína, histidina, tirosina y triptófano.

40 Debido al número y la diversidad de diferentes reacciones que pueden dar como resultado la inestabilidad de las proteínas, la composición de componentes en una formulación puede afectar el grado de degradación de las proteínas y, por consiguiente, la seguridad y eficacia del agente terapéutico. La formulación de un agente biofarmacéutico también puede afectar la facilidad y frecuencia de administración y la cantidad de dolor sufrido por un paciente tras la inyección. Por ejemplo, no solo se han atribuido reacciones inmunogénicas a agregados de proteína, sino también a agregados mixtos de la proteína terapéutica con un componente inactivo contenido en la

formulación. Schellekens, H., Nat. Rev. Drug Discov. 1:457-62(2002); Hesmeling, et al., Pharm. Res. 22:1997-2006 (2005).

5 Una formulación que retiene estabilidad a largo plazo con respecto a otras formulaciones, en una variedad de condiciones, podría proporcionar un medio eficaz de administración de una cantidad eficaz y segura del producto biofarmacéutico. La retención de estabilidad a largo plazo en una formulación también podría reducir los costes de producción y tratamiento. Numerosas proteínas recombinantes o naturales se podrían beneficiar de dichas formulaciones coherentemente estables y así proporcionar resultados clínicos más eficaces.

10 Han aparecido en la técnica diversas formulaciones para estabilizar las proteínas biológicamente activas. Por ejemplo, la publicación de patente N° US 2006/0024346 trata disoluciones acuosas que comprenden una proteína biológicamente activa, un polisacárido y un compuesto basado en aminoácido y la patente de EE.UU. N° 6.171.586B trata formulaciones que comprenden un anticuerpo, un tampón acetato, un tensioactivo y un poliol, pero que carecen de una cantidad tonificante de cloruro sódico. La publicación de patente N° US 2005/0142139 trata formulaciones farmacéuticas que comprenden un heterotetrámero quimérico CD4-IgG2, un tampón histidina, un detergente no iónico y un aminoácido que puede comprender alanina, glicina, prolina o glicilglicina. La publicación internacional N° 15 WO 2005/063291 A1 trata una formulación que comprende anticuerpos en un tampón glutamato. Además, la publicación internacional N° WO 2005/44854 trata formulaciones de tampones ácido acético, ácido glutámico o ácido aspártico que contienen un anticuerpo anti-CD40.

20 En otra publicación de patente (N° 2003/0138417), se propusieron formulaciones farmacéuticas que comprendían 50 mg/mL o más de anticuerpo en cualquiera de tampón succinato o histidina. Los resultados de estudios con cualquier tampón, sin embargo, indicaron que los aminoácidos, glicina, lisina, serina, prolina o metionina no tuvieron un efecto estabilizante sobre la proteína en la formulación.

25 La presente solicitud proporciona nuevas formulaciones que retienen la elevada estabilidad de un producto biofarmacéutico en una variedad de condiciones diferentes de fabricación y almacenamiento. Los productos biofarmacéuticos usados con las formulaciones descritas en la memoria descriptiva pueden comprender, entre otras cosas, formulaciones terapéuticas de anticuerpos.

SUMARIO

30 La presente invención proporciona una formulación que comprende un tampón ácido acético que tiene un pH desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 6,0, prolina a una concentración de aproximadamente 2 % a aproximadamente 10 % (p/v), y un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, en donde la formulación no comprende además tanto un poliol como un tensioactivo.

En otra realización, la presente invención proporciona un método de preparación de una formulación que comprende combinar un tampón ácido acético que tiene un pH desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 6,0, prolina y una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, en donde la formulación no comprende además tanto un poliol como un tensioactivo.

35 En otra realización, la presente invención proporciona un recipiente que contiene una formulación que comprende una disolución acuosa que tiene ácido acético entre aproximadamente 3 y aproximadamente 50 mM con un pH desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 6,0, prolina desde aproximadamente 2 % hasta aproximadamente 10 % (p/v) y un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, en donde la disolución acuosa no comprende además tanto un poliol como un tensioactivo.

40 En otra realización, la presente invención proporciona una formulación para su uso en el tratamiento de una afección provocada por la elevada expresión de factor de crecimiento nervioso o elevada sensibilidad al factor de crecimiento nervioso en un paciente, que comprende un tampón ácido acético que tiene un pH desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 6,0, prolina a una concentración de aproximadamente 2 % a aproximadamente 10 % (p/v), y una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno contra el factor de crecimiento nervioso, en donde la formulación no comprende además tanto un poliol como un tensioactivo. 45

Las realizaciones preferidas se exponen en las reivindicaciones dependientes.

50 Se proporciona una formulación que comprende una disolución tampón, prolina, y una cantidad eficaz de un producto biofarmacéutico según la reivindicación 1. La memoria descriptiva también divulga un método de preparación de la formulación, métodos de tratamiento de una afección usando la formulación, y un kit que contiene los componentes de formulación.

55 En diversas realizaciones, la formulación comprende prolina que tiene una concentración de aproximadamente 3 % y un polipéptido que tiene una concentración de aproximadamente 3 mg/mL a aproximadamente 50 mg/mL o aproximadamente 100 mg/mL. El polipéptido es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno pueden unirse a factor de crecimiento, por ejemplo, factor de crecimiento nervioso (NGF).

En diversas realizaciones, la concentración de la disolución tampón puede ser desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 100 mM, desde aproximadamente 2 mM hasta aproximadamente 50 mM, desde aproximadamente 3 mM hasta aproximadamente 30 mM, desde aproximadamente 4 mM hasta aproximadamente 20 mM, o desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 10 mM, desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 40 mM, desde aproximadamente 15 mM hasta aproximadamente 35 mM, desde aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 30 mM, desde aproximadamente 25 mM hasta aproximadamente 35 mM aproximadamente, aproximadamente 26 mM, aproximadamente 27 mM, aproximadamente 28 mM, aproximadamente 29 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 31 mM, aproximadamente 32 mM, aproximadamente 33 mM o aproximadamente 34 mM. El polipéptido terapéutico incluido en la formulación puede comprender Fd, Fv, Fab, F(ab'), F(ab)₂, F(ab')₂, F(ab)₃, Fc, bis-scFv(s), Fv monocatenario (scFv), anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpo, pepticuerpos, dominio V_HH, dominio V-NAR, dominio V_H, dominio V_L, Ig de camello, NAR de Ig, o recepticuerpo o combinaciones de los anteriores.

La presente memoria descriptiva divulga un método que comprende combinar un tampón ácido acético acuoso con un pH desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 6,0 con prolina y un anticuerpo terapéutico, pero que no contiene tanto un poliol como un tensioactivo.

En diversas realizaciones, se proporciona una formulación para su uso en un método para tratar una afección provocada por la elevada expresión de un factor de crecimiento o elevada sensibilidad a un factor de crecimiento en un paciente, comprendiendo el método administrar a un paciente una cantidad farmacéuticamente eficaz de una formulación que comprende un tampón ácido acético que tiene un pH desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 6,0, prolina a una concentración de aproximadamente 2 % a aproximadamente 10 %, y una cantidad eficaz de un anticuerpo contra un factor de crecimiento o un fragmento de unión al antígeno de unión a factor de crecimiento según la reivindicación 10. La afección que se está tratando puede ser dolor o dolor neuropático.

En diversas realizaciones, la afección provocada por la elevada expresión de un factor de crecimiento o elevada sensibilidad a un factor de crecimiento puede resultar de la elevada expresión de factor de crecimiento nervioso. Por tanto, las formulaciones descritas en el presente documento pueden comprender un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno contra el factor de crecimiento nervioso. La formulación puede proporcionar un tratamiento para dolor o dolor neuropático.

La presente memoria descriptiva divulga además un kit que comprende un tampón, prolina y un anticuerpo. Si el tampón es un tampón ácido acético, el kit no contiene tanto un poliol como un tensioactivo.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los experimentos en las Figuras 1-7 usan un anticuerpo IgG₂, mientras que los experimentos en la Figura 8 y 9 usan un anticuerpo IgG₁.

La Figura 1A-1D ilustra los resultados del experimento de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para diferentes formulaciones en condiciones de almacenamiento variables durante hasta 18 meses. La preparación E51P30 contiene tampón ácido L-glutámico 10 mM (pH 5,1), 3,1 % de L-prolina y 30 mg/mL de anticuerpo. La Figura 1A ilustra los resultados tras el almacenamiento a 4 °C. La Figura 1B ilustra los resultados tras el almacenamiento a 25 °C. La Figura 1C ilustra los resultados tras el almacenamiento a 37 °C. La Figura 1D ilustra los resultados tras la congelación-descongelación a -30 °C. Los resultados demuestran que en la mayoría de los puntos de tiempo con respecto a varias temperaturas diferentes, la formulación E51P30 normalmente muestra la menor pérdida en porcentaje del pico principal.

Las Figuras 2A-2F ilustran los resultados de la medición del número de partículas superiores a 10 µm (Figuras 2A, 2C y 2E) o 25 µm (Figuras 2B, 2D y 2F) después del almacenamiento a 4 °C, 25 °C o 37 °C en diversas formulaciones. Las formulaciones se analizaron por un HIAC Royco, sistema de recuento de partículas líquidas, modelo 9703 (Hach-Ultra, Grants Pass, OR, EE.UU.).

Las Figuras 3A-3B ilustran la medición del número de partículas formadas después de 5 ciclos de congelación a -30 °C y descongelación a temperatura ambiente.

Las Figuras 4A-4C ilustran cambios en el porcentaje del pico principal (Pico 0) observado por cromatografía de intercambio catiónico débil (CEX) después de almacenamiento a 4 °C (Figura 4A), 25 °C (Figura 4B) y 37 °C (Figura 4C).

Las Figuras 5A-5H ilustran las áreas en porcentaje del pico principal obtenidas por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) para diferentes formulaciones almacenadas a 25 °C o 37 °C en viales de vidrio y jeringas precargadas (PFS) a una concentración de anticuerpo de 40 mg/mL (Figuras 5A-5D) o 3 mg/mL (Figuras 5E-5H)

Las Figuras 6A-6H ilustran la cromatografía de intercambio catiónico obtenida para diferentes formulaciones guardadas a 25 °C o 37 °C en viales de vidrio y jeringas precargadas a una concentración de anticuerpo de 40 mg/mL (Figuras 6A-6D) y 3 mg/mL (Figuras 6E-6H).

5 Figuras 7A-7B. La Figura 7A ilustra la estabilidad a largo plazo de una disolución de anticuerpo guardada a -30 °C. La Figura 7B ilustra la estabilidad de un anticuerpo tras múltiples ciclos de congelación-descongelación a -30 °C.

10 Las Figuras 8A-8G proporcionan resultados usando SEC para diferentes condiciones de almacenamiento usando diferentes formulaciones. El anticuerpo se almacenó en una disolución que contenía 100 mg/mL de acetato sódico a pH 5,2. Todos los excipientes estuvieron a una concentración de 270 mM, excepto PEG 6.000 que estuvo a 2 %. Los resultados en las Figuras 8A, 8C y 8G se expresan en términos de agregados de HMW, mientras que los resultados en las Figuras 8B, 8D, 8E y 8F se expresan en términos de un porcentaje del pico principal. En todos los casos, las disoluciones que contenían prolina proporcionaron los mejores resultados.

Las Figuras 9A-9D ilustran los resultados de uso de polisorbato en la disolución de almacenamiento.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

15 Diversas realizaciones en esta memoria descriptiva se refieren a una formulación que presenta una capacidad estabilizadora para polipéptidos. La formulación puede comprender un tampón ácido acético, prolina y una proteína. El tampón tiene un pH desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 6,0. El polipéptido puede ser un anticuerpo. En diversas realizaciones, la formulación puede consistir en o consistir esencialmente en tampón ácido acético, prolina y una proteína. La formulación no comprende además tanto un poliol como un tensioactivo.

20 Los productos biofarmacéuticos incluidos en la formulación pueden presentar, en algunos casos, estabilidad durante largos periodos de tiempo, por ejemplo, al menos uno o más meses a diversa temperatura, por ejemplo, aproximadamente 4 °C, 25 °C o 37 °C, permitiendo así la administración de una cantidad segura y eficaz de un polipéptido terapéutico u otro producto biofarmacéutico. En diversas realizaciones, la estabilidad de los anticuerpos se puede demostrar durante 12-18 meses a aproximadamente 4 °C.

25 Las siguientes definiciones se proporcionan para facilitar el entendimiento de ciertos términos usados en toda la memoria descriptiva.

Se debe entender que, mientras que diversas realizaciones en la memoria descriptiva se presentan usando el lenguaje "que comprende", en diversas circunstancias, también se puede describir una realización relacionada usando el lenguaje "que consiste en" o "que consiste esencialmente en".

30 También se debe entender que cuando se describe un intervalo de valores, la característica que se describe podría ser un valor individual encontrado dentro del intervalo. Por ejemplo, "un pH desde aproximadamente pH 4 hasta aproximadamente pH 6" podría ser pH 4, 4,2, 4,6, 5,1, 5,5, etc., y cualquier valor entre dichos valores. Además, "un pH desde aproximadamente pH 4 hasta aproximadamente pH 6" no se debe interpretar que significa que el pH de una formulación en cuestión varía 2 unidades de pH en el intervalo desde pH 4 hasta pH 6 durante el
35 almacenamiento, sino que se puede escoger un valor en ese intervalo para el pH de la disolución, y el pH sigue estando tamponado a aproximadamente ese pH.

Se debe observar que el término "un" o "una" se refiere a uno o más, por ejemplo, se entiende que "una molécula de inmunoglobulina" representa una o más moléculas de inmunoglobulina. Como tales, los términos "un" (o "una"), "uno o más," y "al menos uno" se pueden usar indistintamente en el presente documento.

40 Como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa que un número denominado "aproximadamente" comprende el número citado más o menos 5 % de ese número citado. Por ejemplo, "aproximadamente 50 mM" puede significar 47,5, 47,6, 47,7, 47,8, 47,9, 48, 49, 50, 51, 52 o 52,5 mM u otros valores que son más o menos 5 % de 50, dependiendo de la situación.

45 Como se usa en el presente documento, el término "tampón ácido acético" pretende significar un tampón que comprende ácido acético. El tampón se puede preparar a partir de una sal de acetato, por ejemplo, acetato sódico. Se pueden usar otras sales, por ejemplo, sales de acetato de potasio, amonio, calcio o magnesio. Se usan indistintamente "tampón ácido acético" y "tampón acetato".

Como se usa en el presente documento, el término "producto biofarmacéutico" se refiere a una macromolécula o biopolímero, por ejemplo, un polipéptido o anticuerpo, que se puede usar como un producto farmacéutico.

50 Como se usa en el presente documento, el término "formulación (formulaciones)" significa una combinación de al menos un principio activo con uno o varios de otros componentes para uno o más usos particulares, tales como almacenamiento, procesamiento adicional, venta y/o administración a un sujeto, tal como, por ejemplo, administración a un sujeto de un agente específico en una cantidad específica, por una vía específica, para tratar

una enfermedad específica. El término "formulación" se refiere a un medio farmacéuticamente aceptable que es compatible con un producto biofarmacéutico que se puede administrar a seres humanos o animales.

5 Como se usa en el presente documento, el término "cantidad eficaz", cuando se usa en referencia a un producto biofarmacéutico terapéutico tal como un polipéptido terapéutico, pretende significar una cantidad de la molécula terapéutica suficiente para mejorar o mitigar al menos un síntoma asociado a una enfermedad o afección fisiológica elegida.

10 En diversas realizaciones, la memoria descriptiva proporciona una formulación que comprende prolina, una cantidad eficaz de un polipéptido terapéutico y una disolución acuosa que tiene un pH desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 6,0. La disolución acuosa puede ser un tampón acuoso. La formulación puede presentar propiedades óptimas para la administración, almacenamiento y/o manipulación de productos biofarmacéuticos. La manipulación puede incluir, por ejemplo, liofilización, reconstitución, dilución, valoración y almacenamiento. El componente de tamponamiento acuoso, es decir, un tampón ácido acético, se puede combinar con un producto biofarmacéutico deseado usando cualquiera de una variedad de métodos conocidos en la técnica. Además, el componente de tamponamiento puede ser compatible con una amplia variedad de excipientes y tensioactivos que facilitan la estabilidad de un producto biofarmacéutico de interés. Estos y otros atributos de la formulación pueden permitir preparar formulaciones estables de moléculas bioactivas y mantenerlas durante periodos prolongados.

20 Como se usa en el presente documento, el término "excipiente" pretende significar una sustancia terapéuticamente inactiva. Los excipientes se pueden incluir en una formulación para una amplia variedad de fines que incluyen, por ejemplo, como diluyente, vehículo, tampón, estabilizador, agente de tonicidad, agente de carga, tensioactivo, crioprotector, lioprotector, antioxidante, fuente de iones metálicos, agente quelante y/o conservante. Los excipientes incluyen, por ejemplo, polioles tales como sorbitol o manitol; azúcares tales como sacarosa, lactosa o dextrosa; polímeros tales como polietilenglicol; sales tales como NaCl, KCl o fosfato de calcio, aminoácidos, por ejemplo, prolina, glicina o metionina, tensioactivos, iones metálicos, sales tampón tales como glutamato, acetato o aspartato, conservantes y polipéptidos tales como albúmina de suero humano, así como solución salina y agua. Los excipientes pueden comprender azúcares, por ejemplo alcoholes de azúcar, azúcares reductores, azúcares no reductores y ácidos de azúcar. Los excipientes se conocen bien en la técnica y se pueden encontrar descritos en, por ejemplo, Wang W., *Int. J. Pharm.* 185:129-88 (1999) y Wang W., *Int. J. Pharm.* 203:1-60 (2000).

30 Brevemente, los alcoholes de azúcar, también conocidos como polioles, alcoholes polihidroxilados, o polialcoholes, son formas hidrogenadas de hidrato de carbono que tienen un grupo carbonilo reducido a un grupo hidroxilo primario o secundario. Los polioles se pueden usar como excipientes estabilizantes y/o agentes de isotonicidad en tanto formulaciones líquidas como liofilizadas. Los polioles pueden proteger los productos biofarmacéuticos de tanto las vías degradación física como química. Los ejemplos de alcoholes de azúcar pueden incluir sorbitol, glicerol, manitol, xilitol, maltitol, lactitol, eritritol y treitol.

35 Los azúcares reductores pueden comprender, por ejemplo, azúcares con un grupo cetona o aldehído y contener un grupo hemiacetal reactivo, que permite que el azúcar actúe de agente reductor. Los ejemplos específicos de azúcares reductores incluyen fructosa, glucosa, gliceraldehído, lactosa, arabinosa, manosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y maltosa. Los azúcares no reductores pueden comprender un carbono anomérico que es un acetal y no es sustancialmente reactivo con aminoácidos o polipéptidos para iniciar una reacción de Maillard. Los ejemplos específicos de azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, sucralosa, melecitosa y rafinosa. Los ácidos de azúcar incluyen, por ejemplo, ácidos sacáricos, gluconato y otros polihidroxiazúcares y sales de los mismos.

Los tampones o tampones en combinación con excipientes pueden mantener el pH de las formulaciones líquidas durante toda la estabilidad en almacén del producto y mantener el pH de formulaciones liofilizadas durante el proceso de liofilización y tras la reconstitución, por ejemplo.

45 Los agentes de tonicidad y/o estabilizadores incluidos en las formulaciones líquidas se pueden usar, por ejemplo, para proporcionar isotonicidad, hipotonicidad o hipertonicidad a una formulación tal que sea adecuada para administración. Dichos excipientes también se pueden usar para facilitar el mantenimiento de la estructura de un producto biofarmacéutico y/o para minimizar las interacciones electrostáticas proteína-proteína en disolución. Los ejemplos de agentes de tonicidad y/o estabilizadores pueden incluir polioles, sales y/o aminoácidos.

50 Los antioxidantes son útiles en las formulaciones líquidas para controlar la oxidación de proteínas y también se pueden usar en formulaciones liofilizadas para retardar las reacciones de oxidación.

55 Se pueden incluir iones metálicos en una formulación líquida, por ejemplo, como co-factor y se pueden utilizar cationes divalentes tales como cinc y magnesio en formulaciones en suspensión. Los agentes quelantes incluidos en las formulaciones líquidas se pueden usar, por ejemplo, para inhibir las reacciones catalizadas por iones metálicos. Con respecto a las formulaciones liofilizadas, también se pueden incluir iones metálicos, por ejemplo, como co-factor. Aunque generalmente se omiten los agentes quelantes de las formulaciones liofilizadas, también se pueden incluir según se desee para reducir las reacciones catalíticas durante el proceso de liofilización y tras la reconstitución.

Se pueden usar conservantes en formulaciones líquidas, por ejemplo, para proteger contra el crecimiento microbiano y son particularmente beneficiosos en formulaciones de múltiples dosis. En las formulaciones liofilizadas, los conservantes generalmente se incluyen en el diluyente de reconstitución. El alcohol bencílico es un ejemplo específico de un conservante útil en una formulación de la invención.

5 Como se usa en el presente documento, el término "tensoactivo" pretende significar una sustancia que funciona reduciendo la tensión superficial de un líquido en el que se disuelve. Los tensoactivos se pueden incluir en una formulación para una variedad de fines que incluyen, por ejemplo, para prevenir o controlar la agregación, formación de partículas y/o adsorción superficial en formulaciones líquidas o para prevenir o controlar estos fenómenos durante el proceso de liofilización y/o reconstitución en formulaciones liofilizadas. Los tensoactivos incluyen, por ejemplo, 10 compuestos orgánicos anfipáticos que presentan solubilidad parcial en tanto disolventes orgánicos como disoluciones acuosas. Las características generales de los tensoactivos incluyen su capacidad para reducir la tensión superficial del agua, reducir la tensión interfacial entre el aceite y el agua y también formar micelas. Los tensoactivos pueden incluir tensoactivos no iónicos e iónicos. Los tensoactivos se conocen en la técnica y se pueden encontrar descritos en, por ejemplo, Randolph T.W. y Jones L.S., Surfactant-protein interactions. Pharm Biotechnol. 13:159-75 (2002).

Los tensoactivos no iónicos pueden incluir, por ejemplo, alquil-poli(óxido de etileno), poliglucósidos de alquilo tales como glucósido de octilo y decilmaltósido, alcoholes grasos tales como alcohol cetílico y alcohol oleico, cocamida MEA, cocamida DEA y cocamida TEA. Los ejemplos específicos de tensoactivos no iónicos incluyen los 20 polisorbatos que incluyen, por ejemplo, polisorbato 20, polisorbato 28, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 81 y polisorbato 85; los poloxámeros que incluyen, por ejemplo, poloxámero 188, también conocido como poloxalcol o poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno), poloxámero 407 o polietileno-polipropilenglicol, y polietilenglicol (PEG). El polisorbato 20 es sinónimo de TWEEN 20, monolaurato de sorbitano y monolaurato de polioxietilensorbitano.

Los tensoactivos iónicos pueden incluir, por ejemplo, tensoactivos aniónicos, catiónicos y de ión bipolar. Los 25 tensoactivos aniónicos incluyen, por ejemplo, tensoactivos basados en sulfonato o basados en carboxilato tales como jabones, sales de ácidos grasos, dodecilsulfato de sodio (SDS), laurilsulfato de amonio y otras sales de alquilsulfato. Los tensoactivos catiónicos incluyen, por ejemplo, tensoactivos basados en amonio cuaternario tales como bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB), otras sales de alquiltrimetilamonio, cloruro de cetilpiridinio, amina de sebo polietoxilada (POEA) y cloruro de benzalconio. Los tensoactivos de ión bipolar o anfóteros incluyen, por 30 ejemplo, dodecilmaltósido, óxido de dodecildimetilamina, cocamidopropilbetaína y cocoanfloglicinato.

Como se usa en el presente documento, el término "terapéutico", cuando se usa en referencia a un polipéptido, por ejemplo un anticuerpo, pretende significar que el polipéptido se puede usar en la cura, mitigación, tratamiento o la 35 prevención de enfermedad en un ser humano u otro animal. El tratamiento se refiere a tanto tratamiento terapéutico y/o profiláctico como a medidas preventivas. Aquellos en necesidad de tratamiento pueden incluir aquellos ya con un trastorno o aquellos en los que se va a prevenir un trastorno.

Por consiguiente, un polipéptido terapéutico puede ser un producto biofarmacéutico y puede comprender un único polipéptido o dos o más subunidades de polipéptido. Un polipéptido terapéutico puede comprender un anticuerpo (por ejemplo, un "anticuerpo terapéutico"), un fragmento de anticuerpo funcional del mismo, un fragmento de unión al 40 antígeno, un peptidocuerpo o fragmento funcional del mismo, factores de crecimiento, citocinas, moléculas de señalización de células y hormonas. Se conocen en la técnica una amplia variedad de polipéptidos terapéuticos, y están incluidas dentro del significado del término "polipéptidos terapéuticos" como se usa en el presente documento. Los polipéptidos terapéuticos que se van a usar en la formulación descrita en esta memoria descriptiva pueden comprender, por ejemplo, anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno, a una amplia variedad de antígenos, por 45 ejemplo, interleucinas, G-CSF, GM-CSF, cinasas, TNF y TNFR, RANKL, EGFR, ligandos, ciclinas y eritropoyetina, y o factores de crecimiento. Los factores de crecimiento pueden comprender, por ejemplo, factor de crecimiento epidérmico, factor de crecimiento humano o factor de crecimiento nervioso.

La estabilidad de una formulación se refiere a la retención de estructura y/o función y/o actividad biológica de un producto biofarmacéutico dentro de la formulación. La retención de estructura y/o función y/o actividad biológica no necesita ser 100 %. La medición de la estabilidad de una formulación puede ser una medida comparativa. Por tanto, 50 si se dice que una formulación es más estable o tiene mayor estabilidad que otra, la formulación con mayor estabilidad ha retenido un mayor porcentaje de una característica deseada que se investiga que la otra formulación, a menos que la característica que se considere sea una característica negativa. Si la característica es una característica negativa, entonces la formulación con mayor estabilidad tendrá menos de esa característica. Por ejemplo, la formulación A es más estable que la formulación B si mantiene un mayor porcentaje del pico principal cuando se mide por cromatografía de exclusión por tamaño, es decir, demuestra menos agregación. También se 55 puede decir que la formulación A es más estable que la formulación B si contiene menos partículas que la formulación B tras el almacenamiento.

En diversas realizaciones, un producto biofarmacéutico en la formulación puede presentar atributos tales como resistencia al cambio o deterioro que afecta la estabilidad o función y, por tanto, mantienen las características 60 funcionales coherentes con el tiempo.

En diversas realizaciones, la estabilidad de un producto biofarmacéutico dentro de una formulación puede comprender la retención de estabilidad física y/o química. La estabilidad del producto biofarmacéutico se puede evaluar, por ejemplo, determinando si el producto biofarmacéutico se ha sometido a una vía de degradación física y/o degradación química, que incluye modificación química de su estructura. La retención de estabilidad también se puede medir, por ejemplo, en términos del porcentaje de monómero que queda, después del almacenamiento a diferentes temperaturas o después de múltiples ciclos de congelación-descongelación. Estas mediciones pueden reflejar la cantidad de agregación de polipéptidos.

La retención de estabilidad física o química se puede determinar por mediciones del porcentaje de monómero antes y después del almacenamiento, por ejemplo, por cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). En diversas realizaciones, el porcentaje de monómero que queda después del almacenamiento o congelación-descongelación repetidas puede estar entre aproximadamente 80 % y aproximadamente 100 %, entre aproximadamente 85 % y aproximadamente 95 %, o entre aproximadamente 90 % y aproximadamente 95 %, o entre aproximadamente 95 % y aproximadamente 99 % cuando se compara con el producto biofarmacéutico en un momento de tiempo inicial. Por consiguiente, la estabilidad de un producto biofarmacéutico dentro de una formulación de la invención puede incluir retención de estabilidad superior a 99,5 %, al menos 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 89 %, 88 %, 87 %, 86 %, 85 %, 84 %, 83 %, 82 %, 81 % o 80 % en comparación con la estabilidad del producto biofarmacéutico en un momento de tiempo inicial.

Otros ejemplos de la estabilidad de formulaciones pueden comprender mediciones comparativas del número de agregados proteínicos insolubles (partículas) en disolución, o la aparición de modificaciones químicas con respecto al producto biofarmacéutico en la disolución de partida.

En realizaciones adicionales, la estabilidad de una formulación incluye, por ejemplo, retención de actividad. La actividad biofarmacéutica se puede evaluar usando, por ejemplo, un ensayo *in vitro*, *in vivo* y/o *in situ* indicativo de la función del producto biofarmacéutico. La retención de estabilidad de un producto biofarmacéutico en una formulación de la invención puede incluir, por ejemplo, retención de la actividad entre aproximadamente 50 y aproximadamente 100 % o más, dependiendo de la variabilidad del ensayo. Por ejemplo, la retención en la estabilidad puede incluir retención de la actividad entre aproximadamente 60 % y aproximadamente 99 % o entre aproximadamente 70 % y aproximadamente 80 % en comparación con la actividad del producto biofarmacéutico en un momento de tiempo inicial.

En diversas realizaciones, la estabilidad de un producto biofarmacéutico dentro de una formulación puede incluir la retención de actividad de al menos 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % y puede incluir mediciones de actividad superiores a 100 %, por ejemplo, 105 %, 110 %, 115 %, 120 %, 125 % o 150 % o más en comparación con la actividad del producto biofarmacéutico en un momento de tiempo inicial.

Generalmente, se selecciona un momento de tiempo inicial para ser el momento en el que se prepara por primera vez un producto biofarmacéutico en una formulación o se examina por primera vez para calidad (por ejemplo, cumple las especificaciones de liberación), en diversas realizaciones. Un momento de tiempo inicial también puede incluir el momento en el se reformula un producto biofarmacéutico en una formulación. La reformulación puede ser, por ejemplo, a una concentración más alta, concentración más baja o a la misma concentración de una preparación inicial.

La estabilidad de un producto biofarmacéutico en una formulación puede ser retenida a 2-8 °C o a aproximadamente 4 °C. La estabilidad de un producto biofarmacéutico en una formulación como se describe en el presente documento también puede ser retenida a temperaturas superiores a 4 °C, por ejemplo, a temperatura ambiente, aproximadamente 23 °C o 25 °C, o superior, que incluye 37 °C. Esta mayor retención en la estabilidad a temperaturas más altas se pueden mostrar por la mayor retención del pico principal de, por ejemplo, un anticuerpo en una formulación tamponada con ácido glutámico que comprende prolina como se muestra en la Figura 1 (ejemplo de referencia) en comparación con otros tampones sin prolina.

Según diversas realizaciones, la formulación descrita en la memoria descriptiva es estable a aproximadamente 4 °C, aproximadamente 25 °C o aproximadamente 37 °C durante al menos seis meses, de forma que el monómero pico puede representar al menos 99 % del total como se ha determinado por SEC. En diversas otras realizaciones, el monómero pico representa al menos 99,8 %, 99,7 %, 99,6 %, 99,5 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 % o 90 % del total como se ha determinado, por ejemplo, usando cromatografía de exclusión por tamaño. En diversas otras realizaciones, la formulación puede ser estable durante al menos un mes, al menos dos meses, al menos tres meses, al menos cuatro meses, al menos cinco meses o más de aproximadamente seis meses.

Se puede preparar una formulación para ser isotónica con una disolución o fluido de referencia (por ejemplo, sangre y/o suero). Una disolución isotónica tiene una concentración tal que es osmóticamente estable. A menos que se compare explícitamente con una disolución específica o fluido, isotónico o isotonicidad, como se usa en el presente documento, pretende significar referencia a suero de sangre humana (por ejemplo, 280-300 mOsm/kg). Por tanto, una formulación isotónica contendrá una concentración sustancialmente similar de solutos o presentará presión osmótica sustancialmente similar a la sangre humana. En general, una disolución isotónica contiene aproximadamente la misma concentración de solutos que la solución salina normal para seres humanos y muchos

otros mamíferos, que es aproximadamente 0,9 por ciento en peso (0,009 g/mL) de sal en disolución acuosa (por ejemplo, 0,009 g/mL de NaCl).

5 Muchos aspectos de los procesos farmacéuticos de producción y formulación pueden ser sensibles al pH. El mantenimiento del pH correcto de un producto farmacéutico acabado puede afectar la estabilidad farmacéutica, eficacia y estabilidad en almacén, y el pH es una consideración en el diseño de formulaciones para administración que serán aceptables, así como seguras y eficaces.

10 Para mantener el pH, los procesos farmacéuticos y las formulaciones pueden usar uno o más agentes de tamponamiento. Están disponibles una variedad de agentes de tamponamiento para uso farmacéutico. El tampón o tampones para una aplicación dada deben ser eficaces al pH deseado. También deben proporcionar capacidad de tamponamiento suficiente para mantener el pH deseado durante el tiempo que sea necesario. Un buen tampón para una composición farmacéutica también puede satisfacer numerosos otros requisitos. Debe ser apropiadamente soluble. No debe formar complejos perjudiciales con iones metálicos, ser tóxico, o penetrar, solubilizar, o absorberse exageradamente sobre membranas u otras superficies. No debe interactuar con otros componentes de la composición en ningún modo que disminuya su disponibilidad o eficacia. Debe ser estable y eficaz en mantener el pH durante el intervalo de condiciones a las que se expondrá durante la formulación y durante el almacenamiento del producto. No se debe afectar perjudicialmente por oxidación u otras reacciones que ocurren en su entorno, tales como las que ocurren en el procesamiento de la composición en la que se proporciona la acción de tamponamiento. Si se lleva a o incorpora en un producto final, un agente de tamponamiento debe ser seguro para administración, compatible con otros componentes de la composición con respecto a la estabilidad en almacén del producto, y aceptable para administración al usuario final. La lista anterior representa diversas características relacionadas con una formulación que contiene un producto biofarmacéutico. No todos los tampones, sin embargo, presentarán necesariamente todas las características descritas.

25 En diversas realizaciones, las formulaciones descritas en el presente documento pueden ser autorizadas para uso farmacéutico por una autoridad nacional o internacional facultada por ley para conceder dicha autorización, por ejemplo, la Agencia Europea de Evaluación de los Medicamentos, Ministerio Japonés de Salud, Trabajo y Bienestar, Administración de Fármacos del Estado de China, Administración Estadounidense de Medicamentos y Alimentos, o sus sucesor(es) en esta autoridad, particularmente preferentemente la administración Estadounidense de Medicamentos y Alimentos o su sus sucesor(es) en esta autoridad.

30 La formulación contiene ácido acético (acetato) como un tampón con prolina y un producto biofarmacéutico. La formulación puede contener una concentración de tampón que tiene capacidad de tamponamiento suficiente para mantener un pH seleccionado de la formulación a una temperatura seleccionada. Las concentraciones útiles de un tampón pueden estar entre aproximadamente 1 mM-150 mM, entre aproximadamente 5 mM-100 mM, entre aproximadamente 10 mM-50 mM o entre aproximadamente 20 a aproximadamente 40 mM. En diversas realizaciones, la concentración de tampón puede ser aproximadamente 5 mM, aproximadamente 6 mM, aproximadamente 7 mM, aproximadamente 8 mM, aproximadamente 9 mM, aproximadamente 10 mM, aproximadamente 11 mM, aproximadamente 12 mM, aproximadamente 13 mM, aproximadamente 14 mM, aproximadamente 15 mM, aproximadamente 20 mM, aproximadamente 25 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 35 mM, aproximadamente 40 mM, o aproximadamente 45 mM. Pueden ser apropiadas otras concentraciones de tampón, a condición de que el tampón tenga capacidad de tamponamiento suficiente para mantener un pH seleccionado de una formulación a una temperatura seleccionada durante el almacenamiento.

45 En diversas otras realizaciones, la concentración de la disolución tampón puede ser desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 100 mM, desde aproximadamente 2 mM hasta aproximadamente 50 mM, desde aproximadamente 3 mM hasta aproximadamente 30 mM, desde aproximadamente 4 mM hasta aproximadamente 20 mM, o desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 10 mM, desde aproximadamente 10 mM hasta aproximadamente 40 mM, desde aproximadamente 15 mM hasta aproximadamente 35 mM, desde aproximadamente 20 mM hasta aproximadamente 30 mM, desde aproximadamente 25 mM hasta aproximadamente 35 mM, aproximadamente 26 mM, aproximadamente 27 mM, aproximadamente 28 mM, aproximadamente 29 mM, aproximadamente 30 mM, aproximadamente 31 mM aproximadamente 32 mM, aproximadamente 33 mM o aproximadamente 34 mM.

50 En diversas realizaciones, la formulación comprende prolina a una concentración de aproximadamente 2 %, aproximadamente 3 %, aproximadamente 4 %, aproximadamente 5 %, aproximadamente 6 %, aproximadamente 7 %, aproximadamente 8 %, aproximadamente 9 %, aproximadamente 10 %.

55 En diversas realizaciones, el tampón de una formulación puede incluir uno o más excipientes. Una posible función de un excipiente incluido es proporcionar la estabilización del producto biofarmacéutico contra estreses que pueden ocurrir durante la fabricación, transporte y almacenamiento. Para realizar esto, al menos un excipiente puede funcionar como tampón, estabilizador, agente de tonicidad, agente de carga, tensioactivo, crioprotector, lioprotector, antioxidante, fuente de iones metálicos, agente quelante y/o conservante. Además, al menos un excipiente puede funcionar como diluyente y/o vehículo o emplearse para reducir la viscosidad en formulaciones de alta concentración para permitir su administración y/o potenciar la conveniencia del paciente.

Similarmente, al menos un excipiente puede conferir más de una de las funciones anteriores a una formulación. Alternativamente, se pueden incluir dos o más excipientes en una formulación para realizar más de una de las funciones anteriores u otras. Por ejemplo, se puede incluir un excipiente como un componente en una formulación para cambiar, ajustar u optimizar la osmolalidad de la formulación, actuando así como un tónico.

- 5 En diversas realizaciones, se pueden incluir ambos de un agente de tonicidad y un tensioactivo en una formulación para ajustar ambos la osmolalidad y/o controlar la agregación. Se conocen en la técnica excipientes, su uso, formulación y características y se pueden encontrar descritos en, por ejemplo, Wang W., *Int. J. Pharm.* 185:129-88 (1999) y Wang W., *Int. J. Pharm.* 203:1-60 (2000). En la patente de EE.UU. N° 6.171.586 B1 se trata una formulación que comprende un tampón acetato, un poliol, tensioactivo y anticuerpo.
- 10 Se ha informado de moléculas orgánicas pequeñas denominadas osmolitos para afectar la estabilidad de proteínas en diversas condiciones fisiológicas. A este respecto, una publicación ha tratado la prolina como un osmolito natural y su efecto sobre la agregación de proteínas *in vivo* e *in vitro* (Ignatova y Gierasch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103:13357-13361, publicación electrónica de 9 de agosto de 2006). Bolen y Baskakov (*J. Mol. Biol.* 310:955-963, 2001) también ha tratado prolina y osmolitos.
- 15 En general, los excipientes se pueden elegir basándose en los mecanismos por los que estabilizan las proteínas contra diversos estreses químicos y físicos. Puede ser beneficioso incluir ciertos excipientes para aliviar los efectos de un estrés específico o para regular una susceptibilidad particular de un producto biofarmacéutico específico. Puede ser beneficioso incluir otros excipientes debido a que pueden tener efectos más generales sobre las estabilidades físicas y covalentes de las proteínas. Algunos excipientes útiles pueden incluir los químicamente y
- 20 funcionalmente inocuos o compatibles con disoluciones de tampón acuosas y productos biofarmacéuticos para optimizar las propiedades de estabilidad de una formulación. Se describe en el presente documento que diversos de dichos excipientes presentan compatibilidad química con las formulaciones y compatibilidad funcional con el producto biofarmacéutico incluido en dichas formulaciones.

- 25 Por ejemplo, los excipientes elegidos para potenciar o conferir estabilidad a un producto biofarmacéutico dentro de una formulación pueden incluir los que están sustancialmente libres de reaccionar con grupos funcionales en el producto biofarmacéutico. A este respecto, se pueden usar tanto azúcares reductores como no reductores como excipiente en una formulación de la invención.

- Los excipientes también se pueden elegir para potenciar o proporcionar estabilización con referencia al modo de administración para una formulación. Por ejemplo, las vías parenterales de administración intravenosa (IV),
- 30 subcutánea (SC) o intramuscular (IM) pueden ser más seguras y eficaces cuando todos los componentes de formulación mantienen la estabilidad física y química durante la fabricación, almacenamiento y administración. Los expertos en la técnica pueden determinar cómo emplear uno o más excipientes que mantienen la máxima estabilidad de la forma activa de un producto biofarmacéutico dado, por ejemplo, una condición particular de fabricación o almacenamiento o un modo particular de administración.

- 35 La cantidad o concentración de excipiente a usar en una formulación puede variar dependiendo de, por ejemplo, la cantidad de producto biofarmacéutico incluido en la formulación, la cantidad de otros excipientes incluidos en la formulación deseada, si un diluyente se desea o necesita, la cantidad o volumen de otros componentes de formulación, la cantidad total de componentes dentro de una formulación, la actividad específica del producto biofarmacéutico y la tonicidad u osmolalidad deseadas a lograr. En diversas realizaciones, se pueden combinar
- 40 diferentes tipos de excipientes en una única formulación. Por consiguiente, una formulación puede contener un único excipiente, dos, tres o cuatro o más tipos diferentes de excipientes. Las combinaciones de excipientes pueden ser útiles conjuntamente con una formulación que contiene dos o más productos biofarmacéuticos diferentes. Los excipientes pueden presentar propiedades químicas similares o diferentes.

- 45 Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionada en el presente documento, los expertos en la técnica pueden determinar qué cantidad o intervalo de excipiente se puede incluir en cualquier formulación particular para lograr una formulación que promueve la retención en la estabilidad del producto biofarmacéutico. Por ejemplo, la cantidad y tipo de una sal a incluir en una formulación se pueden seleccionar basándose en la osmolalidad deseada (es decir, isotónica, hipotónica o hipertónica) de la disolución final, así como las cantidades y osmolalidad de otros componentes a incluir en la formulación. Similarmente, con referencia al tipo de poliol o azúcar incluido en una
- 50 formulación, la cantidad de dicho excipiente puede depender de su osmolalidad. La inclusión de aproximadamente 5 % de sorbitol puede lograr la isotonicidad, mientras que puede ser necesario aproximadamente 9 % de un excipiente de sacarosa para lograr la isotonicidad. Los expertos en la técnica entenderán que las consideraciones descritas en el presente documento referentes a los excipientes pueden ser igualmente aplicables a todos los tipos y combinaciones de excipientes que incluyen, por ejemplo, sales, aminoácidos, otros agentes de tonicidad,
- 55 tensioactivos, estabilizadores, agentes de carga, crioprotectores, lioprotectores, antioxidantes, iones metálicos, agentes quelantes y/o conservantes.

Los excipientes se pueden incluir en una formulación de la invención en intervalos de concentración generalmente entre aproximadamente 1-40 % (p/v), entre aproximadamente 5-35 % (p/v), entre aproximadamente 10-30 % (p/v), entre aproximadamente 15-25 % (p/v), aproximadamente 3 %, aproximadamente 10 % o aproximadamente 20 %

(p/v). En ciertos casos se pueden emplear concentraciones de hasta aproximadamente 45 % (p/v), 50 % (p/v) o superiores a 50 % (p/v) en las formulaciones de la invención. Por ejemplo, en algunos casos, se puede desear incluir concentraciones hasta 60 % (p/v) o 75 % (p/v) para producir una formulación hipertónica. Dichas disoluciones hipertónicas se pueden diluir para producir una formulación isotónica antes de uso, si se desea. Otros intervalos útiles de concentración incluyen entre aproximadamente 1-20 %, particularmente entre aproximadamente 2-18 % (p/v), más particularmente entre aproximadamente 4-16 % (p/v), incluso más particularmente entre aproximadamente 6-14 % (p/v) o entre aproximadamente 8-12 % (p/v) o aproximadamente 10 % (p/v). En diversas realizaciones, también se pueden usar en una formulación concentraciones y/o cantidades de excipiente inferiores, superiores o entre estos intervalos. Por ejemplo, se pueden incluir uno o más excipientes en una formulación que constituya menos de aproximadamente 1 % (p/v). Similarmente, una formulación puede contener una concentración de uno o más excipientes superior a aproximadamente 40 % (p/v). Por consiguiente, se puede producir una formulación que contiene una concentración o cantidad deseada de uno o más excipientes que incluyen, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 o 20 % (p/v) o más.

Diversos excipientes que pueden ser útiles en tanto una formulación líquida como liofilizada comprenden fucosa, celobiosa, maltotriosa, melibiosa, octulosa, ribosa, xilitol, arginina, histidina, glicina, alanina, metionina, ácido glutámico, lisina, imidazol, glicilglicina, manosilglicerato, Triton X-100, Pluoronic F-127, celulosa, ciclodextrina, dextrano (10, 40 y/o 70 kD), polidextrosa, maltodextrina, ficoll, gelatina, hidroxipropilmet, fosfato de sodio, fosfato de potasio, ZnCl₂, cinc, óxido de cinc, citrato de sodio, citrato de trisodio, trometamina, cobre, fibronectina, heparina, albúmina de suero humano, protamina, glicerina, glicerol, EDTA, metacresol, alcohol bencílico y fenol. Diversos excipientes conocidos en la técnica se describen en, por ejemplo, Wang W., *Int. J. Pharm.* 185:129-88 (1999) y Wang W., *Int. J. Pharm.* 203:1-60 (2000).

Una función de los tensioactivos en una formulación puede ser prevenir o minimizar la agregación y/o adsorción tal como degradación inducida en la superficie. A concentraciones suficientes, generalmente aproximadamente la concentración micelar del tensioactivo, una capa superficial de moléculas de tensioactivo pueden servir para prevenir que las moléculas de proteínas se adsorban en la interfase. Así, se puede minimizar la degradación inducida en la superficie. Se conocen en la técnica los tensioactivos, su uso, formulación y características para las formulaciones y se pueden encontrar descritas en, por ejemplo, Randolph T.W. y Jones L.S., *Surfactant-protein interactions. Pharm. Biotechnol.* 13:159-75 (2002).

Un tensioactivo para inclusión en una formulación se puede elegir, por ejemplo, para potenciar o promover la retención en la estabilidad del producto biofarmacéutico previniendo o reduciendo la agregación y/o adsorción. Los ésteres de ácidos grasos de sorbitano tales como los polisorbatos son tensioactivos que presentan un amplio intervalo de características hidrófilas y emulsionantes. Se pueden usar individualmente o en combinación con otros tensioactivos para cubrir un amplio intervalo de necesidades de estabilización. Dichas características pueden ser adecuadas para su uso con productos biofarmacéuticos debido a que se pueden adaptar para cubrir el amplio intervalo de características hidrófobas e hidrófilos de los productos biofarmacéuticos. Las consideraciones para seleccionar un tensioactivo incluyen las descritas previamente con referencia a los excipientes en general, así como el carácter hidrófobo y la concentración micelar crítica del tensioactivo. Los tensioactivos ejemplificados en el presente documento, así como muchos otros bien conocidos en la técnica, se pueden usar en las formulaciones descritas en la memoria descriptiva.

Los intervalos de concentración de tensioactivo para una formulación incluyen los descritos previamente con referencia a los excipientes en general, por ejemplo, concentraciones útiles pueden ser inferiores a aproximadamente 1 % (p/v). A este respecto, las concentraciones de tensioactivo se pueden usar generalmente a intervalos entre aproximadamente 0,001-0,10 % (p/v), entre aproximadamente 0,002-0,05 % (p/v), entre aproximadamente 0,003-0,01 % (p/v), entre aproximadamente 0,004-0,008 % (p/v) o entre aproximadamente 0,005-0,006 % (p/v). También se pueden usar concentraciones y/o cantidades de tensioactivo inferiores, superiores o entre estos intervalos. Por ejemplo, se pueden incluir uno o más tensioactivos en una formulación que constituyen menos de aproximadamente 0,001 % (p/v). Similarmente, una formulación puede contener una concentración de uno o más tensioactivos superior a aproximadamente 0,10 % (p/v). Por consiguiente, se puede producir una formulación que contiene esencialmente cualquier concentración o cantidad deseada de uno o más tensioactivos que incluyen, por ejemplo, aproximadamente 0,001, 0,002, 0,003, 0,004, 0,005, 0,006, 0,007, 0,008, 0,009, 0,010, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09 o 0,10 % (p/v) o más.

Los tensioactivos útiles en cualquiera de una formulación líquida o liofilizada pueden incluir, por ejemplo, ésteres de azúcar tales como ésteres de ácido láurico (C12), ácido palmítico (C16), ácido esteárico (C18), macrogolcetoestearil éteres, macrogol lauril éteres, macrogololeil éter, oleato de macrogol, estearato de macrogol, ricinoleato de macrogolglicerol, hidroxiestearato de macrogolglicerol; poliglucósidos de alquilo tales como glucósido de octilo y maltósido de decilo; alcoholes grasos tales como alcohol cetílico y alcohol oleico, y cocamidas tales como cocamida MEA, DEA, TEA, otros tensioactivos no iónicos y otros tensioactivos iónicos.

Las formulaciones proporcionadas en el presente documento pueden comprender un polipéptido terapéutico como componente de formulación. El polipéptido terapéutico es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno.

Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionada en el presente documento, los expertos en la técnica entenderán que una formulación descrita en el presente documento puede ser igualmente aplicable a muchos tipos de productos biofarmacéuticos, que incluyen los ejemplificados, así como otros conocidos en la técnica. Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionada en el presente documento, los expertos en la técnica también entenderán que la selección de, por ejemplo, tipo(s) o y/o cantidad(es) de uno o más excipientes, tensioactivos y/o componentes opcionales se puede hacer basándose en la compatibilidad química y funcional con el producto biofarmacéutico a formular y/o el modo de administración, así como otros factores químicos, funcionales, fisiológicos y/o médicos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, como se describe previamente, los azúcares no reductores presentan propiedades de excipiente favorables cuando se usan con productos biofarmacéuticos de polipéptido en comparación con los azúcares reductores. Por consiguiente, las formulaciones de la invención se ejemplifican más adelante con referencia a productos biofarmacéuticos de polipéptido.

En diversas realizaciones, diversos tipos de productos biofarmacéuticos de polipéptido aplicables para su uso en una formulación pueden incluir diferentes tipos de polipéptidos terapéuticos, por ejemplo, la superfamilia de inmunoglobulinas de polipéptidos, factores de crecimiento, citocinas, moléculas de señalización de células y hormonas. Los productos biofarmacéuticos de polipéptido a modo de ejemplo aplicables para su uso en una formulación pueden incluir muchos polipéptidos terapéuticos diferentes que incluyen, por ejemplo, anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos, interleucinas, G-CSF, GM-CSF, cinasas, ligandos de TNF y TNFR que incluyen Fhm, ciclinas, eritropoyetina, factor de crecimiento nervioso (NGF), gen inducido por el factor de crecimiento nervioso regulado por el desarrollo VGF, factores neurotróficos, factor neurotrófico NNT-1, receptor de Eph, ligando del receptor de Eph; receptor de tipo Eph, ligandos del receptor de tipo Eph, inhibidores de las proteínas de la apoptosis (IAP), proteína específica de Thy-1, ligando de Hek (hek-L), receptor de Elk y ligandos del receptor de Elk, STATs, inhibidor de colagenasa, osteoprotegerina (OPG), APRIL/G70, AGP-3/BLYS, BCMA, TACI, Her-2/neu, polipéptidos de apolipoproteína, integrinas, extendinas, insulinas, hormonas de crecimiento, hormonas foliculoestimulantes, gonadotropinas, inhibidor tisular de metaloproteinasas, receptor del complemento C3b/C4b, proteína de unión a SHC, polipéptidos de DKR, polipéptidos de la matriz extracelular, anticuerpos contra los polipéptidos terapéuticos anteriores y fragmentos funcionales de anticuerpo de los mismos, anticuerpos contra receptores para los polipéptidos terapéuticos anteriores y fragmentos funcionales de anticuerpo de los mismos, fragmentos de polipéptidos funcionales de los mismos, polipéptidos de fusión y polipéptidos quiméricos.

Los ejemplos de productos biofarmacéuticos comercialmente disponibles que se pueden usar en diversas realizaciones de las formulaciones pueden incluir, por ejemplo, (Etanercept; una proteína de fusión dimérica expresada en CHO (Amgen Inc.)); (epoetina alfa; una glucoproteína expresada en célula de mamífero (Amgen Inc.)); (Interferón alfacon-1; una proteína recombinante expresada en *E. coli* (Amgen Inc.)); (anakinra; una forma no glucosilada recombinante expresada en *E. coli* del antagonista de receptor de interleucina-1 humana (IL-1Ra) (Amgen Inc.)); (darbepoetina alfa; una proteína estimulante de la eritropoyesis humana recombinante expresada en CHO (Amgen Inc.)); (pegfilgrastim; conjugado covalente de G-CSF humano con metionilo recombinante y PEG de 20 kD (Amgen Inc.)); (Filgrastim; un factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF) humano expresado en *E. coli* (Amgen Inc.)), (Ancestim, factor de células madre; una proteína humana recombinante expresada en *E. coli* (Amgen Inc.)), (panitumumab; un anticuerpo contra el receptor de EGF (Amgen Inc.)) o denosumab (un anticuerpo contra RANKL (Amgen Inc.)). Estos y otros productos biofarmacéuticos disponibles se pueden usar en las formulaciones descritas en el presente documento, en el momento de la producción, antes de uso y/o antes del almacenamiento a corto o largo plazo.

Un producto biofarmacéutico puede ser un anticuerpo. Se describen a continuación anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos y fragmentos de unión al antígeno, que se pueden emplear como polipéptidos terapéuticos en diversas realizaciones. Como se ha descrito previamente, las propiedades químicas y físicas, consideraciones de formulación y metodología aplicable a los anticuerpos y fragmentos funcionales de los mismos, pueden ser similarmente aplicables a productos biofarmacéuticos que incluyen productos biofarmacéuticos de polipéptido.

Un anticuerpo o inmunoglobulina es un polipéptido que tiene afinidad específica por una diana o antígeno molecular. La diana puede existir de forma natural en cualquier especie, que incluye humana, monos, ratones, perros, gatos y conejos. En diversas realizaciones, la diana puede ser una variante de una proteína que existe de forma natural. Dichas variantes incluyen variantes con una o más sustituciones, deleciones o adiciones de aminoácidos. En ciertas realizaciones, la diana incluye deleciones de uno o más dominios de una proteína que existe de forma natural.

Los anticuerpos pueden ser monoclonales o policlonales. Un anticuerpo monoclonal se puede referir a un anticuerpo que es el producto de un clon de una única célula o hibridoma. Anticuerpo monoclonal también se puede referir a un anticuerpo producido por métodos recombinantes de cadena pesada y ligera que codifica genes de inmunoglobulina para producir una única especie de inmunoglobulina molecular. Las secuencias de aminoácidos para anticuerpos dentro de una preparación de anticuerpo monoclonal son sustancialmente homogéneas y la actividad de unión de anticuerpos dentro de dicha preparación puede presentar sustancialmente la misma actividad de unión al antígeno cuando se compara en el mismo ensayo de unión o similar. Como se describe más adelante, se conocen en la técnica diversas características de anticuerpos y anticuerpos monoclonales.

Se pueden preparar anticuerpos monoclonales usando una amplia variedad de métodos conocidos en la técnica que incluyen el uso de metodologías de hibridoma, recombinantes, expresadas en líneas celulares de mieloma, presentación en fagos y bibliotecas combinatorias de anticuerpos, o una combinación de las mismas. Por ejemplo, se pueden producir anticuerpos monoclonales usando técnicas de hibridomas que incluyen las conocidas en la técnica y enseñadas, por ejemplo, en Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989); Hammerling, et al., en: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681, Elsevier, N.Y. (1981); Harlow et al., *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1999), y *Antibody Engineering: A Practical Guide*, C.A.K. Borrebaeck, Ed., W.H. Freeman and Co., Publishers, New York, pp. 103-120 (1991). Los ejemplos de métodos conocidos para producir anticuerpos monoclonales por métodos recombinantes, de presentación en fagos y de bibliotecas combinatorias de anticuerpos, que incluyen bibliotecas derivadas de animales inmunizados e intactos, se pueden encontrar descritos en *Antibody Engineering: A Practical Guide*, C.A.K. Borrebaeck, Ed., W.H. Freeman and Co., Publishers, New York, pp. 103-120 (1991).

Un anticuerpo monoclonal para su uso como un producto biofarmacéutico no se limita a los anticuerpos producidos mediante tecnología de hibridomas. Más bien, como se describe previamente, un anticuerpo monoclonal se refiere a un anticuerpo que deriva de un único clon, que incluye cualquier eucariota, procariota, o clon de fago, y no necesariamente por el método con el que se produce.

Un fragmento funcional de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se refiere a una porción de un anticuerpo que retiene alguna o toda de su actividad de unión específica de diana. Dichos fragmentos funcionales pueden incluir, por ejemplo, fragmentos tales como Fd, Fv, Fab, F(ab)', F(ab)2, F(ab')2, Fv monocatenario (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, pepticuerpo y minicuerpo. Otros fragmentos funcionales pueden incluir, por ejemplo, polipéptidos de cadena pesada (H) o ligera (L), polipéptidos de la región variable de la cadena pesada (VH) y variable de la cadena ligera (VL), polipéptidos de la región determinante de la complementariedad (CDR), anticuerpos de un solo dominio, y polipéptidos que contienen al menos una porción de una inmunoglobulina que es suficiente para retener la actividad de unión específica de diana.

"Pepticuerpo" se refiere a una molécula que comprende un dominio Fc de anticuerpo (es decir, dominios de anticuerpo C_H2 y C_H3) que excluye el anticuerpo C_H1, C_L, V_H, y dominios V_L así como Fab y F(ab)2, en donde el dominio Fc está unido a uno o más péptidos, preferentemente un péptido farmacológicamente activo, particularmente preferentemente un péptido farmacológicamente activo generado al azar. La producción de pepticuerpos generalmente se describe en la publicación PCT WO00/24782, publicada el 4 de mayo de 2000.

Los pepticuerpos también están incluidos en el presente documento como un fragmento funcional de anticuerpo. Dichos fragmentos de unión de anticuerpo se pueden encontrar descritos en, por ejemplo, Harlow y Lane, arriba; *Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference* (Myers, R.A. (ed.), New York: VCH Publisher, Inc.); Huston et al., *Cell Biophysics*, 22:189-224 (1993); Plückerthun y Skerra, *Meth. Enzymol.*, 178:497-515 (1989) y en Day, E.D., *Advanced Immunochemistry*, Segunda Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY (1990).

Con respecto a los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos funcionales de los mismos que presentan características de unión beneficiosas a una molécula diana, se conocen en la técnica diversas formas, alteraciones y modificaciones. Los anticuerpos monoclonales específicos de diana para su uso en una formulación pueden incluir cualquiera de dichas diversas formas de anticuerpos monoclonales, alteraciones y modificaciones. Se exponen más adelante ejemplos de dichas diversas formas y términos como se conocen en la técnica.

Un fragmento Fab se refiere a un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; un fragmento F(ab)2 es un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra pero que carece de Fc; un fragmento Fd consiste en los dominios VH y CH1; un fragmento Fv consiste en los dominios VL y VH de un único brazo de un anticuerpo; y un fragmento dAb (Ward et al., *Nature* 341:544-546, (1989)) consiste en un dominio VH.

Un anticuerpo puede tener uno o más sitios de unión. Si existe más de un sitio de unión, los sitios de unión pueden ser idénticos entre sí o pueden ser diferentes. Por ejemplo, una inmunoglobulina que existe de forma natural tiene dos sitios de unión idénticos, un anticuerpo monocatenario o fragmento Fab tiene un sitio de unión, mientras que un anticuerpo "biespecífico" o "bifuncional" tiene dos sitios de unión diferentes.

Un anticuerpo monocatenario (scFv) se refiere a un anticuerpo en el que una región VL y una VH se unen mediante un conector (por ejemplo, una secuencia sintética de restos de aminoácidos) para formar una cadena de polipéptidos continua en donde el conector es lo suficientemente largo como para permitir que la cadena de proteína se pliegue sobre sí misma y forme un sitio de unión al antígeno monovalente (véase, por ejemplo, Bird et al., *Science* 242:423-26 (1988) y Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83 (1988)). Diacuerpos se refiere a anticuerpos bivalentes que comprenden dos cadenas de polipéptidos, en donde cada cadena de polipéptidos comprende dominios VH y VL unidos por un conector que es demasiado corto para permitir el emparejamiento entre dos dominios en la misma cadena, permitiendo así que cada dominio se empareje con un dominio complementario en otra cadena de polipéptidos (véase, por ejemplo, Holliger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48 (1993), y Poljak et al., *Structure* 2:1121-23 (1994)). Si las dos cadenas de polipéptidos de un diacuerpo son idénticas, entonces un diacuerpo resultante de su emparejamiento tendrá dos sitios de unión al antígeno idénticos. Se pueden

usar las cadenas de polipéptidos que tienen diferentes secuencias para preparar un diacuerpo con dos sitios de unión al antígeno diferentes. Similarmente, los tricuerpos y tetracuerpos son anticuerpos que comprenden tres y cuatro cadenas de polipéptidos, respectivamente, y que forman tres y cuatro sitios de unión al antígeno, respectivamente, que pueden ser iguales o diferentes.

- 5 Una CDR se refiere a una región que contiene uno de los tres bucles hipervariables (H1, H2 o H3) dentro de la región no estructural de la región estructural en hoja β de VH de inmunoglobulina (Ig o anticuerpo), o una región que contiene uno de los tres bucles hipervariables (L1, L2 o L3) dentro de la región no estructural de la región estructural en hoja β de VL del anticuerpo. Por consiguiente, las CDRs son secuencias de la región variable intercaladas dentro de las secuencias de la región estructural. Las regiones CDR se conocen por los expertos en la técnica y se han definido por, por ejemplo, Kabat como las regiones de mayor hipervariabilidad dentro de los dominios variables variable (V) del anticuerpo (Kabat et al., J. Biol. Chem. 252:6609-6616 (1977); Kabat, Adv. Prot. Chem. 32:1-75 (1978)). Las secuencias de la región CDR también se han definido estructuralmente por Chothia como los restos que no son parte de la región estructural de la hoja β conservada, y así son capaces de adaptar diferentes conformaciones (Chothia y Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Ambas terminologías son bien reconocidas en la técnica. Se han determinado las posiciones de CDRs dentro de un dominio variable canónico de anticuerpo por comparación de numerosas estructuras (Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927-948 (1997); Morea et al., Methods 20:267-279 (2000)). Debido a que el número de restos dentro de un bucle varía en diferentes anticuerpos, restos de bucles adicionales con respecto a las posiciones canónicas se numeran convencionalmente con a, b, c, etc., a continuación del número de resto en el esquema de numeración de dominios variables canónicos (Al-Lazikani et al., supra (1997)). Dicha nomenclatura es similarmente conocida para los expertos en la técnica.

Por ejemplo, las CDRs definidas según cualquiera de las designaciones de Kabat (hipervariable) o Chothia (estructural) se exponen en la siguiente tabla.

Tabla 1: Definiciones de CDR

	Kabat ¹	Chothia ²	Localización del bucle
V _H CDR1	31-35	26-32	uniendo las cadenas B y C
V _H CDR2	50-65	53-55	uniendo las cadenas C' y C''
V _H CDR3	95-102	96-101	uniendo las cadenas F y G
V _L CDR1	24-34	26-32	uniendo las cadenas B y C
V _L CDR2	50-56	50-52	uniendo las cadenas C' y C''
V _L CDR3	89-97	91-96	uniendo las cadenas F y G

¹La numeración de restos sigue la nomenclatura de Kabat et al., arriba

²La numeración de restos sigue la nomenclatura de Chothia et al., arriba

- 25 Un anticuerpo quimérico se refiere a un anticuerpo que contiene una o más regiones de un anticuerpo y una o más regiones de uno o varios de otros anticuerpos. En un ejemplo, una o más de las CDRs derivan de un anticuerpo humano no donante que tiene actividad específica por una molécula diana y la región estructural de la región variable deriva de un anticuerpo receptor humano. En otro ejemplo, todas las CDRs pueden derivar de un anticuerpo humano no donante que tiene actividad específica por una molécula diana y la región estructural de la región variable deriva de un anticuerpo de receptor humano. En otro ejemplo específico más, se mezclan las CDRs de más de un anticuerpo específico de diana no humano y se corresponden en un anticuerpo quimérico. Por ejemplo, un anticuerpo quimérico puede incluir una CDR1 de la cadena ligera de un primer anticuerpo específico de diana no humano, una CDR2 y una CDR3 de la cadena ligera de un segundo anticuerpo específico de diana no humano y las CDRs de la cadena pesada de un tercer anticuerpo específico de diana. Además, las regiones estructurales pueden derivar de uno de los mismos anticuerpos humanos o de uno o más anticuerpos humanos diferentes o de un anticuerpo humanizado. Se pueden producir anticuerpos quiméricos donde tanto los anticuerpos donantes como receptores son humanos.

- 40 Un anticuerpo humanizado o anticuerpo injertado tiene una secuencia que se diferencia de una secuencia de anticuerpos de especie no humana por una o más sustituciones, deleciones y/o adiciones de aminoácidos, de forma que sea menos probable que el anticuerpo humanizado induzca una respuesta inmunitaria, y/o induzca una respuesta inmunitaria menos fuerte, en comparación con el anticuerpo de especie no humana, cuando se administra a un sujeto humano. En un ejemplo, se pueden cambiar ciertos aminoácidos en la región estructural y dominios constantes de las cadenas pesadas y/o ligeras del anticuerpo de especie no humana para producir el anticuerpo humanizado. En otro ejemplo, se pueden fusionar el (los) dominio(s) constante(s) de un anticuerpo humano con el

(los) dominio(s) variable(s) de una especie no humana. Los ejemplos de cómo preparar anticuerpos humanizados se pueden encontrar en las patentes de EE.UU. N° 6.054.297, 5.886.152 y 5.877.293. Los anticuerpos humanizados también incluyen anticuerpos producidos usando métodos de acondicionamiento superficial de anticuerpos.

5 Un anticuerpo humano se refiere a anticuerpos que tienen una o más regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulina humana. Por ejemplo, un anticuerpo completamente humano incluye un anticuerpo donde todos los dominios variables y constantes derivan de secuencias de inmunoglobulina humana. Se pueden preparar anticuerpos humanos usando una variedad de métodos conocidos en la técnica.

10 También se pueden incorporar una o más CDRs en una molécula ya sea covalentemente o no covalentemente para convertirla en una inmunoadhesina. Una inmunoadhesina puede incorporar las CDR(s) como parte de una cadena de polipéptidos mayor, puede unir covalentemente la(s) CDR(s) con otra cadena de polipéptidos, o puede incorporar la(s) CDR(s) no covalentemente. Las CDRs permiten que la inmunoadhesina se una específicamente a un antígeno de interés particular.

15 Un anticuerpo neutralizante o un anticuerpo inhibidor se refiere a un anticuerpo monoclonal específico de diana que inhibe la unión de la molécula diana a su componente de unión cuando un exceso del anticuerpo monoclonal específico de diana reduce la cantidad de componente de unión unido a la diana. La inhibición de la unión puede ocurrir en al menos aproximadamente 10 %, particularmente en al menos aproximadamente 20 %. En diversos ejemplos específicos, el anticuerpo monoclonal puede reducir la cantidad de componente de unión unido a la diana, por ejemplo, en al menos aproximadamente 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 99 % y 99,9 %. La reducción de la unión se puede medir mediante cualquier medio conocido para un experto habitual en la técnica, por ejemplo, como se mide en un ensayo de unión competitiva *in vitro*.

20 Un anticuerpo antagonista se refiere a un anticuerpo que inhibe la actividad de una molécula diana cuando se añade a una célula, tejido u organismo que expresa la molécula diana. La disminución en la actividad puede ser en al menos aproximadamente 5 %, particularmente en al menos aproximadamente 10 %, más particularmente, en al menos aproximadamente 15 % o más, en comparación con el nivel de actividad de la molécula diana en presencia de componente de unión solo. En diversos ejemplos específicos, los anticuerpos monoclonales específicos de diana para su uso como un producto biofarmacéutico de la invención pueden inhibir la actividad de la molécula diana en al menos aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % o 100 %.

25 Al igual que con los anticuerpos monoclonales específicos de diana anteriormente descritos, en realizaciones adicionales, los anticuerpos monoclonales específicos de diana para su uso en diversas realizaciones pueden incluir anticuerpos monoclonales que presentan actividad antagonista de molécula diana. Una actividad antagonista de molécula diana disminuye al menos una función o actividad de la molécula diana cuando se une o estimula por su componente de unión. Dichas funciones pueden incluir, por ejemplo, estimulación o inhibición de la regulación celular, regulación génica, regulación de proteínas, transducción de señales, proliferación celular, diferenciación, migración, supervivencia celular, o cualquier otra función bioquímica y/o fisiológica. También se pueden reducir o
35 inhibir otras funciones o actividades de una molécula diana por anticuerpos monoclonales específicos de diana antagonistas para su uso como un producto biofarmacéutico de la invención. Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionada en el presente documento, los expertos en la técnica serán capaces de preparar e identificar una amplia variedad de anticuerpos monoclonales específicos de diana que presenten diferentes actividades antagonistas.

40 Los anticuerpos monoclonales específicos de diana antagonistas se pueden producir e identificar como se describe en el presente documento. Un método específico de identificación de anticuerpos monoclonales específicos de diana antagonistas incluye poner en contacto un anticuerpo monoclonal específico de diana con una célula que expresa la molécula diana que es sensible a su componente de unión en presencia de componente de unión u otro agonista. La puesta en contacto se realiza en condiciones suficientes para la unión y se puede determinar una disminución o
45 reducción en una función o actividad de molécula diana. Los anticuerpos monoclonales específicos de diana que disminuyen, reducen o prohíben al menos una función o actividad de la diana se identifican como que son un anticuerpo monoclonal antagonista específico de diana.

50 Un anticuerpo agonista se refiere a un anticuerpo que activa una molécula diana en al menos aproximadamente 5 %, particularmente en al menos aproximadamente 10 %, o aproximadamente 15 % cuando se añade a una célula, tejido u organismo que expresa la molécula diana, donde 100 % de activación es el nivel de activación logrado en condiciones fisiológicas por la misma cantidad molar de componente de unión. En diversos ejemplos específicos, los anticuerpos monoclonales específicos de diana para su uso como un producto biofarmacéutico de la invención pueden activar la actividad de la molécula diana en al menos aproximadamente 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 350 %, 400 %, 450 %, 500 %, 750 % o
55 1000 %.

En realizaciones adicionales, los anticuerpos monoclonales específicos de diana para su uso en diversas realizaciones pueden incluir anticuerpos monoclonales que presentan la actividad agonista de la molécula diana. Un agonista de la actividad de la molécula diana se refiere a una molécula que aumenta al menos una función o actividad de la molécula diana cuando se une a su componente de unión. Las actividades que se pueden aumentar

incluyen, por ejemplo, las descritas previamente con respecto a las actividades antagonistas. Por consiguiente, los anticuerpos monoclonales específicos de diana que tienen la actividad de antagonista de la molécula diana disminuyen, reducen o previenen una o más funciones celulares o actividades de una molécula diana. Los anticuerpos monoclonales específicos de diana que tienen actividad agonista de la molécula diana incrementan, promueven o estimulan una o más funciones celulares o actividades de una molécula diana. Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionada en el presente documento, los expertos en la técnica serán capaces de preparar e identificar una amplia variedad de anticuerpos monoclonales específicos de diana que presentan diferentes actividades antagonistas o agonistas.

Dadas las enseñanzas y la orientación proporcionada en el presente documento, los expertos en la técnica pueden emplear métodos de inmunización, producción de hibridomas, expresión de líneas de células de mieloma y métodos de cribado bien conocidos en la técnica para producir anticuerpos monoclonales específicos de diana agonistas. Un método de identificación de anticuerpos monoclonales específicos de diana agonistas incluye poner en contacto un anticuerpo monoclonal específico de diana con una célula que expresa la molécula diana que es sensible al componente de unión de la molécula diana en condiciones suficientes para unir y determinar la estimulación o aumento en una función o actividad de moléculas diana. Esos anticuerpos monoclonales específicos de diana que aumentan, estimulan o promueven al menos una función o actividad de molécula diana se identifican como que son un anticuerpo monoclonal agonista específico de diana.

Un epítipo se refiere a una parte de una molécula, por ejemplo, una porción de un polipéptido, que se une específicamente a uno o más anticuerpos dentro del sitio de unión al antígeno del anticuerpo. Los determinantes epitópicos pueden incluir regiones continuas o no continuas de la molécula que se unen a un anticuerpo. Los determinantes epitópicos también pueden incluir agrupaciones de moléculas químicamente superficialmente activas tales como aminoácidos o cadenas laterales de azúcar y tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específica.

Unión específica se refiere a un anticuerpo monoclonal específico de diana que presenta unión preferencial por una molécula diana en comparación con otras moléculas relacionadas, pero no diana, o en comparación con otras moléculas no diana. La unión preferencial incluye un anticuerpo monoclonal para su uso como un producto biofarmacéutico de la invención que presenta unión detectable a su molécula diana, mientras que presenta poca o ninguna unión detectable a otra molécula relacionada pero no diana.

Se puede determinar la unión específica por cualquiera de una variedad de mediciones conocidas por los expertos en la técnica que incluyen, por ejemplo, afinidad (K_a o K_d), constante de asociación (K_{as}), constante de disociación (K_{dis}), avidéz o una combinación de las mismas. Se puede emplear cualquiera de una variedad de métodos o mediciones bien conocidos en la técnica y son aplicables para determinar la actividad de unión específica de diana. Dichos métodos y mediciones incluyen, por ejemplo, unión aparente o relativa entre una molécula diana y una molécula no diana. Se pueden emplear tanto mediciones cuantitativas como cualitativas para hacer dichas determinaciones de unión aparente o relativa. Los ejemplos específicos de las determinaciones de unión incluyen, por ejemplo, ensayos de unión competitiva, metodología de transferencia de proteínas o Western, ELISA, RIA, resonancia de plasmones superficiales, metodología de ondas evanescentes, citometría de flujo y/o microscopía confocal.

Además, se puede determinar la unión específica de anticuerpos monoclonales específicos de diana antagonistas o agonistas por cualquiera de los métodos descritos anteriormente o más adelante que incluyen, por ejemplo, determinar un cambio en una función celular o actividad. Se conocen en la técnica métodos de medición de un cambio en la función celular o actividad tales como proliferación, diferenciación u otra función bioquímica y/o fisiológica. Al igual que con los ensayos de unión descritos previamente, se pueden emplear mediciones cuantitativas y cualitativas para hacer determinaciones aparentes o relativas con respecto a la antagonización o agonización de una o más funciones celulares.

Se pueden producir anticuerpos monoclonales específicos de diana para su uso como un producto biofarmacéutico de la invención, o fragmentos funcionales de los mismos, en cualquiera de las diversas formas de anticuerpo y/o se pueden alterar o modificar en cualquiera de las diversas formas como se ha descrito previamente, mientras que todavía mantienen su actividad de unión específica de diana. Se pueden usar cualquiera de dichas formas de anticuerpo, alteraciones o modificaciones, que incluyen combinaciones de las mismas, de un anticuerpo monoclonal específico de diana, o fragmento funcional del mismo, como producto biofarmacéutico. Se pueden usar similarmente cualquiera de dichas diversas formas de anticuerpo, alteraciones o modificaciones de un anticuerpo monoclonal específico de diana para su uso como un producto biofarmacéutico, o un fragmento funcional del mismo, en los métodos, composiciones y/o artículos de fabricación descritos en el presente documento. Por ejemplo, anticuerpos monoclonales específicos de diana, o fragmentos funcionales de los mismos, pueden incluir anticuerpos monoclonales injertados específicos de diana, humanizados, Fd, Fv, Fab, F(ab)₂, scFv y de peptidocuerpo, así como todas las otras formas, alteraciones y/o modificaciones descritas previamente, y que incluyen otras formas bien conocidas para los expertos en la técnica.

Se conocen en la técnica métodos de producción de hibridomas y cribado de anticuerpos monoclonales específicos de diana usando tecnología de hibridomas. Por ejemplo, se pueden inmunizar ratones con una molécula diana tal

como un polipéptido y una vez se detecta una respuesta inmunitaria, por ejemplo, se detectan anticuerpos específicos para la molécula diana en el suero de ratón, se recoge el bazo del ratón y se aíslan los esplenocitos. Entonces, los esplenocitos se fusionan por métodos bien conocidos con cualquier célula de mieloma adecuada, por ejemplo, células de la línea celular SP20 disponible de ATCC. Se seleccionan hibridomas y se clonan por dilución limitante. Entonces se ensayan los clones de hibridoma por métodos conocidos en la técnica para células que secretan anticuerpos capaces de unirse a molécula diana. Se puede generar líquido ascítico, que generalmente contiene altos niveles de anticuerpos, inmunizando ratones con clones de hibridoma positivos.

Además, se puede usar expresión recombinante en hospedadores procariotas o eucariotas para generar anticuerpos monoclonales específicos de diana. La expresión recombinante se puede utilizar para producir especies únicas de anticuerpo monoclonal específico de diana, o fragmentos funcionales de los mismos. Alternativamente, se puede utilizar la expresión recombinante para producir diversas bibliotecas de combinaciones de cadenas pesadas y ligeras, o pesadas variables y ligeras variables, y luego se criban para un anticuerpo monoclonal, o fragmento funcional del mismo, que presente actividad de unión específica por la molécula diana. Por ejemplo, se pueden co-expresar cadenas pesadas y ligeras, dominios variables de cadenas pesadas y ligeras, o fragmentos funcionales de los mismos, a partir de ácidos nucleicos que codifican anticuerpos monoclonales específicos de diana usando métodos bien conocidos en la técnica para producir especies de anticuerpos monoclonales específicos. Se pueden producir bibliotecas usando métodos bien conocidos en la técnica a partir de poblaciones co-expresadas de ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y ligeras, dominios variables de cadenas pesadas y ligeras, o fragmentos funcionales de los mismos, y cribar por unión por afinidad a la molécula diana para identificación de anticuerpos monoclonales específicos de diana. Dichos métodos se pueden encontrar descritos en, por ejemplo, *Antibody Engineering: A Practical Guide*, C.A.K. Borrebaeck, Ed., arriba; Huse et al., *Science* 246:1275-81 (1989); Barbas et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:7978-82 (1991); Kang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4363-66 (1991); Plückerthun y Skerra, arriba; Felici et al., *J. Mol. Biol.* 222:301-310 (1991); Lerner et al., *Science* 258:1313-14 (1992), y en la patente de EE.UU. N° 5.427.908.

La clonación de ácidos nucleicos codificantes se puede llevar a cabo usando métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Similarmente, la clonación de repertorios de cadenas pesadas y/o ligeras de ácido nucleico codificante, que incluye ácidos nucleicos que codifican VH y/o VL, también se puede llevar a cabo por métodos bien conocidos por los expertos en la técnica. Dichos métodos incluyen, por ejemplo, clonación por expresión, cribado por hibridación con una sonda complementaria, reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando un par de cebadores complementarios o reacción en cadena de la ligasa (LCR) usando un cebador complementario, y PCR con transcriptasa inversa (RT-PCR). Dichos métodos se pueden encontrar descritos en, por ejemplo, Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Tercera Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001) y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999).

Los ácidos nucleicos codificantes también se pueden obtener de cualquiera de las diversas bases de datos públicas que incluyen bases de datos del genoma completo tales como las operadas por el Centro Nacional para Información Biotecnológica (NCBI) de los Institutos Nacionales de Salud (NIH). Se puede llevar a cabo un método particularmente útil de aislamiento de cualquiera de un ácido nucleico codificante único o un repertorio de ácidos nucleicos que codifican cadenas pesadas y/o ligeras, o fragmentos funcionales de las mismas, sin conocimiento específico de la porción de región codificante debido a que los cebadores están disponibles o pueden ser fácilmente diseñados usando porciones conservadas de porciones de la región variable o constante del anticuerpo. Por ejemplo, se puede clonar un repertorio de ácidos nucleicos codificantes usando una pluralidad de cebadores degenerados para dichas regiones junto con PCR. Dichos métodos se conocen en la técnica y se pueden encontrar descritos en, por ejemplo, Huse et al., arriba, y *Antibody Engineering: A Practical Guide*, C.A.K. Borrebaeck, Ed., arriba. Se puede usar cualquiera de los métodos anteriores, así como otros conocidos en la técnica, que incluyen combinaciones de los mismos, para generar un anticuerpo monoclonal específico de diana para su uso como un producto biofarmacéutico de la invención.

En diversas realizaciones, se proporciona una formulación que tiene un anticuerpo o un fragmento funcional de un anticuerpo como polipéptido terapéutico. El polipéptido terapéutico puede incluir un anticuerpo monoclonal, Fd, Fv, Fab, F(ab'), F(ab)2, F(ab')2, Fv moncatenario (scFv), anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos o pepticuerpos.

Las concentraciones del anticuerpo o fragmento funcional del anticuerpo pueden variar, por ejemplo, dependiendo de la actividad del producto biofarmacéutico, la indicación que se va a tratar, modo de administración, la pauta de tratamiento y si la formulación está prevista para almacenamiento a largo plazo en tanto forma líquida como liofilizada. Los expertos en la técnica pueden determinar sin excesiva experimentación concentraciones aproximadas del producto biofarmacéutico. Existen más de 80 productos biofarmacéuticos autorizados para uso terapéutico en los Estados Unidos para una amplia variedad de indicaciones médicas, modos de administración y pautas de tratamiento. Estos productos biofarmacéuticos autorizados, así como otros, pueden ser a modo de ejemplo de la variedad de concentraciones de productos biofarmacéuticos que se pueden usar en diversas realizaciones.

Generalmente, un producto biofarmacéutico, por ejemplo, un producto biofarmacéutico de polipéptido terapéutico, se puede incluir en la formulación de diversas realizaciones a una concentración desde entre aproximadamente 1-200 mg/mL, aproximadamente 10-200 mg/mL, aproximadamente 20-180 mg/mL, entre aproximadamente 30-

160 mg/mL, entre aproximadamente 40-120 mg/mL, o entre aproximadamente 50-100 mg/mL, aproximadamente 60-80 mg/mL, o aproximadamente 30-50 mg/mL.

5 En diversas realizaciones, el producto biofarmacéutico puede ser un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno que tiene una concentración desde entre aproximadamente 3 y aproximadamente 70 mg/mL, aproximadamente 5 y aproximadamente 60 mg/mL, aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg/mL, aproximadamente 20 y aproximadamente 40 mg/mL, aproximadamente 30 y aproximadamente 100 mg/mL, o aproximadamente 40 y aproximadamente 200 mg/mL.

10 También se pueden usar concentraciones y/o cantidades de producto biofarmacéutico inferiores, superiores o entre estos intervalos en las formulaciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, se pueden incluir uno o más productos biofarmacéuticos en una formulación a menos de aproximadamente 1,0 mg/mL. Similarmente, una formulación puede contener una concentración de uno o más productos biofarmacéuticos superior a aproximadamente 200 mg/mL, particularmente cuando se formula para almacenamiento. Por consiguiente, se puede producir una formulación de la invención que contiene una concentración o cantidad deseada de uno o más productos biofarmacéuticos que incluyen, por ejemplo, aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 15 28, 29, 30, 31, 32, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 o 200 mg/mL o más. En los ejemplos de más adelante, se proporcionan resultados para una formulación que tiene un polipéptido terapéutico (un anticuerpo) a una concentración de aproximadamente 3 mg/mL, aproximadamente 30 mg/mL, aproximadamente 40 mg/mL o aproximadamente 100 mg/mL.

20 En diversas realizaciones, una formulación puede incluir combinaciones de productos biofarmacéuticos en la formulación. Por ejemplo, una formulación de la invención puede incluir un único producto biofarmacéutico para el tratamiento de una o más afecciones. Una formulación de la invención también puede incluir dos o más productos biofarmacéuticos diferentes para una única afección o múltiples afecciones. El uso de múltiples productos biofarmacéuticos en una formulación de la invención puede dirigir a, por ejemplo, las mismas indicaciones o 25 indicaciones diferentes. Similarmente, se pueden usar múltiples productos biofarmacéuticos en una formulación de la invención para tratar, por ejemplo, tanto una afección patológica como uno o más efectos secundarios provocados por el tratamiento primario. También se pueden incluir múltiples productos biofarmacéuticos en una formulación de la invención para conseguir diferentes fines médicos que incluyen, por ejemplo, tratamiento simultáneo y monitorización de la progresión de la afección patológica. Son particularmente útiles múltiples terapias simultáneas tales como las ejemplificadas anteriormente, así como otras combinaciones bien conocidas en la técnica, para el 30 cumplimiento del paciente debido a que una única formulación puede ser suficiente para algunos o todos de los tratamientos sugeridos y/o diagnóstico. Los expertos en la técnica conocerán esos productos biofarmacéuticos que se pueden mezclar para un amplio intervalo de terapias de combinación. Similarmente, en diversas realizaciones, se puede usar una formulación con un fármaco de molécula pequeña y combinaciones de uno o más productos biofarmacéuticos junto con uno o más productos farmacéuticos de molécula pequeña. Por tanto, en diversas 35 realizaciones, se proporciona una formulación que contiene 1, 2, 3, 4, 5 o 6 o más productos biofarmacéuticos diferentes, así como, uno o más productos biofarmacéuticos combinados con uno o más productos farmacéuticos de molécula pequeña.

40 En diversas realizaciones, una formulación puede incluir uno o más conservantes y/o aditivos conocidos en la técnica. Similarmente, una formulación se puede formular además en cualquiera de diversas formulaciones de administración conocidas. Por ejemplo, una formulación puede incluir agentes lubricantes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, agentes conservantes tales como metil- y propilhidroxibenzoatos, edulcorantes y aromatizantes. Se conocen en la técnica dichos componentes opcionales, sus características químicas y funcionales. Son similarmente conocidas en la técnica las formulaciones que facilitan la liberación rápida, sostenida o retardada del producto biofarmacéutico después de la administración. Se puede producir una formulación de la 45 invención para incluir estas u otros componentes de formulación conocidos en la técnica.

Una vez se prepara una formulación como se describe en el presente documento, se puede evaluar la estabilidad del uno o más productos biofarmacéuticos contenidos dentro de la formulación usando métodos conocidos en la técnica. Se ejemplifican varios métodos más adelante en los ejemplos e incluyen cromatografía de exclusión por tamaño, recuento de partículas y cromatografía de intercambio catiónico. Otros métodos pueden comprender 50 cualquiera de una variedad de ensayos funcionales que incluyen, por ejemplo, actividad de unión, se puede evaluar otra actividad bioquímica y/o actividad fisiológica en dos o más puntos de tiempo diferentes para determinar la estabilidad del producto biofarmacéutico en la formulación tamponada de la invención.

Una formulación se puede preparar, en general, según patrones farmacéuticos y usando reactivos de calidad farmacéutica. Similarmente, se puede preparar una formulación usando reactivos estériles en un entorno de 55 fabricación estéril o esterilizar tras la preparación. Se pueden preparar disoluciones inyectables estériles usando procedimientos conocidos en la materia que incluyen, por ejemplo, incorporar uno o más productos biofarmacéuticos en la cantidad requerida en un tampón ácido glutámico (ejemplo de referencia) o excipiente con un componente de formulación o una combinación de componentes de formulación descritos en el presente documento, seguido por esterilización por microfiltración. En diversas realizaciones, polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles pueden incluir, por ejemplo, secado a vacío y secado por congelación (liofilización). Dichos 60

métodos de secado darán un polvo del uno o más productos biofarmacéuticos junto con cualquier componente deseado adicional de una disolución previamente esterilizada por filtración del mismo.

Se pueden ajustar la administración y pautas posológicas para proporcionar una cantidad eficaz para una respuesta terapéutica óptima. Por ejemplo, se pueden administrar un único bolo, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo, o la dosis se puede reducir o incrementar proporcionalmente como se indica por las exigencias de la situación terapéutica. Puede ser útil formular una formulación para inyección intravenosa, parenteral o subcutánea en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y uniformidad de la dosificación en la administración de una cantidad eficaz de uno o más productos biofarmacéuticos. Dosificación unitaria se refiere a una cantidad físicamente discreta de producto farmacéutico apto como dosificaciones unitarias para los sujetos que se va a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de producto biofarmacéutico activo calculado para producir un efecto terapéutico deseado.

La dosificación dependerá del anticuerpo usado en la formulación. Si se usa, por ejemplo, un anticuerpo anti-NGF en la formulación descrita en el presente documento, la frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de ese anticuerpo anti-NGF usado en la formulación. Normalmente, un profesional clínico puede administrar la composición hasta que se alcance una dosificación que logre el efecto deseado. Un ejemplo de un efecto deseado puede ser disminución de dolor o dolor neuropático tras la administración de una formulación que comprende anticuerpos anti-NGF.

La composición se puede administrar, por tanto, como una dosis única, o como dos o más dosis (que pueden o pueden no contener la misma cantidad de la molécula deseada) con el tiempo, o como una infusión continua por un dispositivo de implantación o catéter. El refinamiento adicional de la dosificación apropiada se hace rutinariamente por los expertos habituales en la técnica y está dentro del ámbito de tareas rutinariamente realizadas por ellos. Las dosificaciones apropiadas se pueden determinar mediante el uso de datos apropiados de dosis-respuesta. En diversas realizaciones, los anticuerpos en las formulaciones descritas en el presente documento se pueden administrar a los pacientes durante un periodo de tiempo prolongado. La administración crónica de un anticuerpo completamente humano puede minimizar la respuesta inmunitaria adversa o alérgica que se puede asociar a los anticuerpos que son producidos contra un antígeno humano en un animal no humano, por ejemplo, un anticuerpo no completamente humano producido en una especie no humana.

La cantidad eficaz de un producto farmacéutico que contiene anticuerpo anti-NGF o cualquier otra formulación que contiene anticuerpo a emplear terapéuticamente puede depender, por ejemplo, del contexto terapéutico y los objetivos. Un experto en la técnica apreciará que los niveles de dosificación apropiados para el tratamiento variarán dependiendo, en parte, de la molécula administrada, la indicación para la que se está usando el anticuerpo anti-NGF, la vía de administración y el tamaño (peso corporal, superficie del cuerpo o tamaño de órgano) y/o condición (la edad y salud general) del paciente. En ciertas realizaciones, el profesional clínico puede ajustar la dosificación y modificar la vía de administración para obtener el efecto terapéutico óptimo. Una dosificación típica puede variar desde aproximadamente 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg o más, dependiendo de los factores mencionados anteriormente. En realizaciones preferidas, la dosificación puede variar desde aproximadamente 0,1 µg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg; más preferentemente desde aproximadamente 1 µg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg; o incluso más preferentemente desde aproximadamente 5 µg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg. También se puede prever que en condiciones apropiadas como se reconocen por un experto en la técnica, se pueden administrar dosificaciones superiores a 30 mg/kg, a condición de que los beneficios de dicha dosificación no sean superados por ningún efecto negativo de la administración de las dosis más grandes.

En diversas realizaciones, se puede administrar una cantidad eficaz de un producto biofarmacéutico de polipéptido tal como un anticuerpo terapéutico, o fragmento funcional del mismo, por ejemplo, más de una vez, a intervalos programados durante un periodo de tiempo. El anticuerpo terapéutico se puede administrar durante un periodo de al menos un mes o más que incluye, por ejemplo, uno, dos, o tres meses o más. Para tratar afecciones crónicas, el tratamiento sostenido a largo plazo es generalmente el más eficaz. Pueden ser suficientes periodos de administración más cortos cuando se traten afecciones agudas que incluyen periodos, por ejemplo, desde uno hasta seis semanas. En general, un anticuerpo terapéutico u otro producto biofarmacéutico se administra hasta que el paciente manifieste un grado de mejora médicamente relevante con respecto al nivel inicial para el indicador o indicadores elegidos.

Dependiendo del producto biofarmacéutico seleccionado y la indicación que se va a tratar, una cantidad terapéuticamente eficaz es suficiente para provocar una reducción en al menos un síntoma de la afección patológica elegida en al menos aproximadamente 1 %, 5 %, 10 %, 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 % o 60 % o más, con respecto a los sujetos sin tratar. La capacidad de una formulación para reducir o inhibir un síntoma se puede evaluar, por ejemplo, en un sistema de modelo animal predictivo de la eficacia para la afección elegida en el ser humano. Alternativamente, la capacidad de una formulación para reducir o inhibir un síntoma se puede evaluar, por ejemplo, examinando una función *in vitro* o actividad de la formulación indicativa de actividad terapéutica *in vivo*.

Se pueden variar los niveles de dosificación actuales de uno o más productos biofarmacéuticos en una formulación para obtener una cantidad del producto biofarmacéutico activo que sea eficaz de lograr la respuesta terapéutica

deseada para un paciente particular, formulación, y modo de administración, sin ser tóxico para el paciente. Un experto en la técnica sería capaz de determinar cantidades administradas basándose en factores tales como el tamaño del sujeto, la gravedad de los síntomas del sujeto y el producto biofarmacéutico seleccionado y/o vía de administración. El nivel de dosificación seleccionado puede depender, por ejemplo, de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad del producto biofarmacéutico empleado, la vía de administración, el tiempo de administración, la velocidad de eliminación, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, condición, salud general y antecedentes personales previos del paciente que está tratándose, y factores similares bien conocidos en las artes médicas. Diversas realizaciones pueden implicar administrar un polipéptido terapéutico tal como un anticuerpo, o fragmento funcional del mismo, en una formulación de la invención a una dosificación de desde aproximadamente 1 ng de anticuerpo por kg de peso del sujeto por día (1 ng/kg/día) hasta aproximadamente 10 mg/kg/día, más particularmente desde aproximadamente 500 ng/kg/día hasta aproximadamente 5 mg/kg/día, e incluso más particularmente desde aproximadamente 5 µg/kg/día hasta aproximadamente 2 mg/kg/día, a un sujeto. También se pueden administrar dosis más altas en condiciones apropiadas.

Un médico o veterinario que tiene experiencia en la técnica puede determinar fácilmente y recetar la cantidad eficaz de la formulación farmacéutica requerida. Por ejemplo, el médico o veterinario puede iniciar dosis de una formulación de la invención a niveles inferiores a los requeridos para lograr el efecto terapéutico deseado y aumentar gradualmente la dosificación hasta que se logre el efecto deseado. En general, una dosis diaria adecuada de una formulación de la invención será aquella cantidad del producto biofarmacéutico que sea la dosis eficaz más baja para producir un efecto terapéutico. Dicha cantidad eficaz generalmente dependerá de los factores descritos previamente. Es particularmente útil que la administración sea intravenosa, intramuscular, intraperitoneal o subcutánea. Si se desea, la dosis diaria eficaz para lograr una cantidad eficaz de una formulación se pueden administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más sub-dosis administradas por separado a intervalos apropiados a lo largo del día, opcionalmente, en cantidades de dosificación unitaria.

En diversas realizaciones, una formulación se puede administrar, por ejemplo, con dispositivos médicos conocidos en la técnica. Los dispositivos médicos para administración de la formulación pueden incluir jeringas y autoinyectores. Las jeringas pueden ser jeringas precargadas. En diversas realizaciones, una formulación se puede administrar con un dispositivo de inyección hipodérmica sin aguja, tal como los dispositivos descritos en las patentes de EE.UU. N° 5.399.163; 5.383.851; 5.312.335; 5.064.413; 4.941.880; 4.790.824; o 4.596.556. Los ejemplos de implantes y módulos conocidos que pueden ser útiles con las formulaciones descritas en el presente documento incluyen: la patente de EE.UU. N° 4.487.603, que describe una bomba de micro-infusión implantable para dispensar medicación a una velocidad controlada; la patente de EE.UU. N° 4.486.194, que describe un dispositivo terapéutico para administrar medicamentos a través de la piel; la patente de EE.UU. N° 4.447.233, que describe una bomba de infusión de medicación para administrar medicación a una velocidad de infusión precisa; la patente de EE.UU. N° 4.447.224, que describe un aparato de infusión implantable de flujo variable para la administración continua de fármaco; la patente de EE.UU. N° 4.439.196, que describe un sistema de administración osmótica de fármacos que tienen compartimentos de múltiples cámaras, y la patente de EE.UU. N° 4.475.196, que describe un sistema de administración osmótica de fármacos. Los expertos en la técnica conocen muchos otros de dichos implantes, sistemas de administración y módulos. Además, en diversas realizaciones, las formulaciones se pueden administrar de una jeringa precargada.

En diversas realizaciones, se puede formular un producto biofarmacéutico para su uso en una formulación para facilitar la distribución selectiva *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para facilitar el cruce de la BBB si se desea, una formulación puede incluir además, por ejemplo, liposomas para la encapsulación de uno o más productos biofarmacéuticos. Para métodos de fabricación de liposomas, véanse, por ejemplo, las patentes de EE.UU. N° 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden contener además uno o más restos que son selectivamente transportados en células u órganos específicos, potenciando así la administración elegida como diana de un producto biofarmacéutico seleccionado (véase, por ejemplo, V. V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685). Los restos diana a modo de ejemplo incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. N° 5.416.016 a Low et al.); manósidos (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); anticuerpos (P. G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother.39:180) o receptor de proteína A tensoactiva (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134).

Después de la preparación del producto biofarmacéutico, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de interés, se puede preparar la formulación farmacéutica que lo comprende. Generalmente, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno a formular no ha sido sometido a liofilización y está en una disolución. La disolución puede ser una disolución acuosa. En diversas realizaciones, sin embargo, puede haber ocurrido liofilización previa. La cantidad terapéuticamente eficaz de anticuerpo presente en la formulación se puede determinar teniendo en cuenta los volúmenes de dosis deseada y el (los) modo(s) de administración. Por ejemplo, desde aproximadamente 0,1 mg/mL hasta aproximadamente 60 mg/mL, desde aproximadamente 10 g/mL hasta aproximadamente 40 g/mL o desde aproximadamente 20 mg/mL hasta aproximadamente 35 mg/mL.

La presente memoria descriptiva divulga además un método de preparación de una formulación. El método incluye combinar un disolución de tampón ácido acético que tiene un pH desde aproximadamente 4,0 hasta

aproximadamente 6,0, prolina y una cantidad eficaz de un polipéptido terapéutico. Uno o más de los componentes de formulación descritos en el presente documento se pueden combinar con una o más cantidades eficaces de un producto biofarmacéutico para producir una amplia variedad de formulaciones.

5 Se puede preparar una formulación acuosa que comprende el anticuerpo en una disolución de pH tamponado. El tampón es un tampón ácido acético. El tampón puede tener un pH en el intervalo desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 6,0, desde aproximadamente 4,5 hasta aproximadamente 5,5, o un pH de aproximadamente 5,0. La concentración de tampón puede ser desde aproximadamente 1 mM hasta aproximadamente 50 mM, desde aproximadamente 5 mM hasta aproximadamente 30 mM, aproximadamente 10 mM o aproximadamente 30 mM.

10 Brevemente, con respecto a las composiciones, kits y/o medicamentos, las cantidades eficaces combinadas de uno o más productos biofarmacéuticos dentro de una formulación se pueden incluir dentro de un único recipiente o más de un recipiente.

15 Según diversas realizaciones, la formulación puede estar esencialmente libre de uno o más conservantes, tales como alcohol bencílico, fenol, m-cresol, clorobutanol y Cl de bencetonio. En otras realizaciones, sin embargo, un conservante se puede incluir en la formulación, particularmente donde la formulación sea una formulación de múltiples dosis. La concentración de conservante puede estar en el intervalo desde aproximadamente 0,1 % hasta aproximadamente 2 % o desde aproximadamente 0,5 % hasta aproximadamente 1 %.

Se pueden incluir uno o varios de otros vehículos, excipientes o estabilizadores farmacéuticamente aceptables, tales como aquellos descritos en Remington's Pharmaceutical Sciences 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980), en la formulación, a condición de que no afecten adversamente las características deseadas de la formulación.

20 La formulación descrita en esta memoria descriptiva también puede comprender más de una proteína terapéutica según se desee para la indicación particular que está tratándose, preferentemente aquellas con actividades complementarias que no afectan adversamente la otra proteína.

Las formulaciones que se van a usar para administración *in vivo* pueden ser estériles. Esto se puede llevar a cabo por filtración a través de membranas de filtración estériles, antes, o tras, la preparación de la formulación.

25 Opcionalmente se pueden incluir componentes de obtención de imágenes y el envase también puede incluir instrucciones escritas o accesibles mediante web para usar la formulación. Un recipiente puede incluir, por ejemplo, un vial, botella, jeringa, jeringa precargada o cualquiera de una variedad de formatos bien conocidos en la técnica para el envasado de múltiples dispensadores.

30 Las formulaciones de anticuerpo descritas en el presente documento se pueden usar para tratar diversas afecciones que requieren la administración de polipéptidos terapéuticos. Por ejemplo, si una afección en un paciente se provoca por la elevada expresión de NGF o elevada sensibilidad a NGF, la formulación descrita en el presente documento se puede usar con un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno para NGF. Tales enfermedades también se han denominado "enfermedad mediada por NGF" o "afección mediada por NGF". Información adicional referente a afecciones relacionadas con la expresión o sensibilidad de NGF, "enfermedad mediada por NGF" o "afección mediada por NGF", anticuerpos o fragmento de unión al antígeno para NGF, se pueden encontrar en, por ejemplo, la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2005/0074821A1. También se pueden preparar formulaciones de anticuerpo para tratar otras afecciones.

35 En diversas realizaciones, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno en la formulación comprende un Fd, Fv, Fab, F(ab'), F(ab)₂, F(ab')₂, F(ab)₃, Fc, bis-scFv(s), Fv monocatenario (scFv), anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpo, pepticuerpo, dominio V_HH, dominio V-NAR, dominio V_H, dominio V_L, Ig de camello, NAR de Ig, o recepticuerpo. El anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se pueden unir a factor de crecimiento. El factor de crecimiento puede ser factor de crecimiento nervioso. La formulación que comprende NGF puede tener una concentración de NGF desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 mg/mL.

45 En diversas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno en la formulación está a una concentración entre aproximadamente 3 y aproximadamente 70 mg/mL, aproximadamente 5 y aproximadamente 60 mg/mL, aproximadamente 10 y aproximadamente 50 mg/mL, 20 y aproximadamente 40 mg/mL, aproximadamente 30 y aproximadamente 100 mg/mL, o aproximadamente 40 y aproximadamente 200 mg/mL.

50 En diversas realizaciones, el método comprende combinar un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, en donde el anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno comprende un Fd, Fv, Fab, F(ab'), F(ab)₂, F(ab')₂, F(ab)₃, Fc, bis-scFv(s), Fv monocatenario (scFv), anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, anticuerpos quiméricos, diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpo, pepticuerpo, dominio V_HH, dominio V-NAR, dominio V_H, dominio V_L, Ig de camello, NAR de Ig, o recepticuerpo.

55 En diversas realizaciones, el método comprende combinar un polipéptido terapéutico que comprende una concentración desde aproximadamente 3 hasta aproximadamente 70 mg/mL, aproximadamente 5 hasta aproximadamente 60 mg/mL, aproximadamente 10 hasta aproximadamente 50 mg/mL, 20 hasta aproximadamente

40 mg/mL, aproximadamente 30 hasta aproximadamente 100 mg/mL, o aproximadamente 40 hasta aproximadamente 200 mg/mL.

5 La presente memoria descriptiva divulga kits que comprenden en uno o más recipientes de un anticuerpo o formulación de unión al antígeno y prolina. Los kits pueden comprender en uno más recipientes, tampón ácido acético, prolina y un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno e instrucciones referentes al uso de los mismos. Los kits pueden comprender una formulación que es una formulación farmacéuticamente aceptable para uso humano. Un kit también puede comprender instrucciones para su uso.

10 El kit puede comprender una proteína biofarmacéutica, en donde la proteína es una proteína biofarmacéutica formulada para el tratamiento de una enfermedad en seres humanos, por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno. Los kits pueden comprender una o más jeringas de una sola o múltiples cámaras (por ejemplo, jeringas de líquido y liojeringas) para administrar una o más formulaciones descritas en el presente documento. Un ejemplo de una liojeringa es Lyo-Ject™, una liojeringa precargada de doble cámara disponible de Vetter GmbH, Ravensburg, Alemania.

15 El kit puede comprender los componentes de formulación para administración parenteral, subcutánea, intramuscular o IV, sellado en un vial bajo vacío parcial en una forma lista para carga en una jeringa y administración a un sujeto. A este respecto, la composición se puede disponer en su interior bajo vacío parcial. Los kits pueden contener uno o más viales según cualquiera de lo anterior, en donde cada vial contiene una única dosis unitaria para administración a un sujeto. Los kits pueden comprender liofilizados, dispuestos como antes, que con la reconstitución proporcionan composiciones de acuerdo con la misma. Los kits pueden contener un liofilizado y un diluyente estéril para reconstituir el liofilizado.

20 La presente memoria descriptiva divulga un kit que comprende en uno o más recipientes un tampón acético que tiene un pH desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 6,0 o una sal de acetato apropiada para preparar dicho tampón, prolina a una concentración de aproximadamente 2 % a aproximadamente 10 %, y un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, en donde el kit no comprende además tanto un poliol como un tensioactivo, e instrucciones referentes a su uso.

25 Las realizaciones de la invención no se deben limitar en alcance por las realizaciones específicas descritas en el presente documento que están previstas como ilustraciones de las realizaciones de la invención, y cualquier composición o método que sea funcionalmente equivalente está dentro del alcance de la presente invención. De hecho, diversas modificaciones de la invención, además de las mostradas y descritas en el presente documento, serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y dibujos adjuntos. Dichas modificaciones pretenden entrar dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

30 Los siguientes ejemplos están previstos simplemente para ilustrar las realizaciones de la invención. Los ejemplos son según la invención si entran dentro de las reivindicaciones. Todos los otros ejemplos son ejemplos de referencia.

Ejemplo 1. Estabilidad de la formulación

35 Para determinar los efectos de las diferentes formulaciones sobre la estabilidad de un anticuerpo, se prepararon varias formulaciones como se muestran en la Tabla 2 a continuación. Las formulaciones se almacenaron en viales de vidrio de tipo 1 de 5 cm³ con retroceso con tapones fluoropoliméricos Daikyo de goma que contenían aproximadamente 3,0 mL de disolución de anticuerpo formulado para diversos tiempos a diferentes temperaturas.

Tabla 2: Formulaciones

Nombre	Tampón	pH	Excipiente (p/v)	Concentración (mg/mL)
E51Su30	ácido L-glutámico 10 mM	5,1	8,35 % de sacarosa	30
E51S30	ácido L-glutámico 10 mM	5,1	5 % de sorbitol	30
E51T30	ácido L-glutámico 10 mM	5,1	8,35 % de trehalosa	30
E51G30	ácido L-glutámico 10 mM	5,1	2,5 % de glicerol	30
E51M130	ácido L-glutámico 10 mM	5,1	8,35 % de maltosa	30
E51A30	ácido L-glutámico 10 mM	5,1	2,8 % de HCl de L-arginina	30
E51M30	ácido L-glutámico 10 mM	5,1	metionina 5 mM + 2,45 % de glicerol	30
E51Gly30	ácido L-glutámico 10 mM	5,1	2,0 % de glicina	30
E51P30	ácido L-glutámico 10 mM	5,1	3,1 % de L-prolina	30

ES 2 748 526 T3

Nombre	Tampón	pH	Excipiente (p/v)	Concentración (mg/mL)
E51L30	ácido L-glutámico 10 mM	5,1	2,5 % de HCl de L-lisina	30
E51N30	ácido L-glutámico 10 mM	5,1	0,79 % de NaCl (135 mM)	30
E51 Mg30	ácido L-glutámico 10 mM	5,1	MgCl ₂ 10 mM, 2,22 % de glicerol	30
E51EDTA30	ácido L-glutámico 10 mM	5,1	EDTA 2 mM, 2,5 % de glicerol	30
A51G30	ácido acético 10 mM	5,1	2,5 % de glicerol	30
A51A30	ácido acético 10 mM	5,1	5,7 % de L-arginina	30
D51G30	ácido L-aspartico 10 mM	5,1	2,5 % de glicerol	30
D51A30	ácido L-aspartico 10 mM	5,1	5,7 % de L-arginina	30

5 Se preparó una formulación que comprendía un anticuerpo de interés, por ejemplo, un anticuerpo contra NGF (una IgG₂). Se conocen en la técnica métodos de preparación de un anticuerpo contra NGF y se pueden encontrar, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 2005/0074821. Las formulaciones comprendían una disolución acuosa de ácido L-glutámico, ácido L-aspartico o tampón ácido acético. El tampón tenía una concentración de 10 mM y un pH de 5,1, y el anticuerpo estaba presente a una concentración de 30 mg/mL. Se añadieron componentes adicionales a cada formulación como se ha descrito anteriormente. E51P30 contuvo ácido L-glutámico, prolina y un anticuerpo contra el factor de crecimiento nervioso.

10 Se usaron diferentes métodos de determinación de estabilidad del anticuerpo contra el factor de crecimiento nervioso. Los métodos incluyeron cromatografía de exclusión por tamaño (SEC), cromatografía de intercambio catiónico (CEX) y recuento de partículas. Generalmente, los métodos se realizaron del siguiente modo.

15 Se realizó SEC en un sistema de HPLC capilar Agilent 1100 equipado con un detector de matrices de diodos de UV, inyector automático enfriado, una celda de flujo normal y compartimento de columna de temperatura controlada (Agilent, Palo Alto, CA, EE.UU.). La fase móvil incluyó agua con fosfato de sodio 100 mM (Amgen Spec Número S2700R01), NaCl 330 mM (Amgen Spec Número S2706R02) a pH 6,6. Se usó la columna Phenomenex Shodex KW-803 (300 x 8 mm) para el análisis de SE (Phenomenex, Torrance, CA, EE.UU.). Se mantuvo la temperatura del compartimento de columna a 25 °C y el caudal fue 0,5 mL/min.

20 Se realizó CEX en un sistema de HPLC capilar Agilent 1100 equipado con un detector de matrices de diodos de UV, inyector automático enfriado, una celda de flujo normal y compartimento de columna de temperatura controlada (Agilent, Palo Alto, CA, EE.UU.). La fase móvil incluyó agua con fosfato de sodio 10 mM (Amgen Spec Número S2700R01) a pH 7,4 en disolvente A y fosfato de sodio 10 mM (Amgen Spec Número S2700R01), NaCl 250 mM ((Amgen Spec Número S2706R02) a pH 7,4 en disolvente B. Se usó una columna de intercambio catiónico débil (columna Dionex ProPac WCX-10 -- 4 x 250 mm, Dionex, Sunnyvale, CA, EE.UU.). Se mantuvo la temperatura del compartimento de la columna a 25 °C y el caudal fue 0,8 mL/min.

25 Se realizó análisis de partículas subvisibles usando una técnica de oscurecimiento de luz con un sistema de recuento de partículas líquidas HIAC Royco, modelo 9703 (Hach-Ultra, Grants Pass, OR, EE.UU.). Se calibró el instrumento con un patrón EZY-CAL de 15 µm (catálogo N° 6015, Duke Scientific, Palo Alto, CA, EE.UU.). Todas las formulaciones se desgasificaron durante 3 horas antes del análisis. Se limpió el instrumento entre muestras con H₂O desionizada o formulación tampón. Se midió el número de partículas realizando cuatro extracciones de 0,5 mL de cada formulación de anticuerpo usando una jeringa de 1 mL.

35 Se prepararon anticuerpos contra NGF por métodos conocidos en la técnica (por ejemplo, véase la publicación de solicitud de patente de EE.UU. 20050074821) y se prepararon formulaciones que comprendían los anticuerpos. El anticuerpo contra NGF usado en las formulaciones era un anticuerpo IgG₂. Las formulaciones se almacenaron durante diversos periodos o se sometieron a congelaciones-descongelaciones repetidas. El análisis de estas formulaciones se presenta en las Figuras 1A-1D, 2A-2F y 3A-3C, todas ellas contienen un anticuerpo que se une a NGF.

40 La Figura 1A-1D proporciona los resultados del análisis de SEC para las diferentes formulaciones descritas anteriormente en la Tabla 1 a 4 °C, 25 °C, 37 °C y después de congelación (-30 °C) y descongelación repetidas a temperatura ambiente. En algunos experimentos, las disoluciones se almacenaron durante nada menos que 18 meses y luego se analizaron. Las formulaciones contuvieron un anticuerpo contra NGF a una concentración de 30 mg/mL, tampón ácido L-glutámico 10 mM, tampón ácido L-aspartico 10 mM o tampón ácido acético 10 mM a pH 5,1 y otros componentes como se indica en la tabla.

Se usó SEC para proporcionar información referente a la estabilidad del anticuerpo como se mide por agregación del anticuerpo durante el almacenamiento. Los datos se presentan como un porcentaje del pico principal (monómero) – cuanto mayor sea el porcentaje del pico principal, menos agregación ocurre. Sin embargo, la formulación que contiene prolina EP1P30 normalmente proporcionó mejor estabilidad para las disoluciones de anticuerpo almacenadas que las otras formulaciones.

La preparación que contiene prolina, la preparación E51P30, contuvo tampón ácido L-glutámico 10 mM (pH 5,1), 3,1 % de prolina y 30 mg/mL de anticuerpo. La cromatografía de exclusión por tamaño puede proporcionar información referente a la estabilidad de un producto biofarmacéutico en una formulación en términos de agregación. Cuanto mayor sea el porcentaje del pico principal a cada tiempo en la figura, menos agregación ocurre (incluyendo dímero y otros agregados de alto peso molecular).

La Figura 1A ilustra los resultados tras el almacenamiento a 4 °C. La Figura 1B ilustra los resultados tras el almacenamiento a 25 °C. La Figura 1C ilustra los resultados tras el almacenamiento a 37 °C. La Figura 1D ilustra los resultados tras la congelación a -30 °C y descongelación repetidas a temperatura ambiente. Usando SEC, los resultados demuestran que generalmente la formulación E51P30 muestra la menor pérdida en porcentaje del pico principal durante el tiempo de almacenamiento, aunque algunas formulaciones pueden mostrar resultados comparables durante un periodo de tiempo específico. La menor pérdida en porcentaje del pico principal durante el tiempo de almacenamiento es evidente tras el almacenamiento a 4 °C durante 12 o 18 meses (Fig. 1A), 25 °C durante 8 semanas, 13 semanas o 6 meses a 25 °C (Fig. 1B), y particularmente durante 6 meses a 37 °C (Fig. 1C). Se debe observar, sin embargo, que las formulaciones E51T30 y E51M30 también pueden proporcionar una elevada estabilidad a ciertas temperaturas.

La Figura 1D muestra que se obtienen resultados generalmente comparables a partir de las diferentes formulaciones tras los ciclos repetidos de congelación-descongelación.

Una característica referente a la estabilidad de anticuerpos almacenados y otros polipéptidos puede ser la aparición de agregados de proteína insoluble (denominadas partículas en lo sucesivo). En este contexto, una partícula proteínica se refiere a, por ejemplo, un fragmento o agregado del polipéptido insoluble y puede ser visible y/o sub-visible. Las partículas pueden comprender alternativamente materia que es extraña (por ejemplo, esquirlas de vidrio, pelusa, pequeño trozo de tapón de goma) y no necesariamente compuestas del polipéptido. Estas partículas extrañas no derivan de anticuerpos y otros polipéptidos y no se observaron partículas extrañas en la formulación descrita en estos experimentos. Los agregados de proteína soluble se pueden evaluar, por ejemplo, usando métodos tales como SEC, mientras que las partículas proteínicas que son insolubles se pueden evaluar usando dichos métodos como recuento de partículas líquidas o técnicas turbidimétricas (enfoque de dispersión empírica de la luz), por ejemplo.

Las partículas visibles se clasifican generalmente como partículas que tienen tamaños superiores a 100 µm. Las partículas subvisibles, consideradas partículas finas, son de tamaño más pequeño. Usando un sistema láser de LD-400 con un instrumento de HIAC, se pueden medir tamaños de partículas entre 2 y 400 µm.

Las Figuras 2A-2F proporcionan datos obtenidos del análisis de formación de partículas (>10 µm o >25 µm) tras el almacenamiento de las diversas formulaciones a 4 °C, 25 °C y 37 °C. Los datos presentados en las Figuras 2A-2D ilustran la evaluación medida basándose en el número de partículas por mL. En muchos casos, se encuentran menos partículas/mL en formulaciones que contienen prolina, excepto a 18 meses a 4 °C. Un buen ejemplo de esto es el número de partículas de 10 µm/mL tras el almacenamiento a >25 °C durante 13 semanas (véase la Figura 2C). Otro ejemplo es el número de partículas de >10 µm/mL tras el almacenamiento a 37 °C durante 4 semanas (véase la Figura 2E).

Se determinaron modificaciones químicas de polipéptidos en las formulaciones por cromatografía de intercambio catiónico (CEX) como se ha descrito anteriormente. Este método separó isoformas basándose en las diferencias de cargas superficiales de la proteína usando un gradiente lineal de sal a pH 7,4 y una columna de intercambio catiónico débil (Dionex, WCX-10; Sunnyvale, CA).

Las Figuras 3A-3B proporcionan datos obtenidos del análisis de la formación de partículas (>10 µm o >25 µm) tras 5 ciclos de congelación-almacenamiento. Las formulaciones se almacenaron a -30 °C. En varios casos, las formulaciones que comprenden prolina fueron tan buenas como y algunas veces mejores que otras formulaciones en términos de ausencia de formación de partículas (tamaño de partículas >10 µm).

Las Figuras 4A-4C ilustran los resultados de la cromatografía de intercambio catiónico. Se analizaron los cambios en el porcentaje del pico principal (pico 0) después de la incubación a 4 °C, 25 °C y 37 °C. La disminución en el pico principal va acompañada por un aumento en los picos de ácido (datos no mostrados). Estos cambios se provocan por modificaciones químicas (por ejemplo, desamidación) de la molécula. Los datos muestran que la formulación que contiene L-prolina (E51P30) está entre las mejores en términos de mantenimiento del porcentaje más alto del pico principal después de la incubación a las tres temperaturas.

Ejemplo 2. Estabilidad de la formulación en viales y jeringas precargadas

5 Se investigó la estabilidad de diversas formulaciones durante el almacenamiento en ya fuera viales o jeringas precargadas. Se examinó la estabilidad de una formulación que comprende un anticuerpo después de 1 semana, 2 semanas, 1 mes y dos meses a 37 °C. Las formulaciones se almacenaron en viales o jeringas precargadas durante diversos tiempos a diferentes temperaturas. La Tabla 3 enumera varias formulaciones diferentes usadas en este estudio.

Tabla 3.

Nombre	Tampón	pH	Excipiente (p/v)	Concentración (mg/mL)
A52P_40	ácido acético 30 mM	5,2	2,65 % L-prolina	40
A52PT006_40	ácido acético 30 mM	5,2	2,65 % de L-prolina, 0,006 % de polisorbato-20	40
A52PT01_40	ácido acético 30 mM	5,2	2,65 % de L-prolina, 0,01 % de polisorbato-20	40
A52SuT006_40	ácido acético 30 mM	5,2	7,15 % de sacarosa, 0,006 % de polisorbato-20	40
A52GT006_40	ácido acético 30 mM	5,2	2,14 % de glicerol, 0,006 % de polisorbato-20	40
D52PT006_40	ácido L-aspártico 30 mM	5,2	2,65 % de L-prolina, 0,006 % de polisorbato-20	40
D52GT006_40	ácido L-aspártico 30 mM	5,2	2,14 % de glicerol, 0,006 % de polisorbato-20	40
D52SuT006_40	ácido L-aspártico 30 mM	5,2	7,15 % de sacarosa, 0,006 % de polisorbato-20	40
E52PT006_40	ácido L-glutámico 30 mM	5,2	2,65 % de L-prolina, 0,006 % de polisorbato-20	40
E52GT006_40	ácido L-glutámico 30 mM	5,2	2,14 % de glicerol, 0,006 % de polisorbato-20	40
SBPT006_40	--	5,2	3,32 % de L-prolina, 0,006 % de polisorbato 20	40

10 Se realizó otro conjunto de experimentos usando un conjunto diferente de formulaciones (Tabla 3). Todas las formulaciones, excepto una (SBPT006_40), contuvieron al menos uno de tampón ácido acético 30 mM, tampón ácido aspártico 30 mM, o tampón ácido glutámico 30 mM, a pH 5,2, y un anticuerpo contra el factor de crecimiento nervioso a una concentración de 40 mg/mL. SBPT006_40 contuvo 3,32 % de prolina y 40 mg/mL de anticuerpo y tuvo un pH de 5,2.

15 SBPT006_40 es un tampón de auto-disolución y no contuvo reactivo de tamponamiento en la disolución - ningún tampón ácido glutámico, ácido aspártico o ácido acético. Diversas realizaciones se refieren a una formulación que consiste en o consiste esencialmente en prolina y un anticuerpo, por ejemplo un anticuerpo contra un factor de crecimiento nervioso. La prolina y el anticuerpo pueden estar en una disolución acuosa. Información adicional referente a las formulaciones auto-tamponantes se puede encontrar en el documento de patente PCT/US2006/022599.

20 Las Figuras 5A-5H ilustran datos comparativos para el almacenamiento en viales y jeringas precargadas almacenadas a 37 °C o 25 °C. La Figura 5A-5D proporciona resultados usando anticuerpo a 40 mg/mL, mientras que la Figura 5E-5H proporciona resultados usando anticuerpo a 3 mg/mL. Se presentan las áreas en porcentaje del pico principal obtenidas para diferentes formulaciones estudiadas en viales de vidrio y jeringas precargadas. Las formulaciones que contienen L-prolina, independientemente del agente de tamponamiento usado, mostraron mejor estabilidad en términos del mayor porcentaje de pico principal observado por SEC después de incubar las muestras a 25 °C o 37 °C durante dos meses. En las Figuras 5A-5D, la formulación SBPT006_40 (una formulación auto-tamponante que contiene prolina con 40 mg/mL de anticuerpo) proporcionó coherentemente los mejores resultados tanto en un vial como una jeringa precargada.

30 Las Figuras 5E-5F proporcionan resultados a una menor concentración de anticuerpo (3 mg/mL). A esta concentración de anticuerpo, alguna formulación que contiene prolina no parece mantener la estabilidad al mismo grado que las formulaciones sin prolina. Se debe observar, sin embargo, que varias de las formulaciones que contienen prolina proporcionan estabilidad igual o mejor que las formulaciones que no contienen prolina. Mientras que A52P_03 parece proporcionar la mejor estabilidad con respecto a casi todas las otras formulaciones, se observó particulación visible en esta formulación puesto que no contuvo polisorbato-20.

35 Las Figuras 6A-6D muestran resultados de la cromatografía de intercambio catiónico obtenida para diferentes formulaciones estudiadas en viales de vidrio y jeringas precargadas. A 37 °C, la disminución en porcentaje del pico 0 parece similar a la de la mayoría de las formulaciones de la Figura 6A-6B. En los viales, sin embargo, A52P_40

muestra los mejores resultados después de 3 meses, mientras que en las jeringas precargadas SBPT006_40 muestra los mejores resultados en el mismo periodo de tiempo. Similarmente, SBPT006_40 muestra los mejores resultados después de 12 meses a 25 °C en viales (Figura 6C)

5 Las Figuras 6E-6H proporcionan datos de experimentos en viales y jeringas precargadas usando una concentración de anticuerpo de 3 mg/mL. Las formulaciones son similares a las descritas en la Tabla 3, excepto que se usa una menor concentración de anticuerpo. Como tal, la formulación de A52P_03 es la misma que A52P_40, excepto con 3 mg/mL de anticuerpo en vez de 40 mg/mL. En casi todos los casos A52P_03, una formulación que contiene prolina proporciona mayor estabilidad en cualesquiera dos o tres meses almacenamiento en tanto viales como jeringas precargadas, sin embargo, esta formulación puede ser propensa a la particulación debido a la ausencia de
10 polisorbato-20.

La Tabla 4 proporciona una descripción de las formulaciones usadas en las Figuras 7A-7B. Las figuras proporcionan resultados del almacenamiento de formulaciones a -30 °C usando una concentración de anticuerpo de 40 mg/mL.

Tabla 4

A52P	acetato 30 mM, 2,6 % de prolina	pH 5,2
D52P	ácido L-aspártico 30 mM, 2,6 % de prolina	pH 5,2
D52G	ácido L-aspártico 30 mM, 2,1 % de glicerol	pH 5,2
E52P	ácido L-glutámico 30 mM, 2,6 % de L-prolina	pH5,2
E52G	ácido L-glutámico 30 mM, 2,1 % de glicerol	pH 5,2

15 Las formulaciones fueron tanto almacenadas continuamente (Figura 7A) como se sometieron a cinco ciclos de congelación y descongelación (Figura 7B). Se puede observar en la Figura 7A que a los 12 meses de almacenamiento, las disoluciones que contenían prolina proporcionaron elevada estabilidad con respecto a las formulaciones sin prolina. Esto también fue cierto tras varias congelaciones-descongelaciones.

20 Las Figuras 8A-8G y 9A-9B proporcionan los resultados obtenidos usando un anticuerpo IgG₁ contra interleucina. Se usó un tampón acetato de pH 5,2 con anticuerpo a 100 mg/mL en todas las formulaciones con la adición de componentes indicados en la figura. Todos los excipientes usados en estas formulaciones están a una concentración de 270 mM, excepto PEG-6000 que está a una concentración de 2 % (p/v)

25 En todos los experimentos en las Figuras 8A-8G, una formulación que contenía prolina contuvo tanto menos agregados (Figuras 8A o 8C) como demostró un incremento del porcentaje del pico principal (Figuras 8B, 8D y 8E), que refleja un incremento de la estabilidad del anticuerpo en la formulación. La Figura 8E representa un aumento de la Figura 8D para el periodo de 0-6 meses.

30 Las Figuras 9A-9D proporcionan los resultados en tampón acetato sódico a pH 5,2 en comparación con una formulación que contiene prolina con tensioactivo contra una formulación que contiene sorbitol con un tensioactivo. El sorbitol y la prolina están a 270 mM y ambas formulaciones contienen 0,004 % de polisorbato 20. Se puede observar de las figuras que los resultados de prolina y tensioactivo son mejores que con sorbitol y un tensioactivo a cualquiera de 4 °C o 29 °C.

35 Todo lo anteriormente demuestra que, en la mayoría de los casos, una formulación que contiene prolina produce o bien un incremento de la estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo de disoluciones que contienen anticuerpo, o es al menos comparable a una formulación que no contiene prolina. Como tales, las disoluciones que contienen prolina proporcionan formulaciones novedosas y nuevas para el almacenamiento a largo plazo de disoluciones que contiene anticuerpo.

40 En toda esta memoria descriptiva se ha hecho referencia a diversas publicaciones, patentes y solicitudes de patente. La referencia a dichos documentos, sin embargo, no se debe interpretar como un reconocimiento de que dichos documentos sean estado de la técnica de la solicitud. Además, simplemente debido a que se ha hecho referencia a un documento, esto no indica necesariamente que los solicitantes estén en completo acuerdo con el contenido del documento.

Aunque se han descrito diversas realizaciones de la invención con referencia a diversas realizaciones, los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los ejemplos específicos y estudios detallados anteriormente son solo ilustrativos.

45

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una formulación que comprende un tampón ácido acético que tiene un pH desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 6,0, prolina a una concentración de aproximadamente 2 % a aproximadamente 10 % (p/v), y un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, en donde la formulación no comprende además tanto un poliol como un tensioactivo.
2. La formulación de la reivindicación 1, en donde el tampón está a una concentración de aproximadamente 5 mM a aproximadamente 50 mM.
3. La formulación de la reivindicación 1, en donde el tampón está a una concentración de aproximadamente 10 mM, aproximadamente 30 mM, o aproximadamente 50 mM y tiene un pH de aproximadamente 5.
- 10 4. La formulación de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está a una concentración de aproximadamente 50 mg/mL a aproximadamente 100 mg/mL.
5. La formulación de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está a una concentración superior a 50 mg/mL.
- 15 6. La formulación de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno está a una concentración superior a aproximadamente 100 mg/mL.
7. Un método de preparación de una formulación que comprende combinar un tampón ácido acético que tiene un pH desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 6,0, prolina y una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, en donde la formulación no comprende además tanto un poliol como un tensioactivo.
- 20 8. Un recipiente que contiene una formulación que comprende una disolución acuosa que tiene ácido acético entre aproximadamente 3 y aproximadamente 50 mM con un pH desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 6,0, prolina desde aproximadamente 2 % hasta aproximadamente 10 % (p/v) y un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno, en donde la disolución acuosa no comprende además tanto un poliol como un tensioactivo.
9. El recipiente de la reivindicación 8, en donde el recipiente es un vial o una jeringa precargada.
- 25 10. Una formulación para su uso en el tratamiento de una afección provocada por la elevada expresión de factor de crecimiento nervioso o elevada sensibilidad al factor de crecimiento nervioso en un paciente, que comprende un tampón ácido acético que tiene un pH desde aproximadamente 4,0 hasta aproximadamente 6,0, prolina a una concentración de aproximadamente 2 % a aproximadamente 10 % (p/v), y una cantidad eficaz de un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno contra el factor de crecimiento nervioso, en donde la formulación no comprende además tanto un poliol como un tensioactivo.

30

FIG. 1A

Temperatura = 4 °C

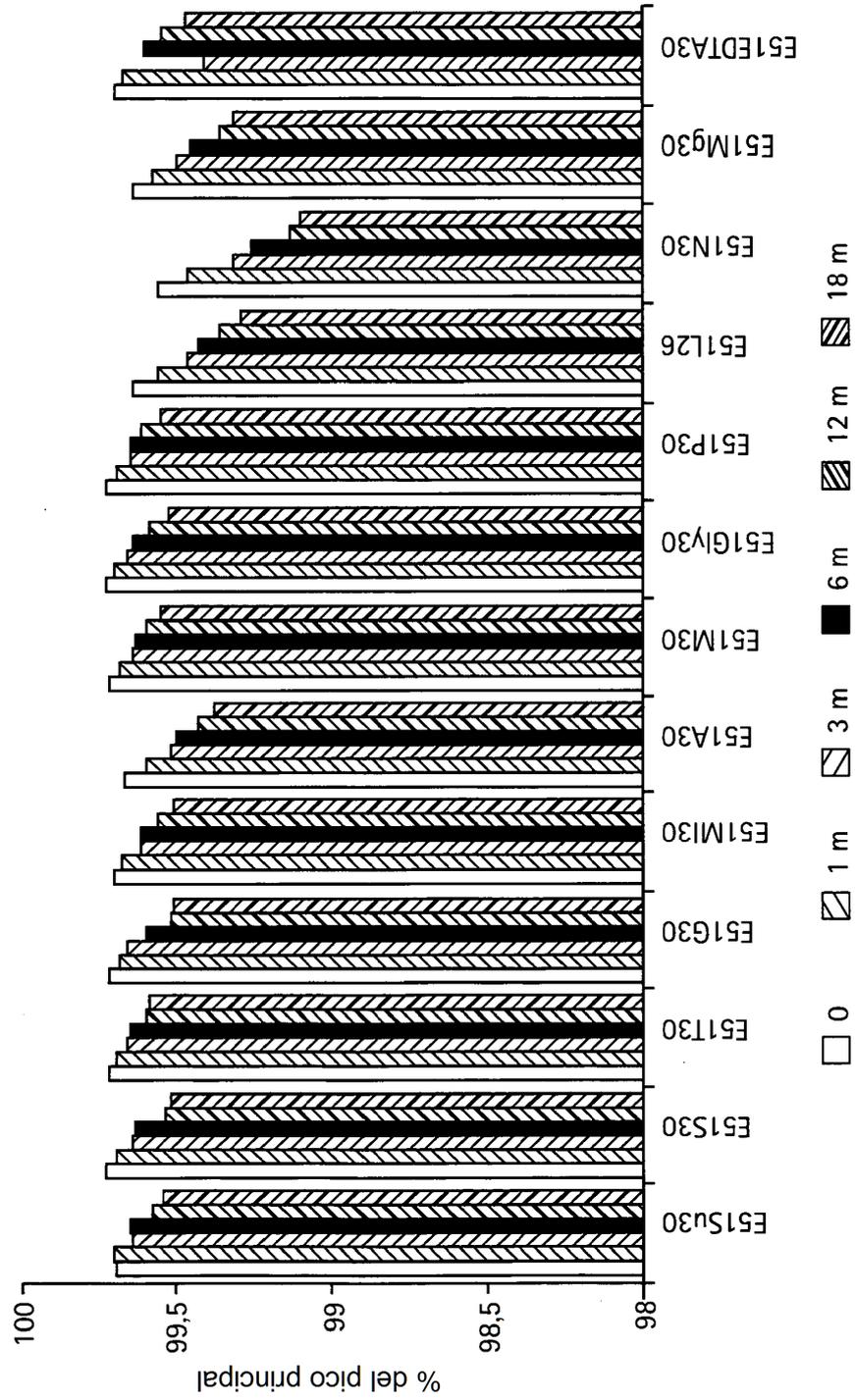


FIG. 1B

Temperatura = 25 °C

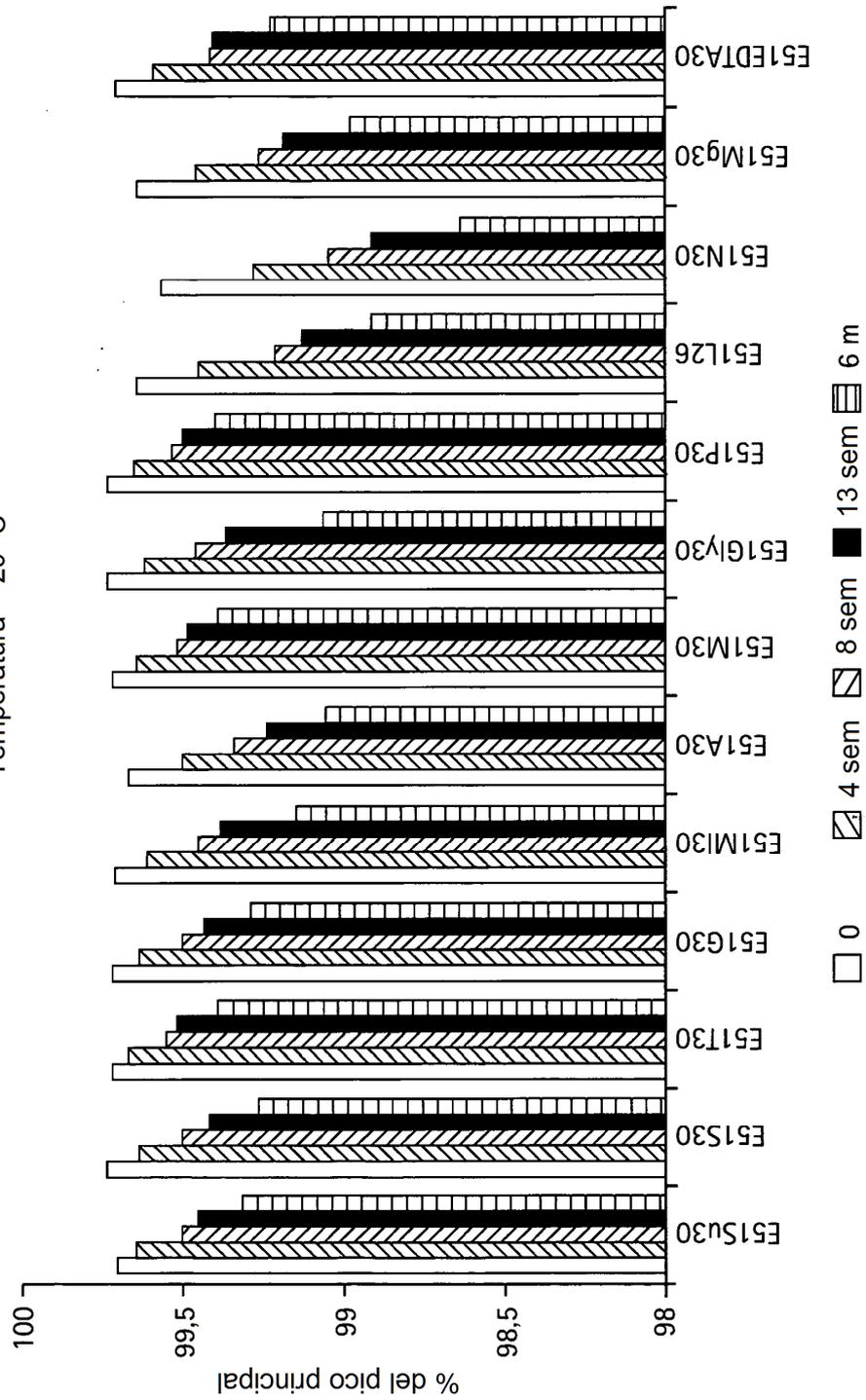


FIG. 1C
 Temperatura = 37 °C

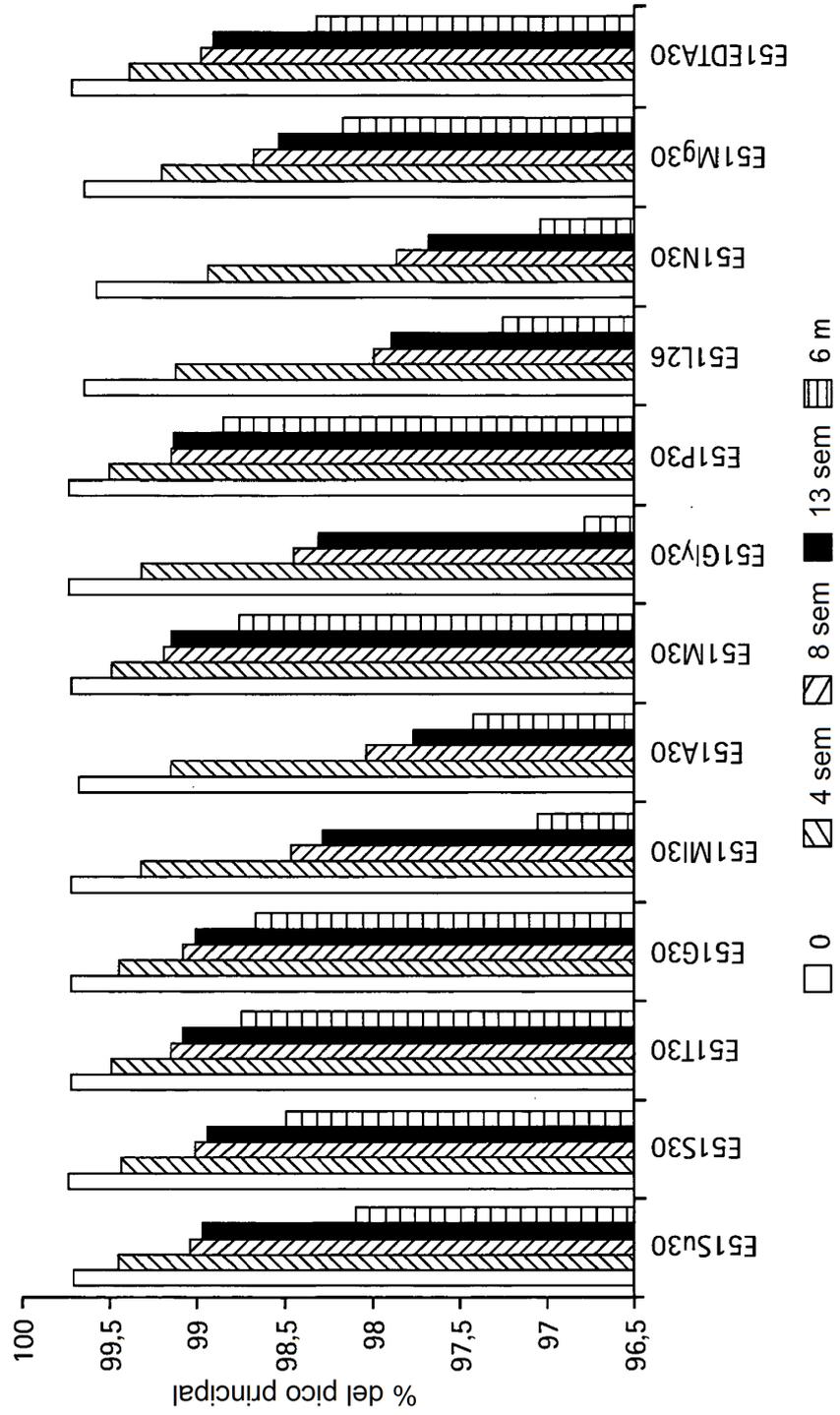


FIG. 1D

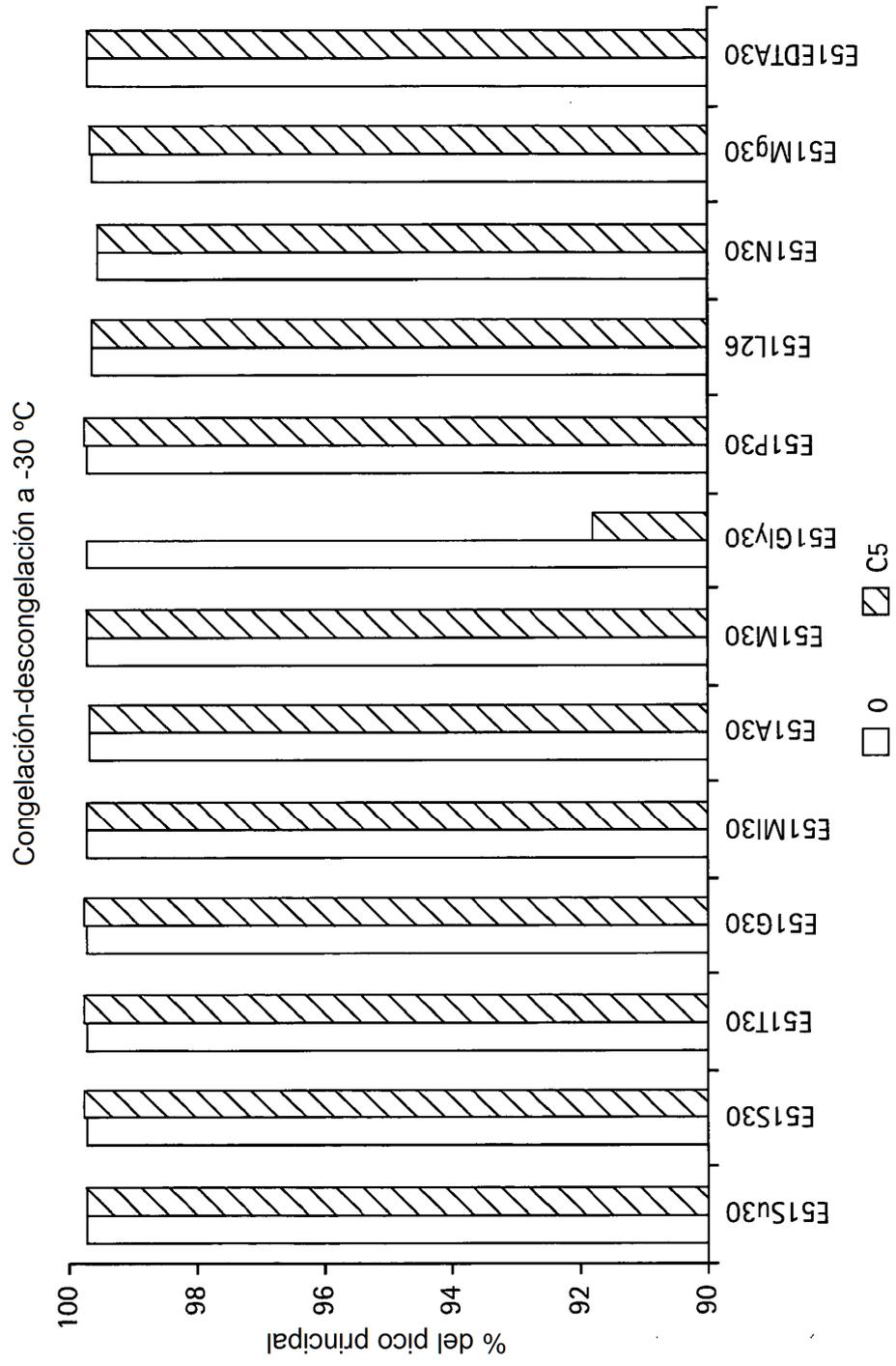


FIG. 2A

4 °C, > 10 micras

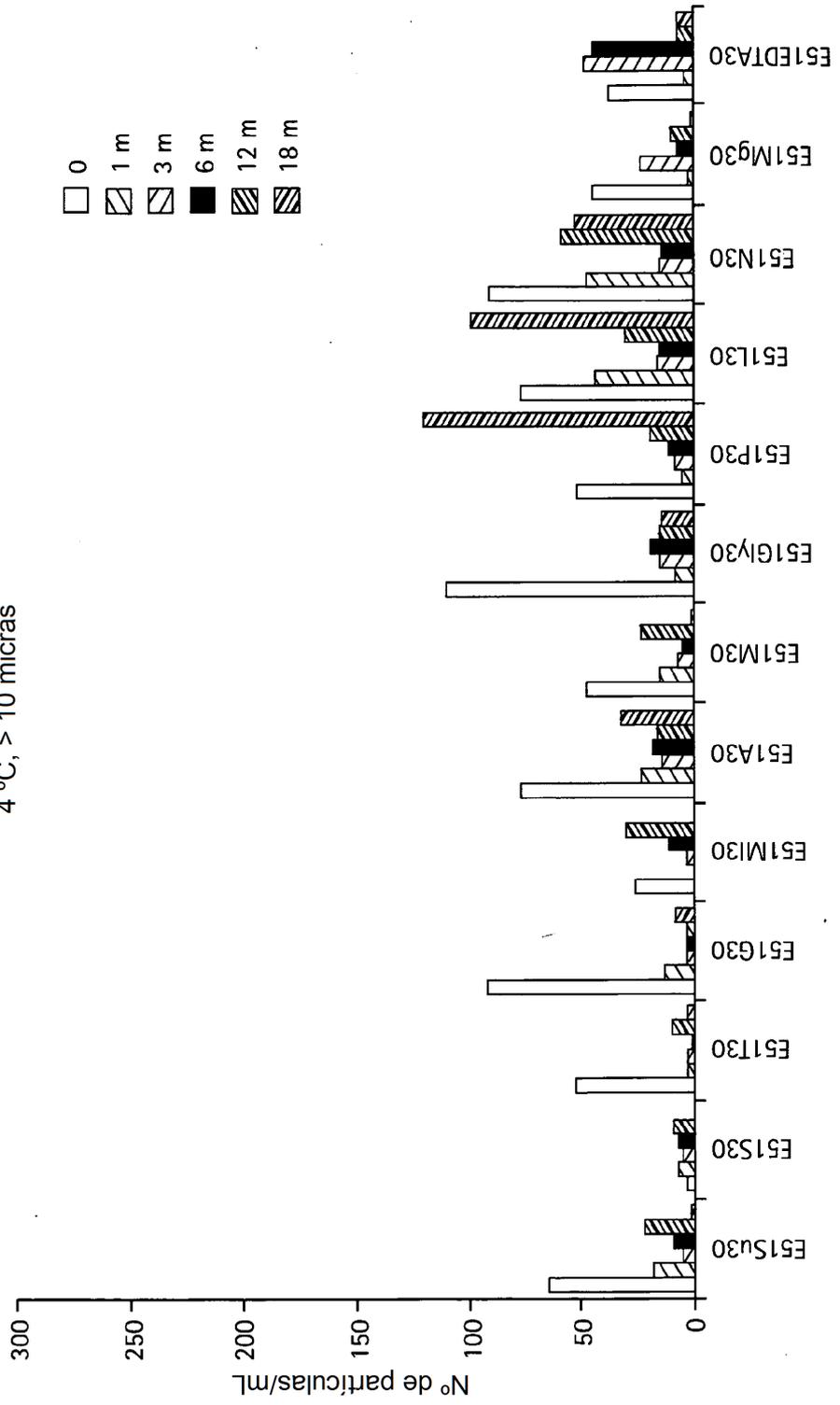


FIG. 2B
4 °C, > 25 micras

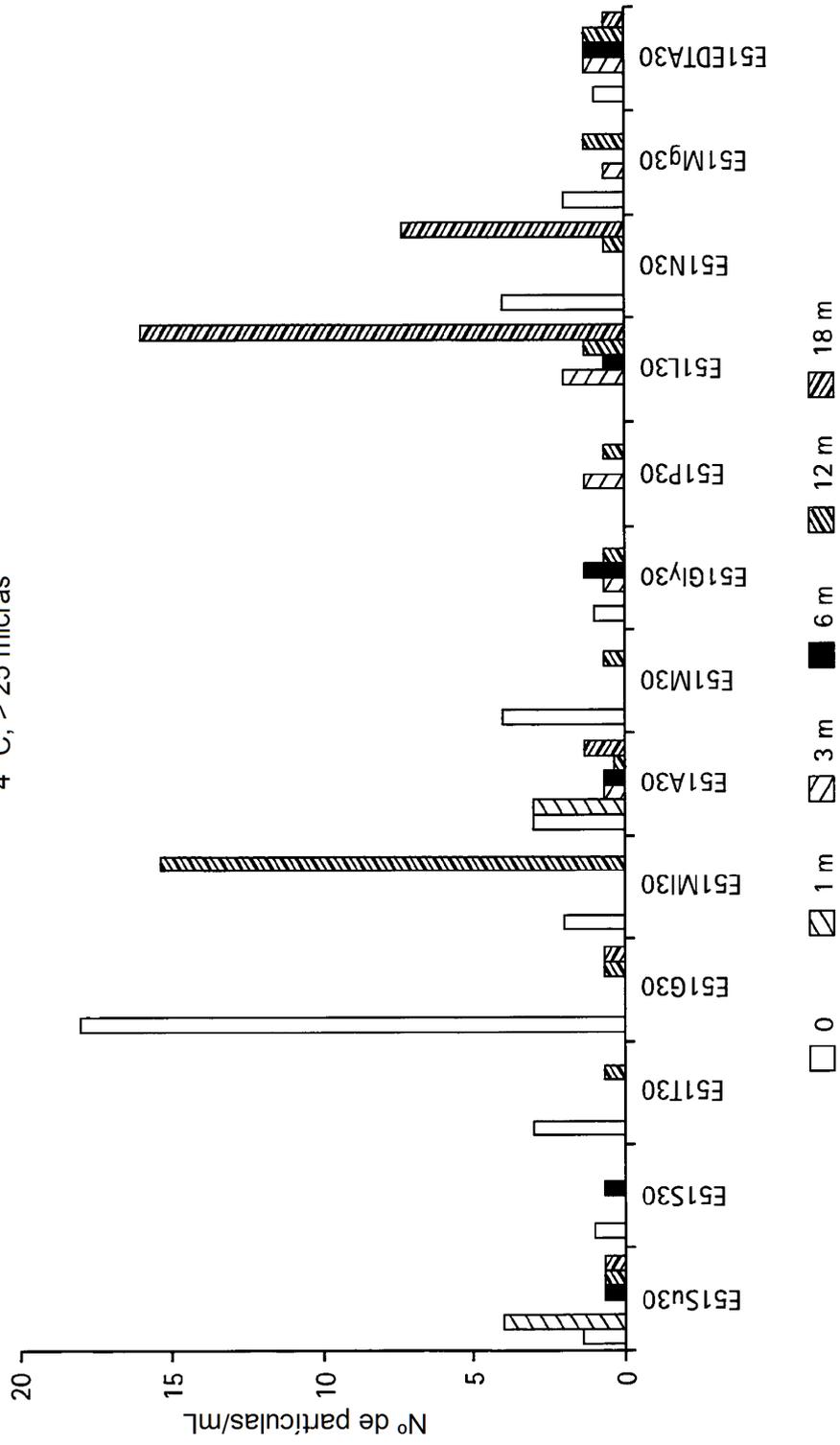


FIG. 2C
25 °C, > 10 micras

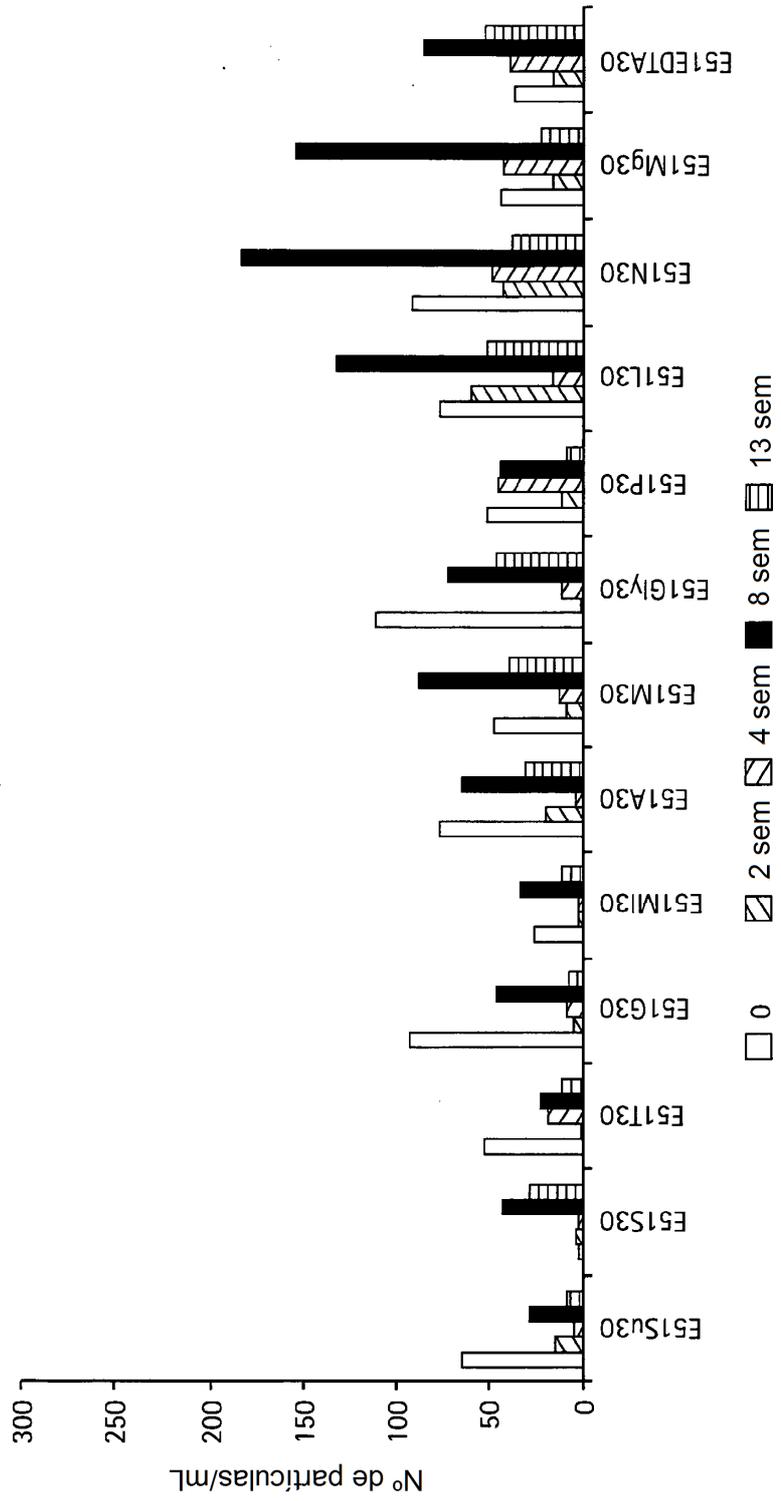


FIG. 2D

25 °C, > 25 micras

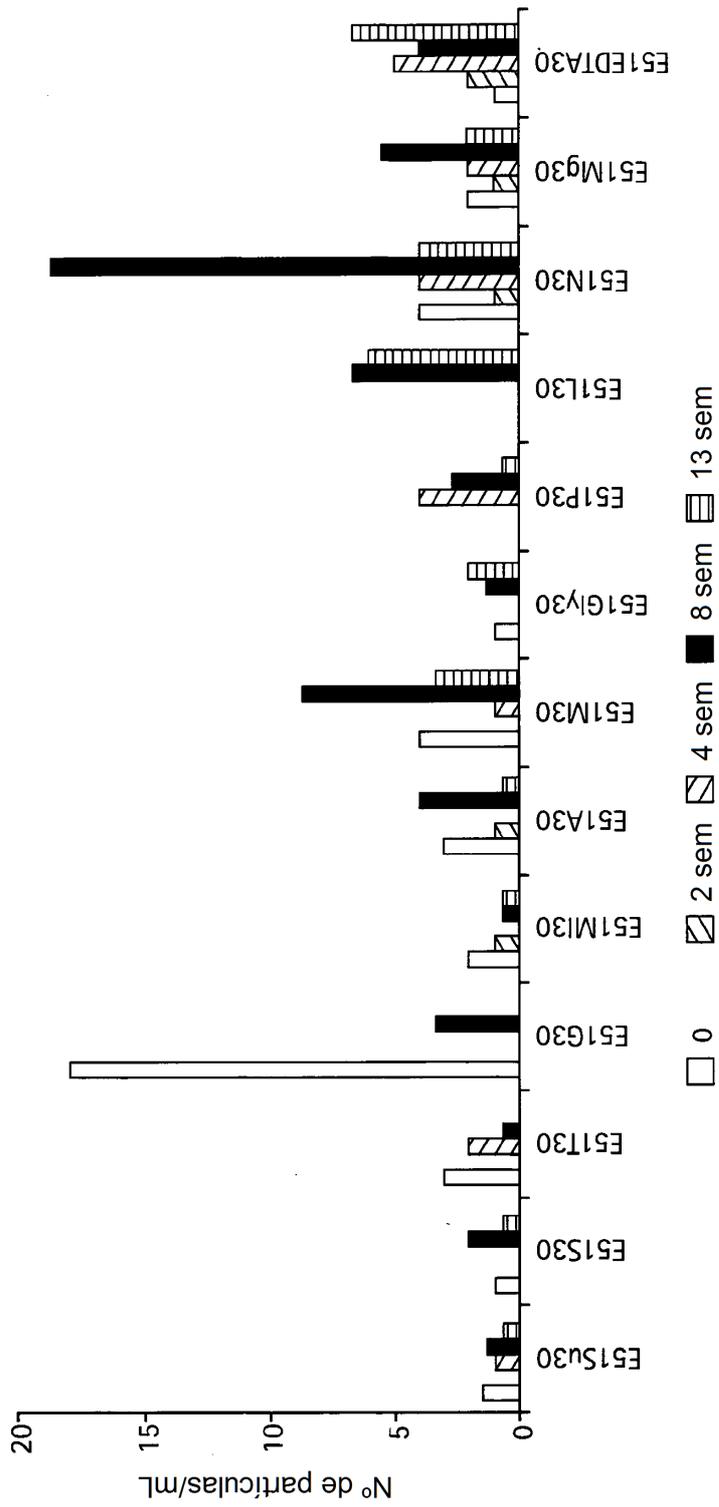


FIG. 2E
37 °C, > 10 micras

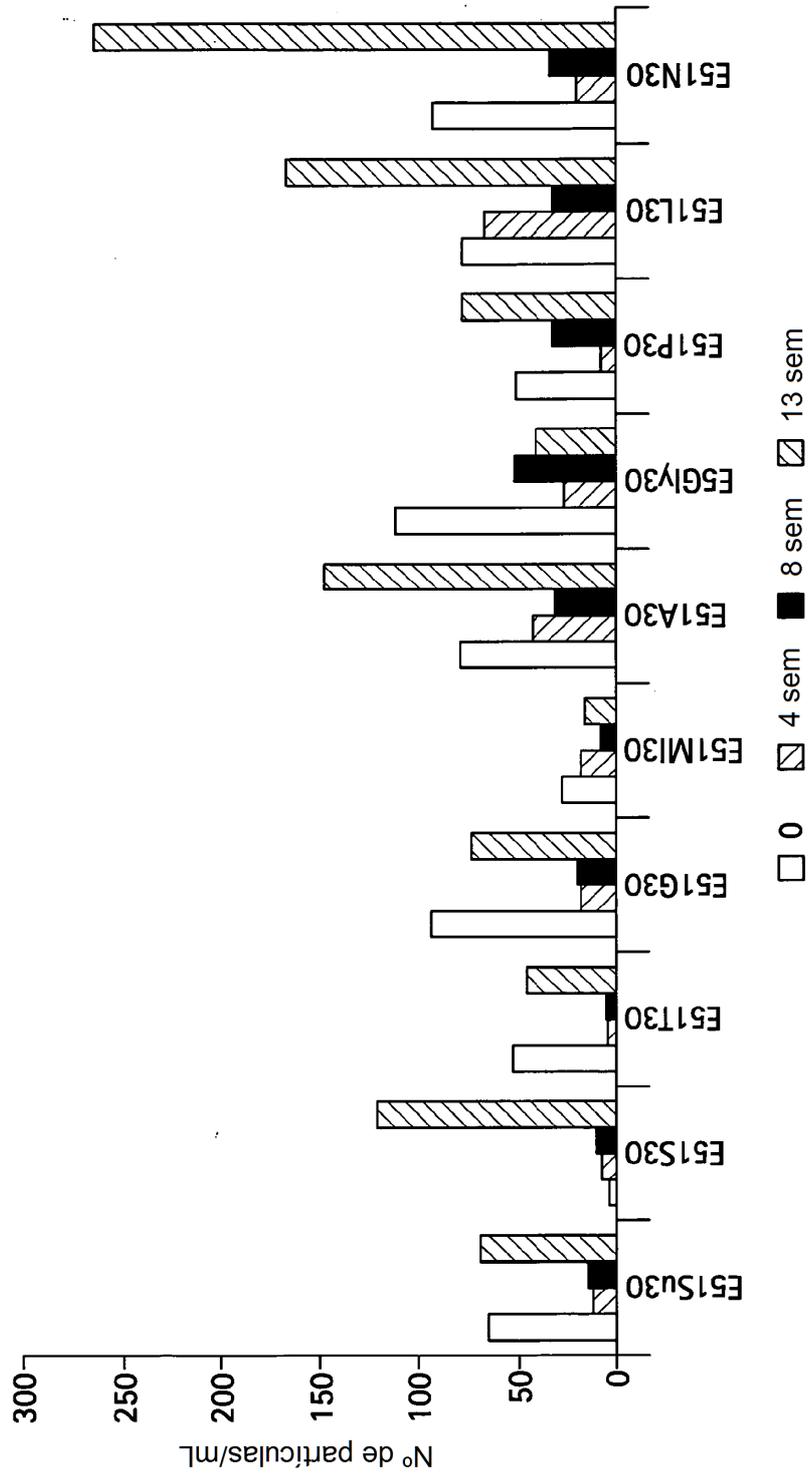


FIG. 2F
37 °C, > 25 micras

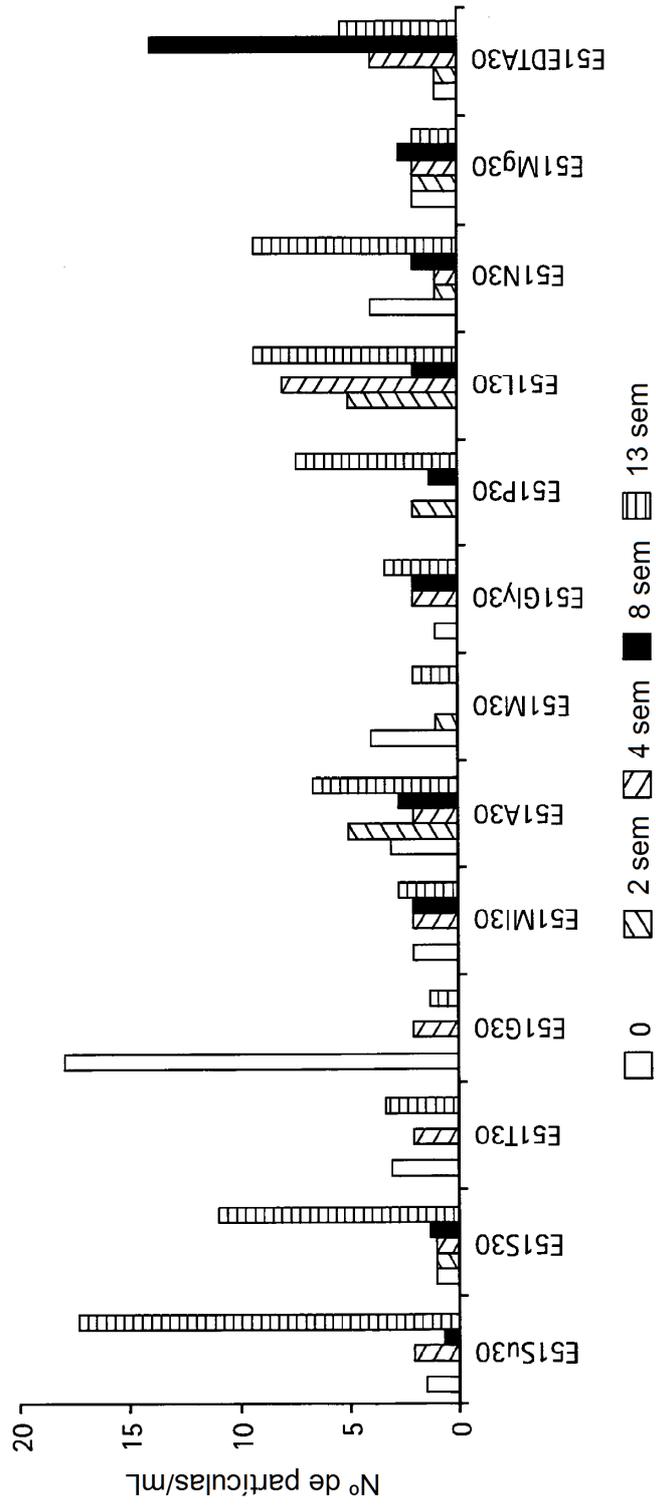


FIG. 3A

Congelación-descongelación a -30 °C, > 10 micras



FIG. 3B

Congelación-descongelación a -30 °C, > 25 micras



FIG. 4A

Temperatura = 4 °C

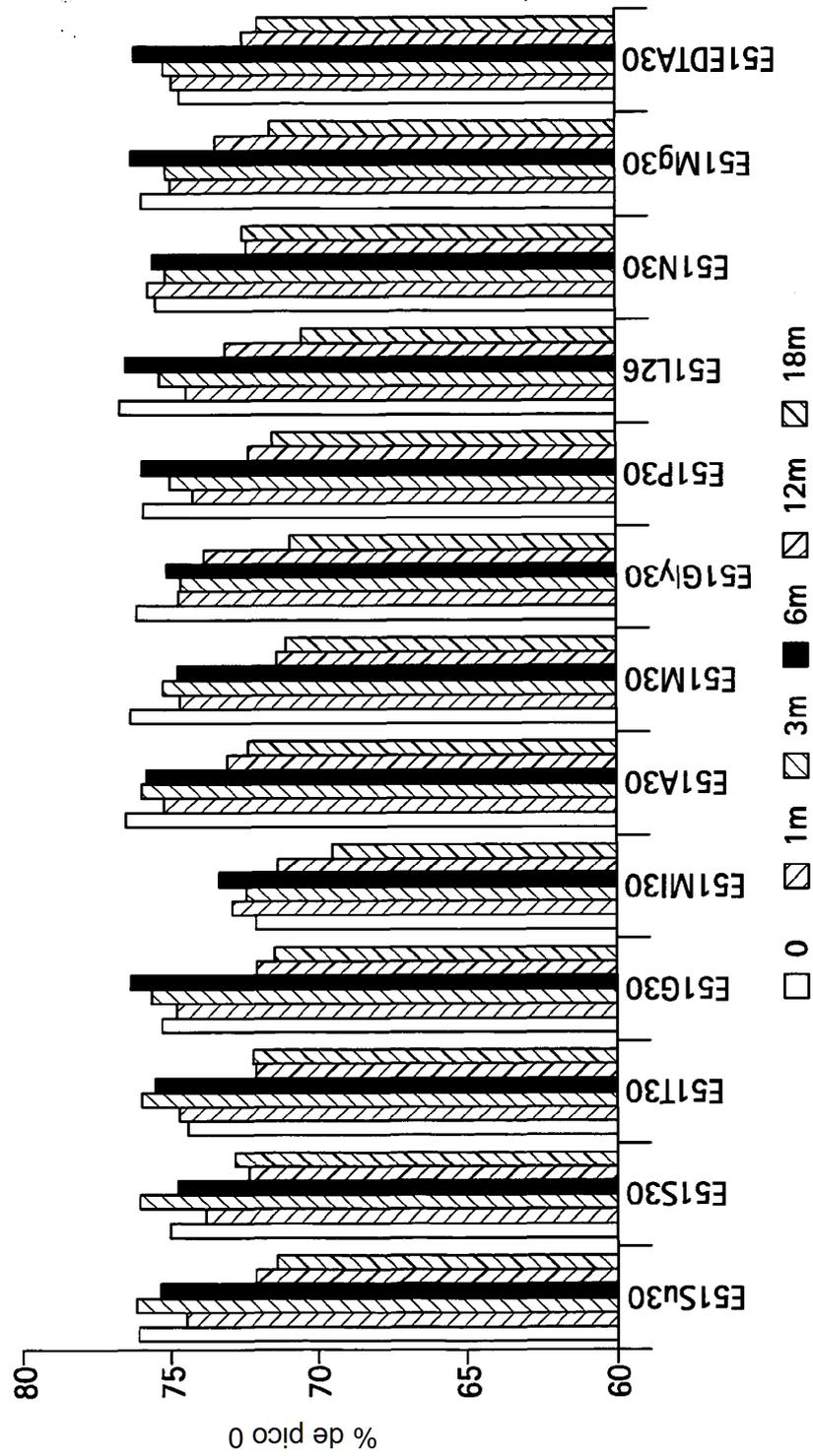


FIG. 4B

Temperatura = 25 °C

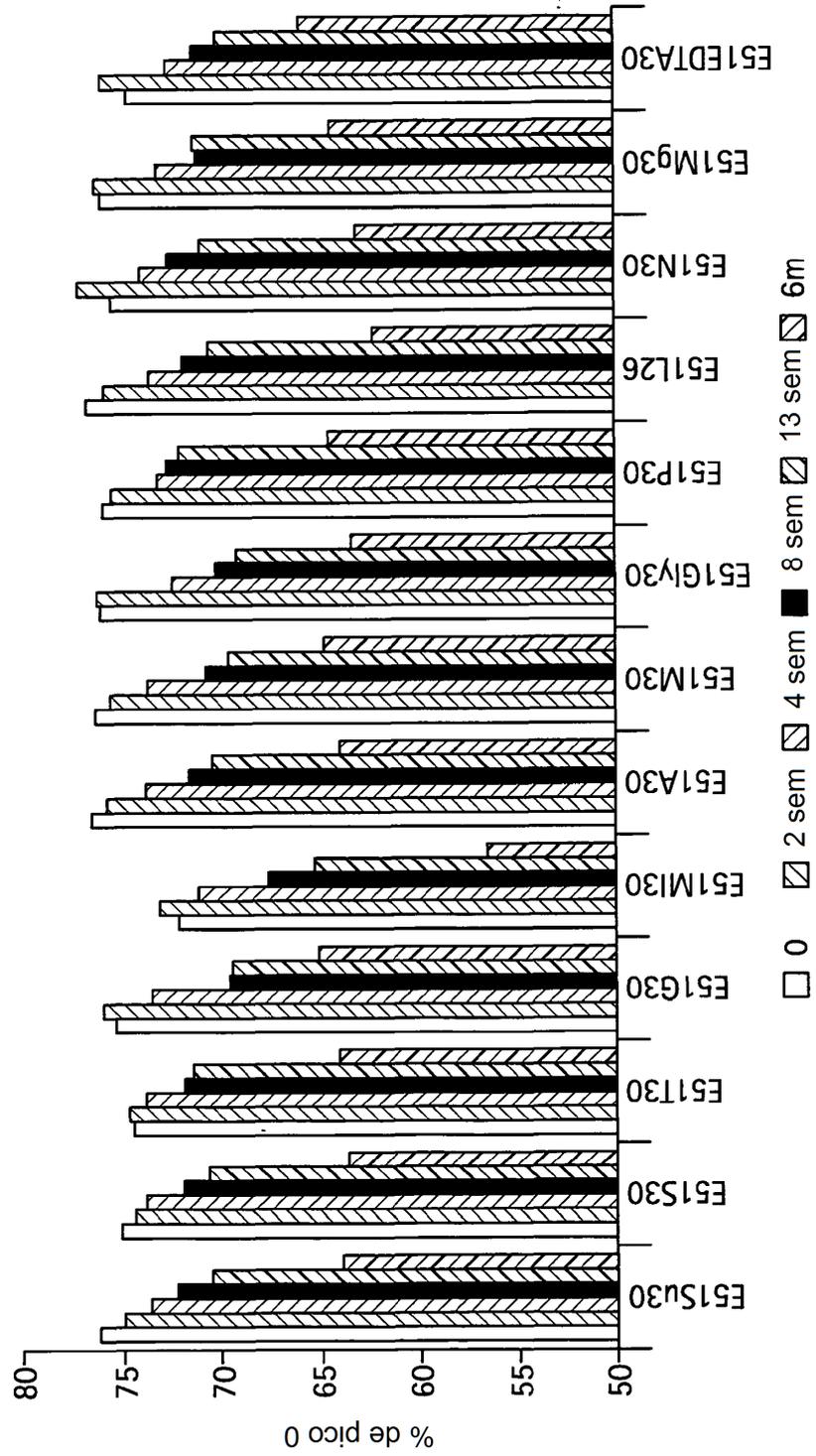


FIG. 4C

Temperatura = 37 °C

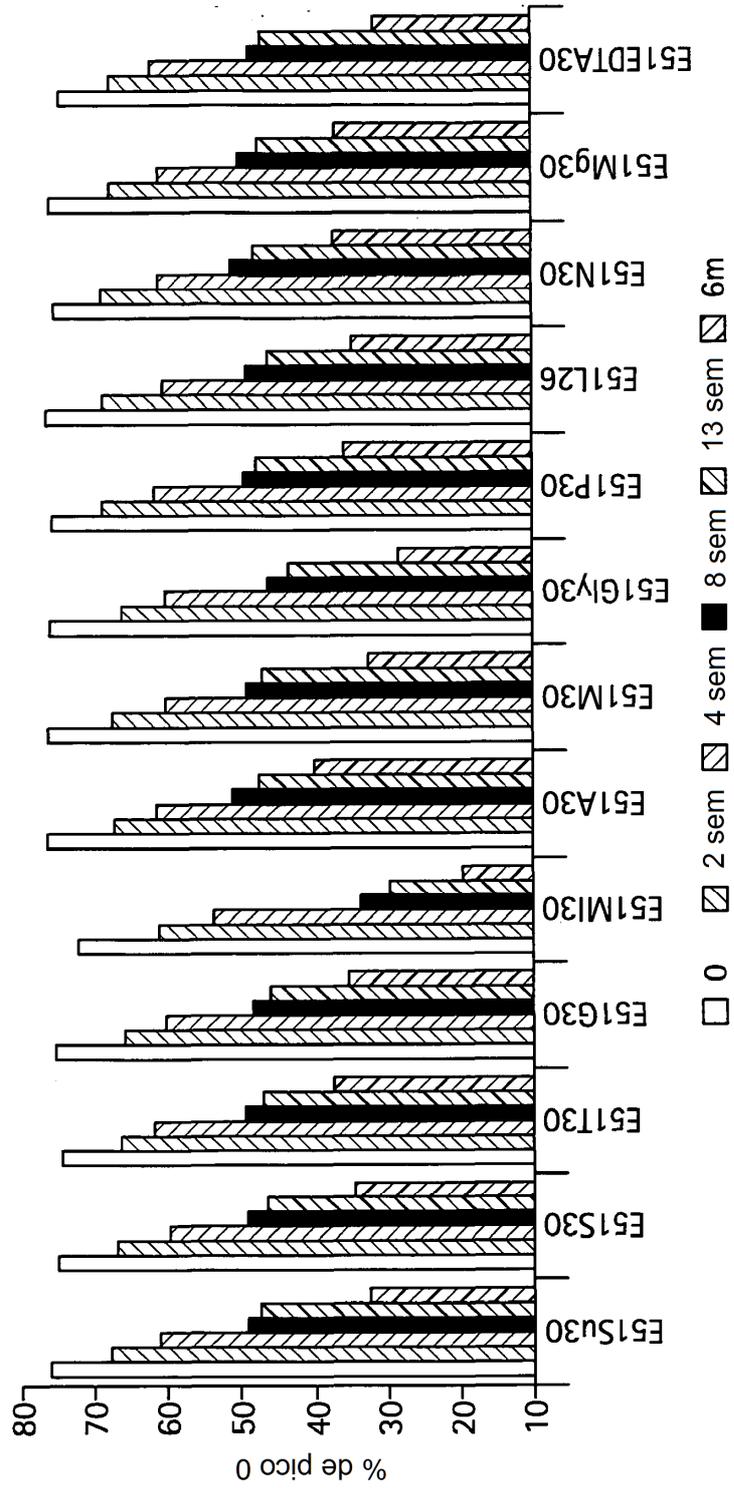


FIG. 5A

Viales, T = 37 °C, 40 mg/mL

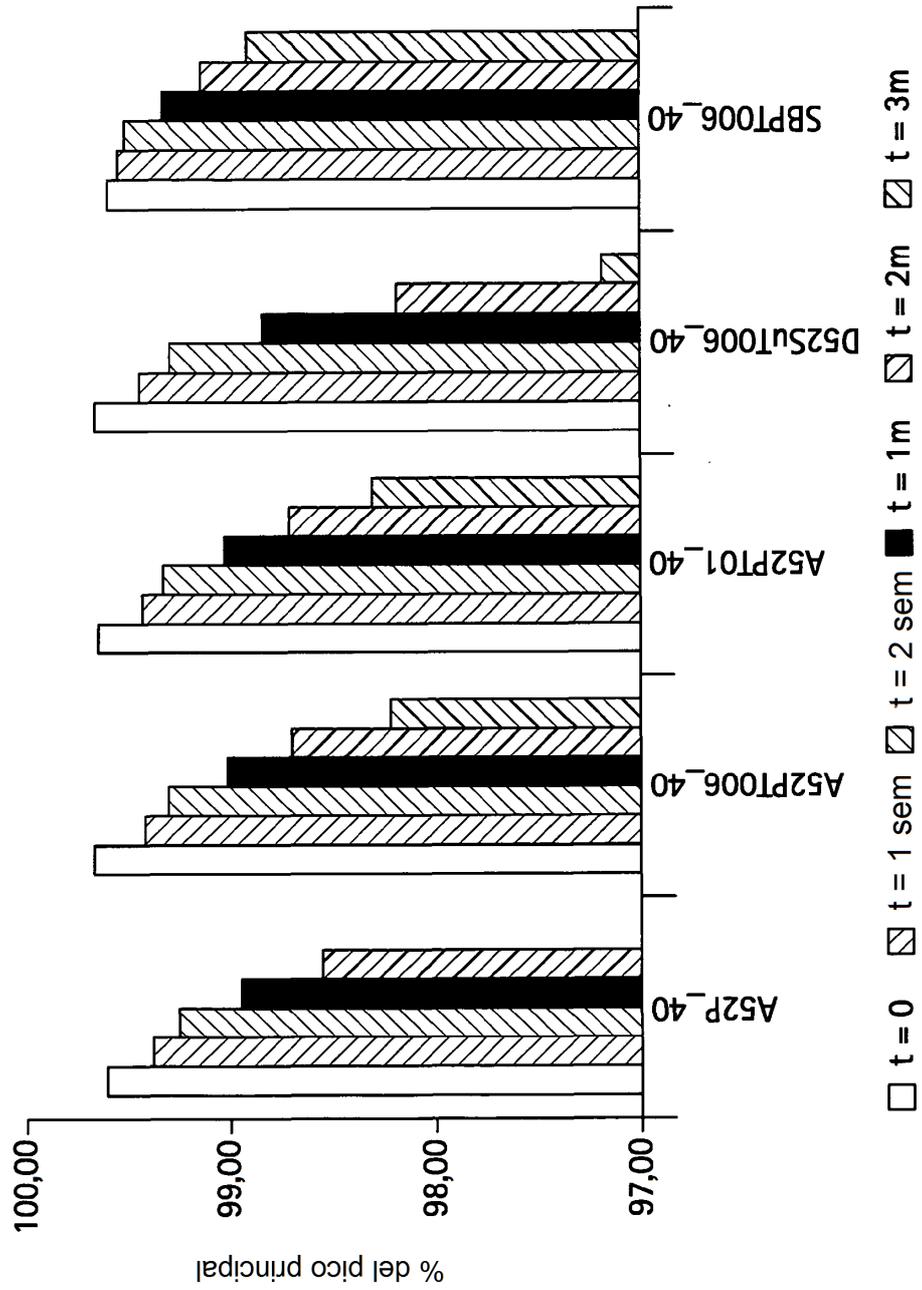


FIG. 5B

Jeringas precargadas, T = 37 °C, 40 mg/mL



FIG. 5C

Viales, T = 25 °C, 40 mg/mL

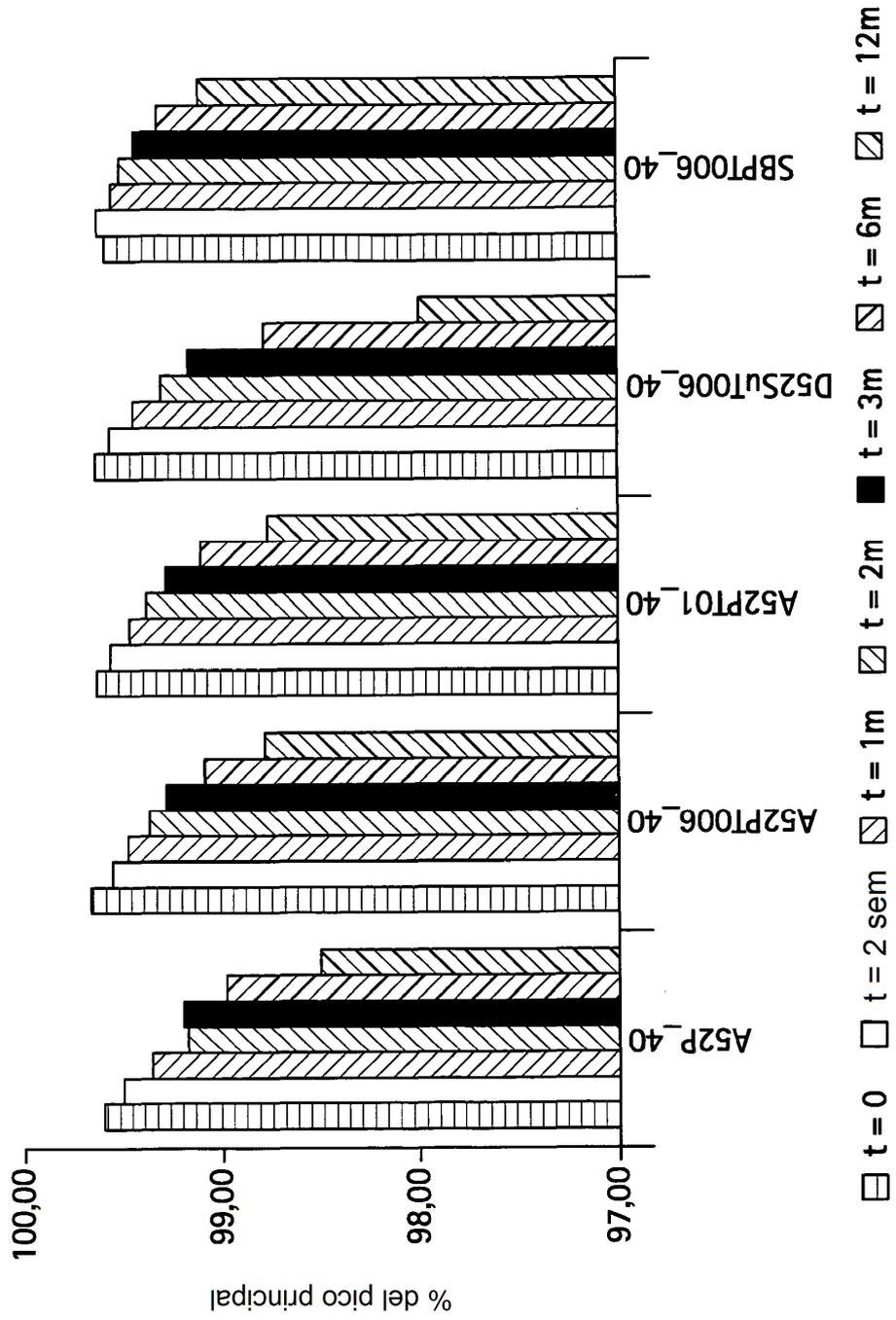


FIG. 5D

Jeringas precargadas, T = 25 °C, 40 mg/mL

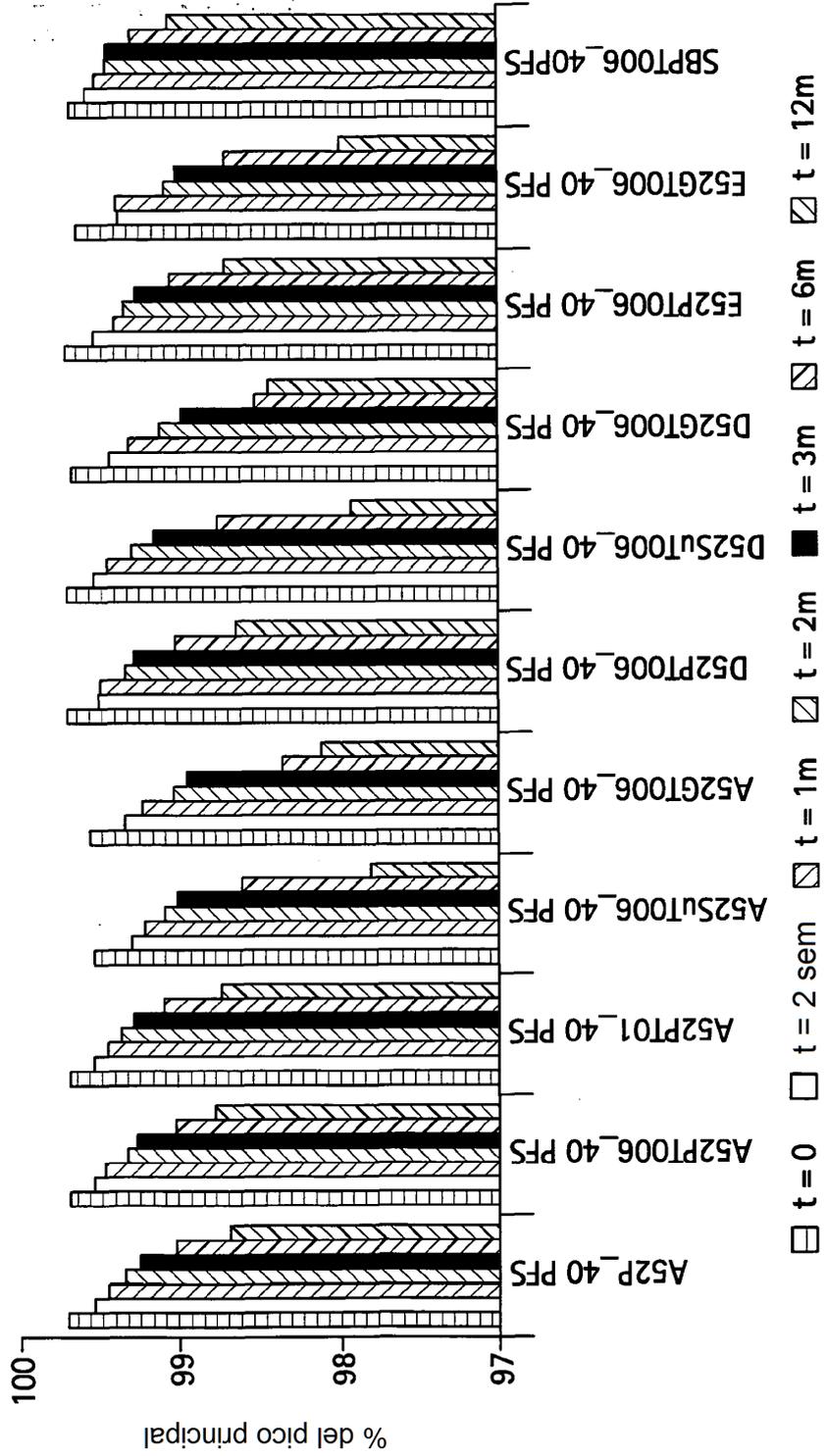


FIG. 5E

Viales, T = 37 °C, 3 mg/mL

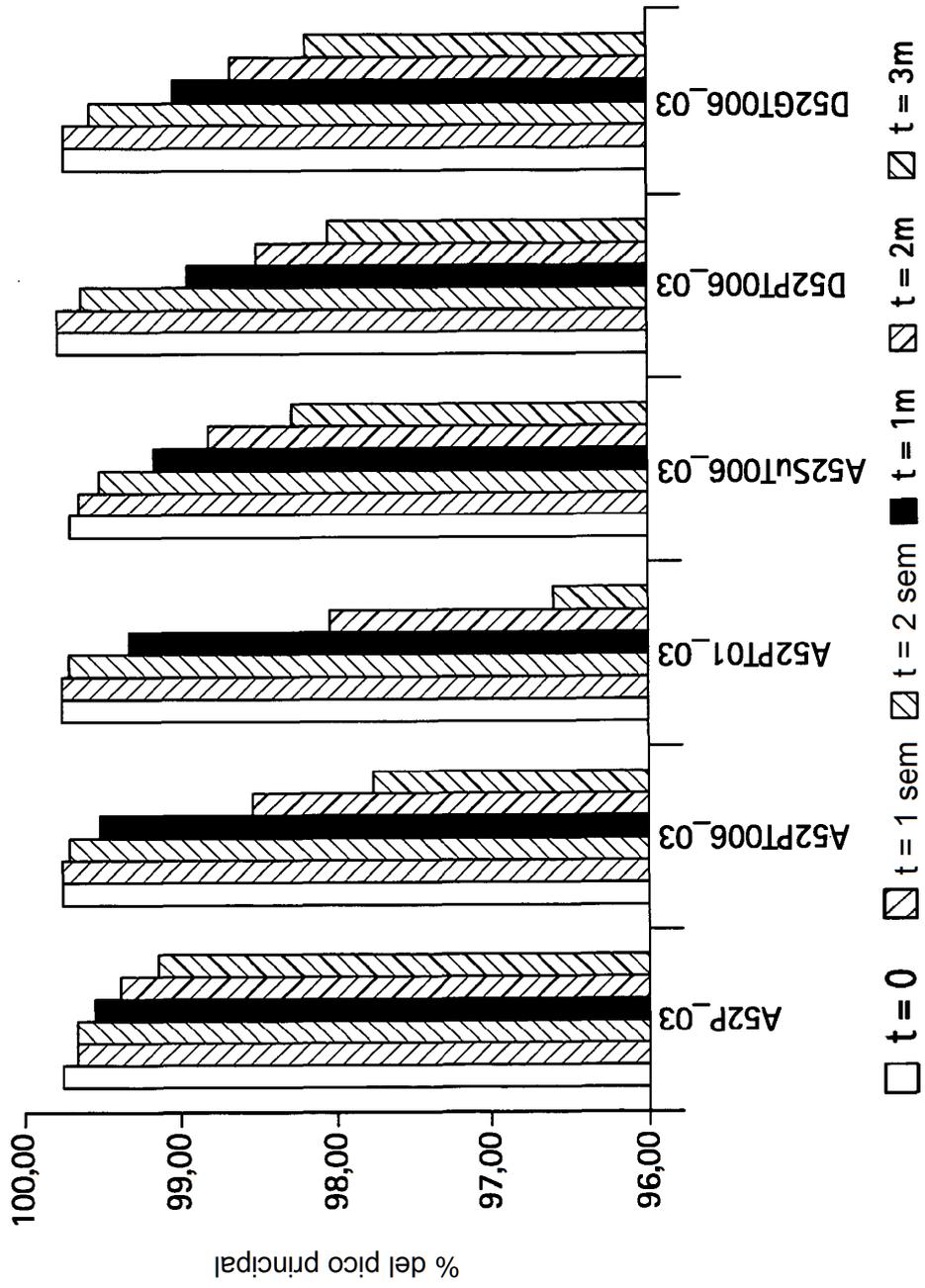


FIG. 5F

Jeringas precargadas, T = 37 °C, 3 mg/mL

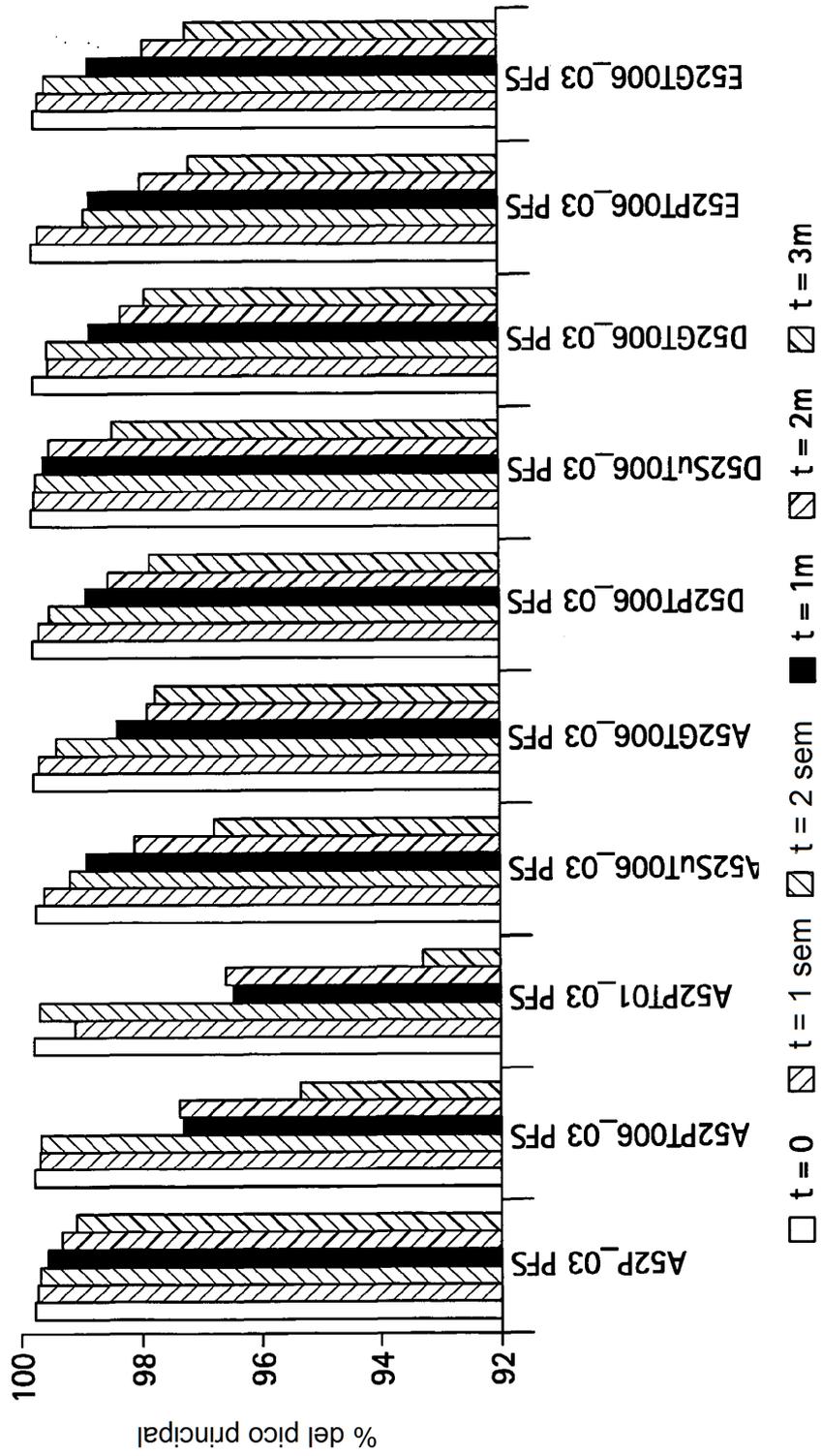


FIG. 5G

Viales, T = 25 °C, 3 mg/mL

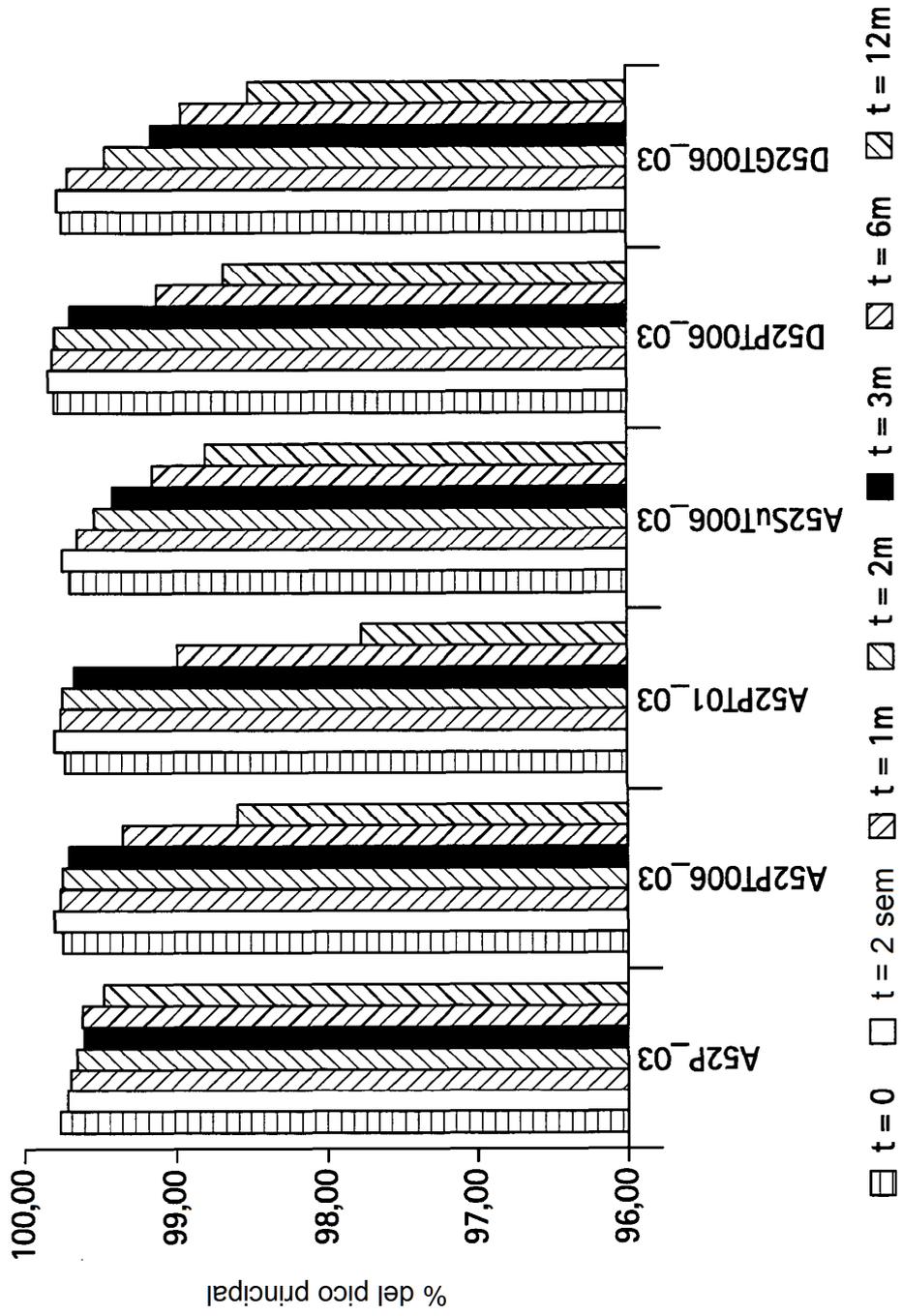


FIG. 5H

Jeringas precargadas, T = 25 °C, 3 mg/mL

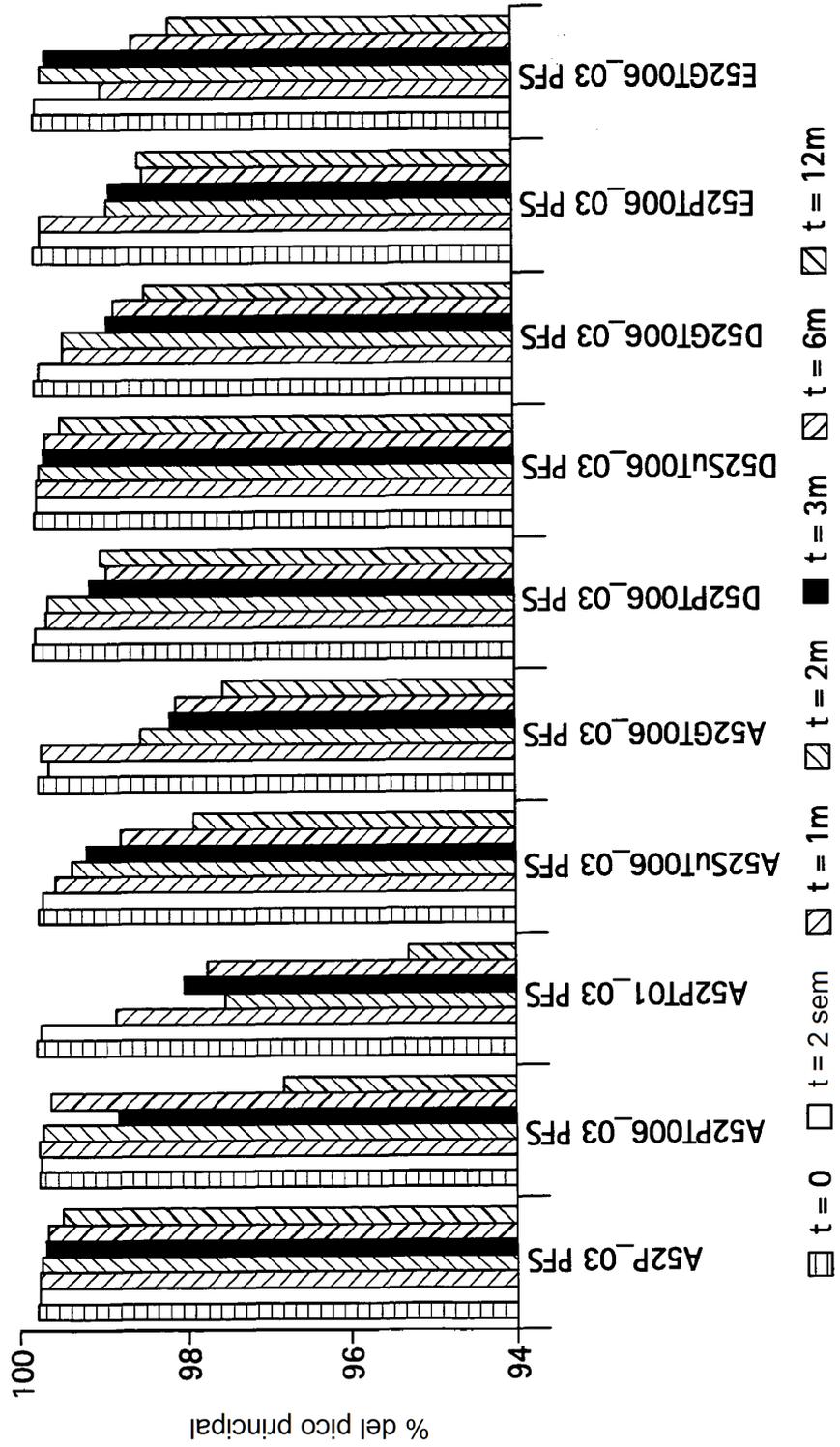


FIG. 6A

Viales, T = 37 °C, 40 mg/mL

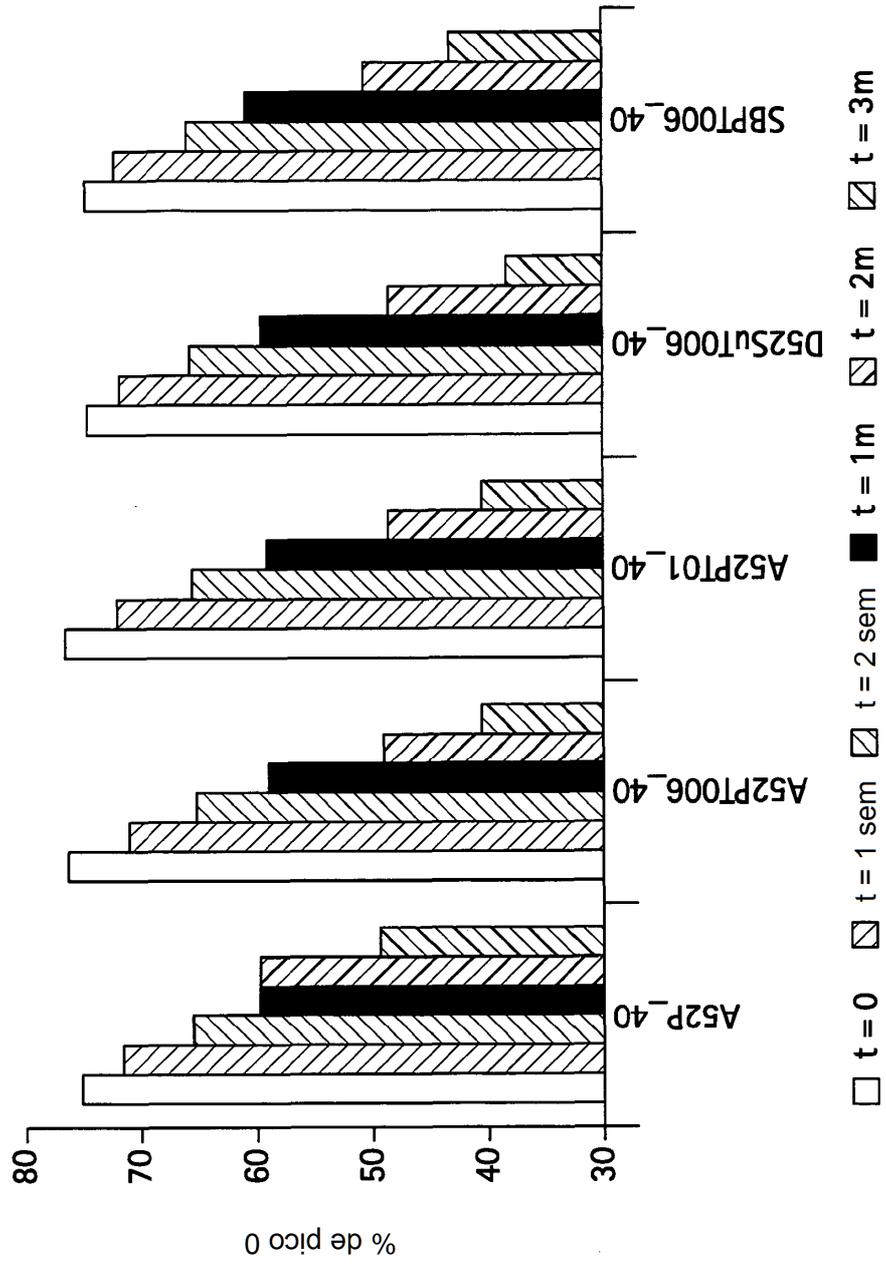


FIG. 6B

Jeringa precargada, T = 37 °C, 40 mg/mL

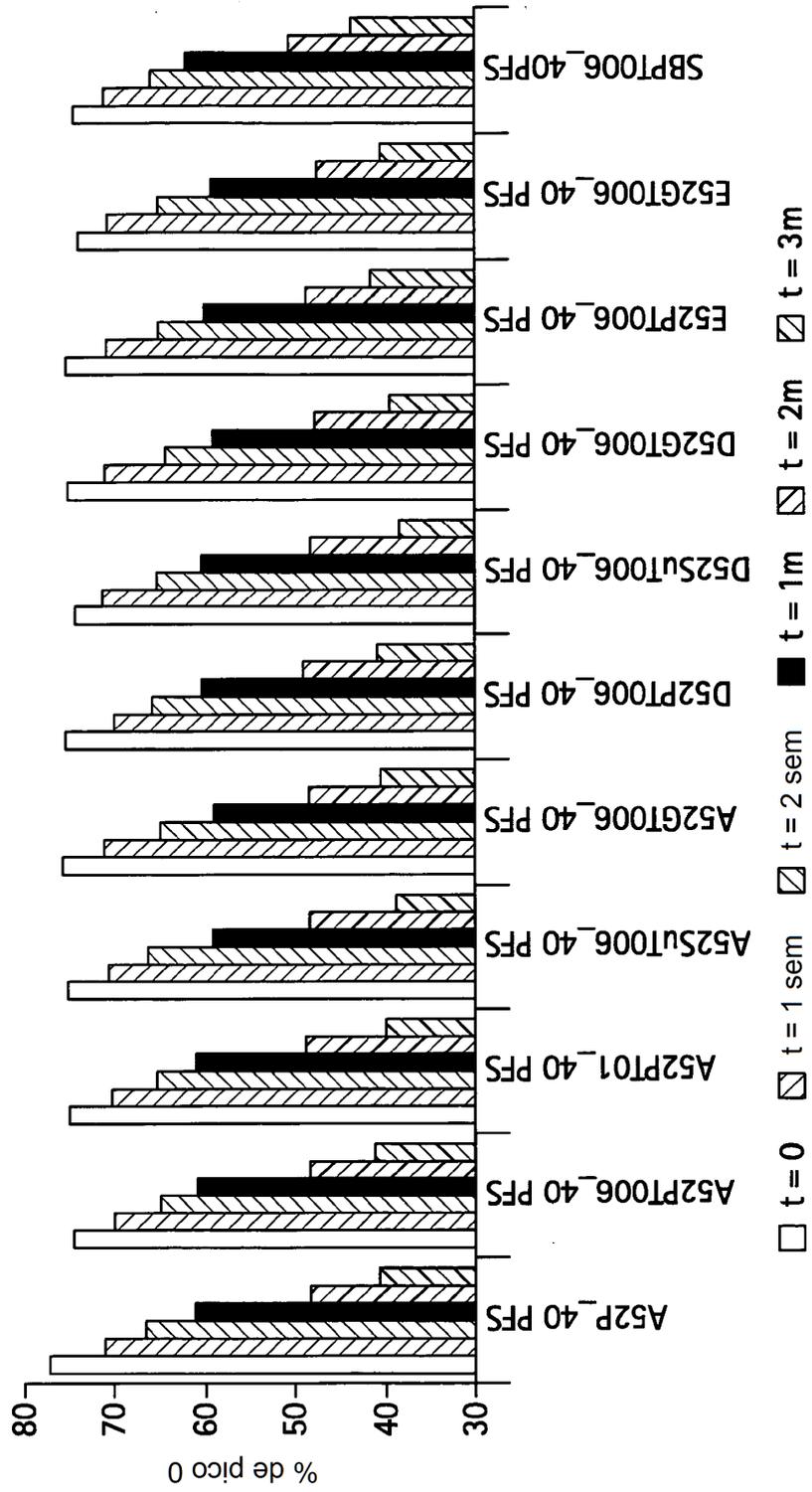


FIG. 6C

Viales, T = 25 °C, 40 mg/mL

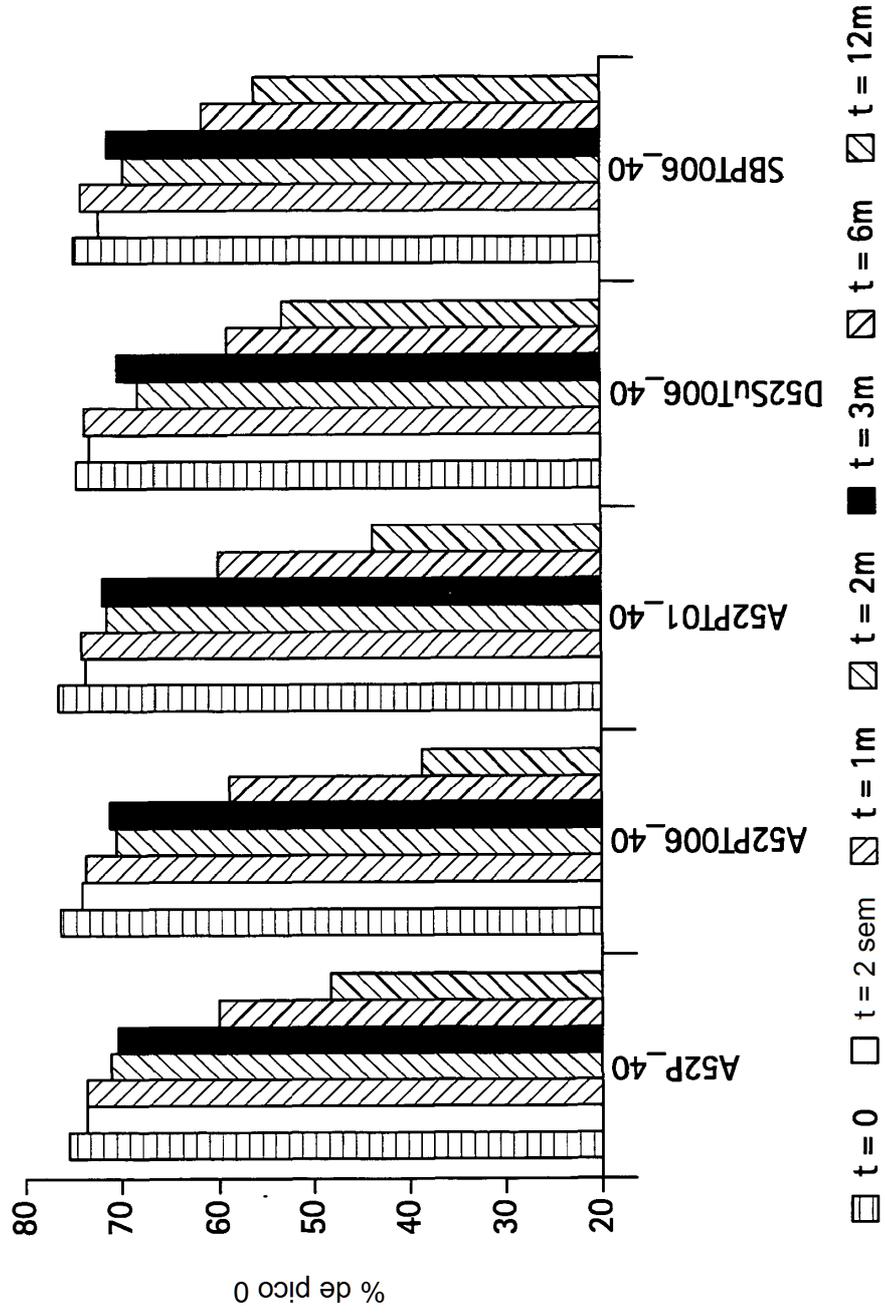


FIG. 6D

Jeringa precargada, T = 25 °C, 40 mg/mL

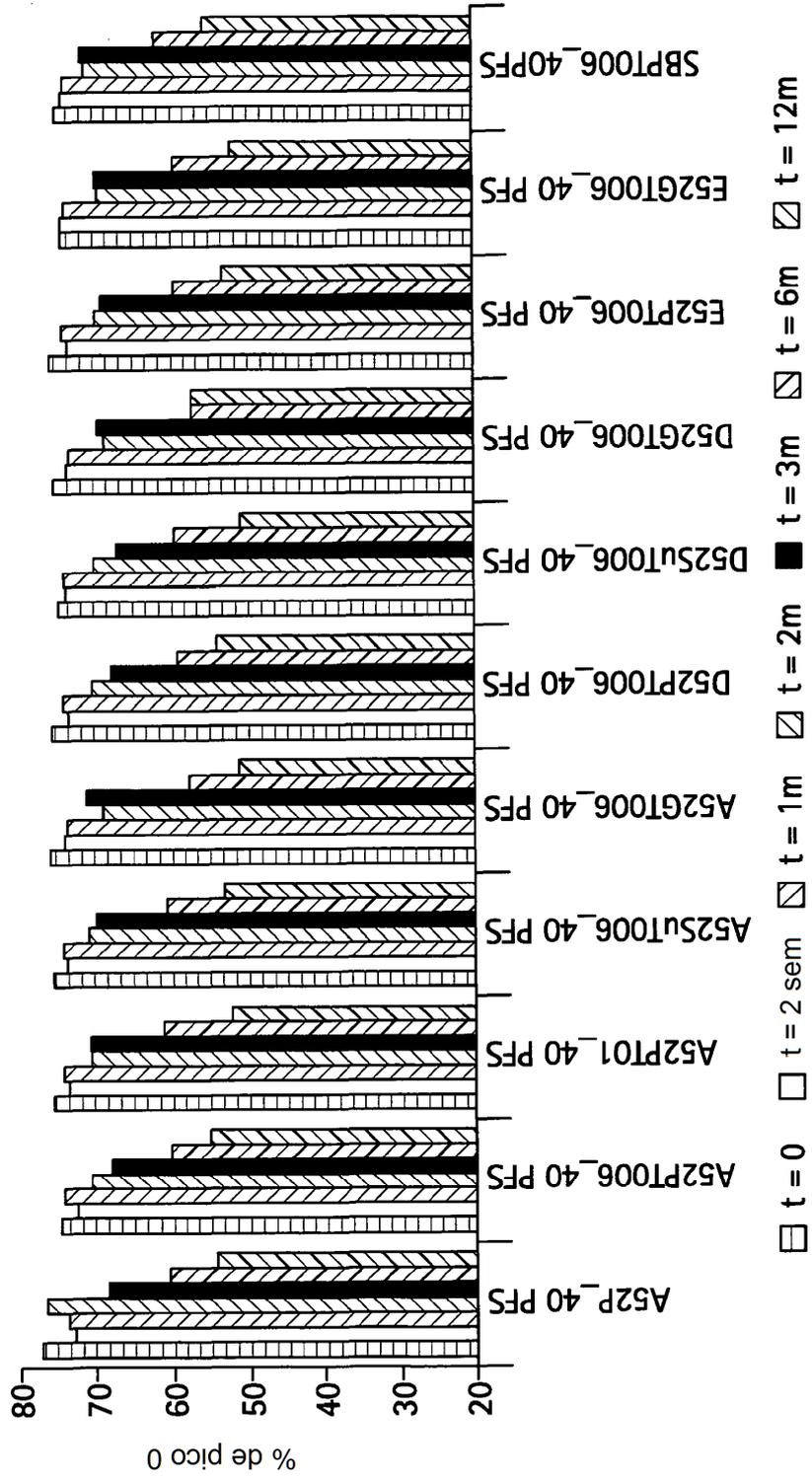


FIG. 6E

Viales, T = 37 °C, 3 mg/mL

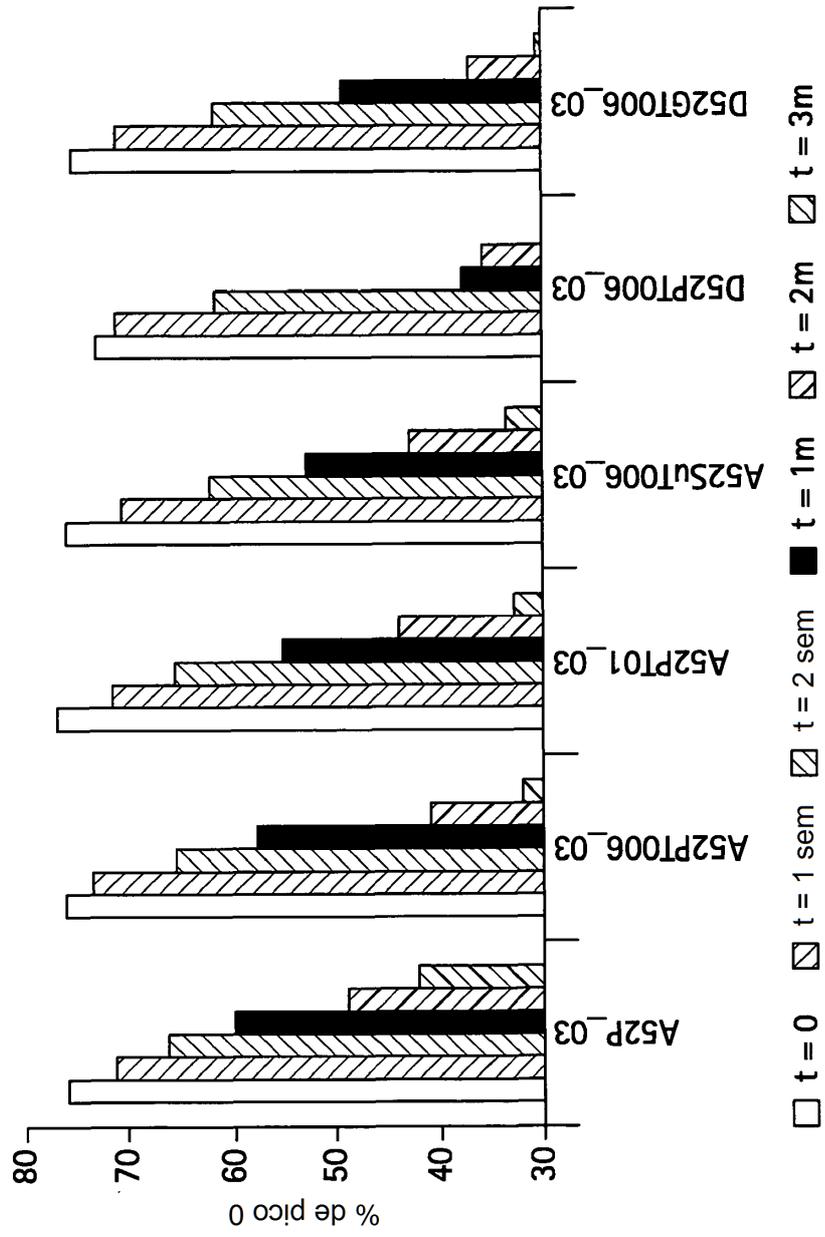


FIG. 6F

Jeringa precargada, T = 37 °C, 3 mg/mL

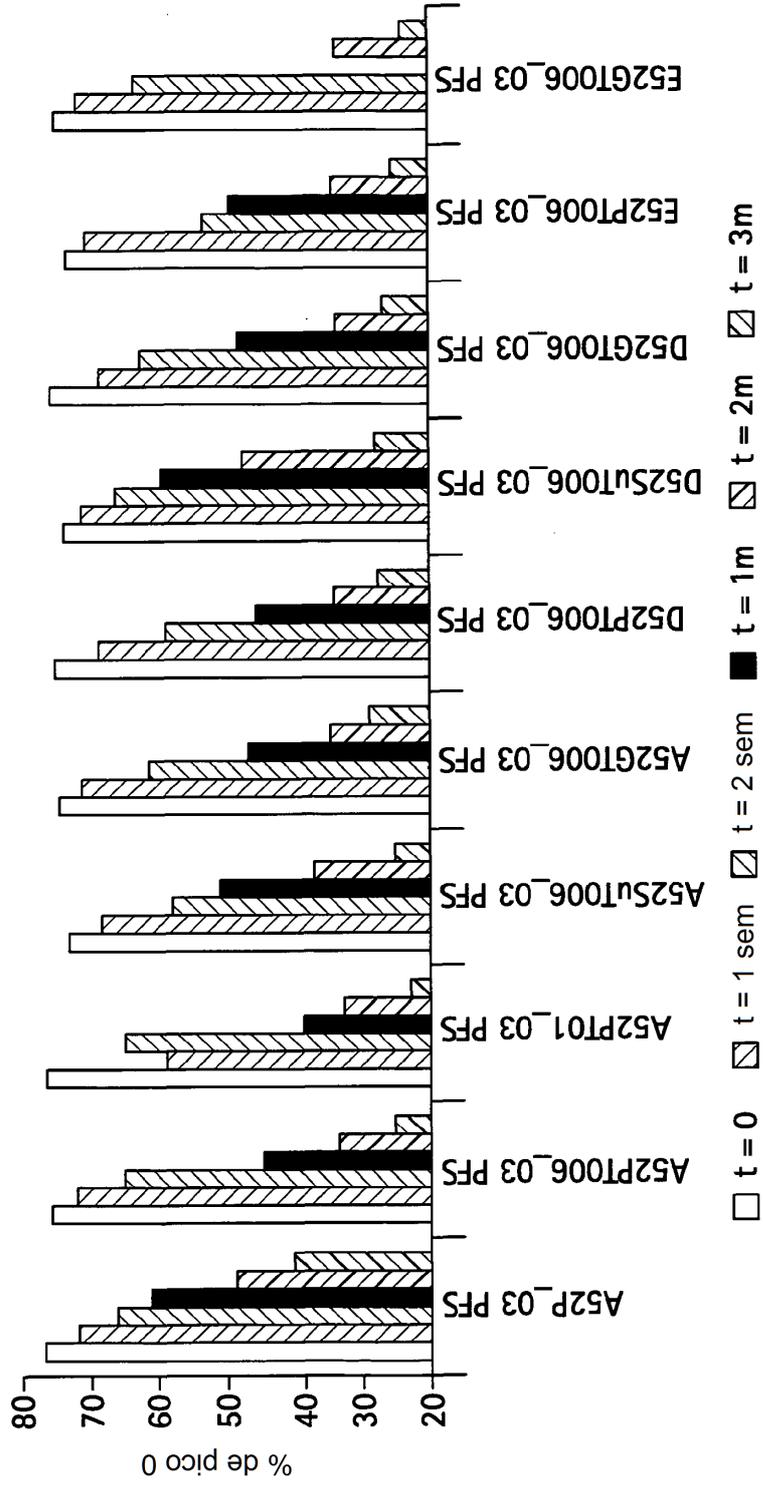


FIG. 6G

Viales, T = 25 °C, 3 mg/mL

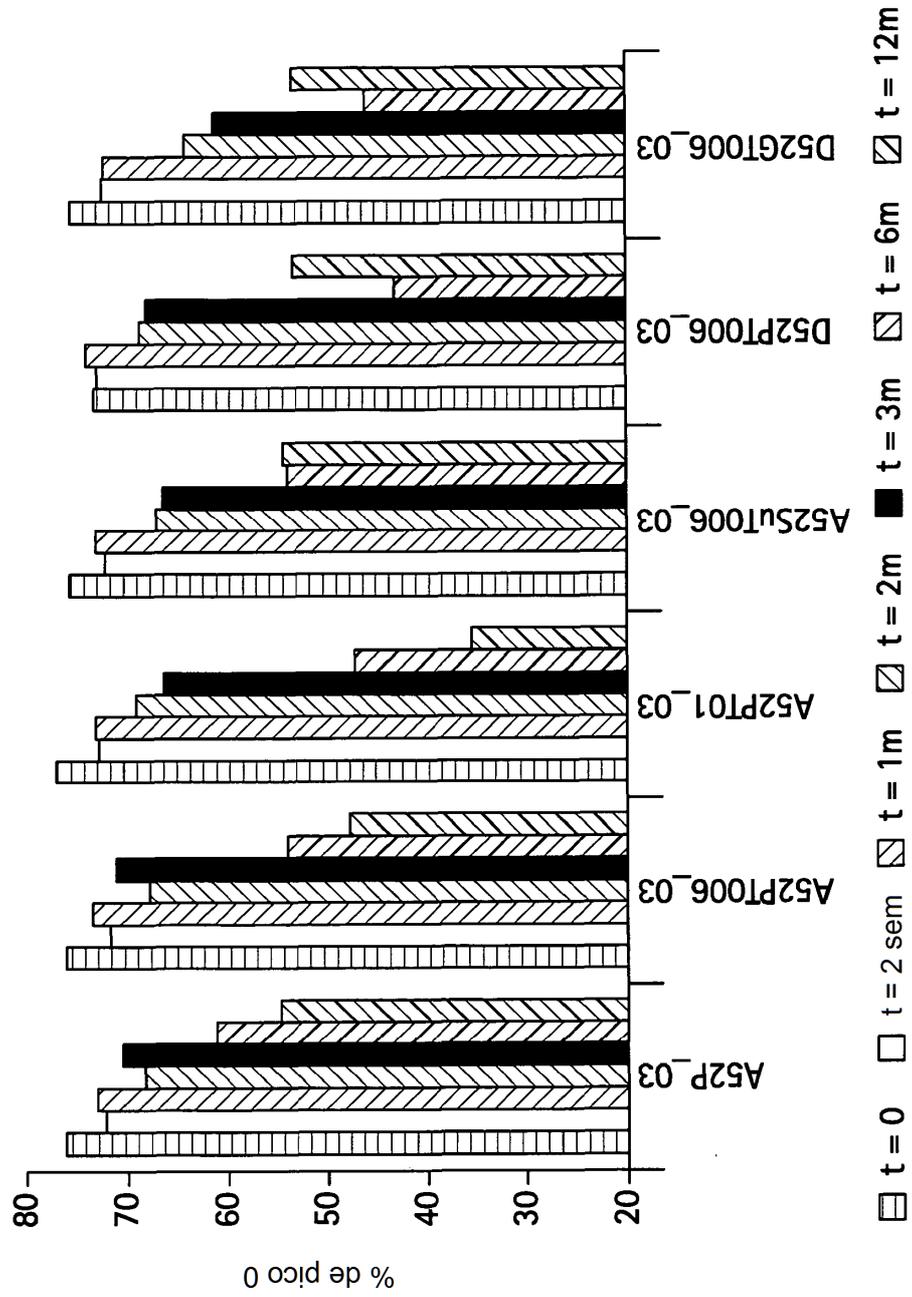


FIG. 6H

Jeringa precargada, T = 25 °C, 3 mg/mL

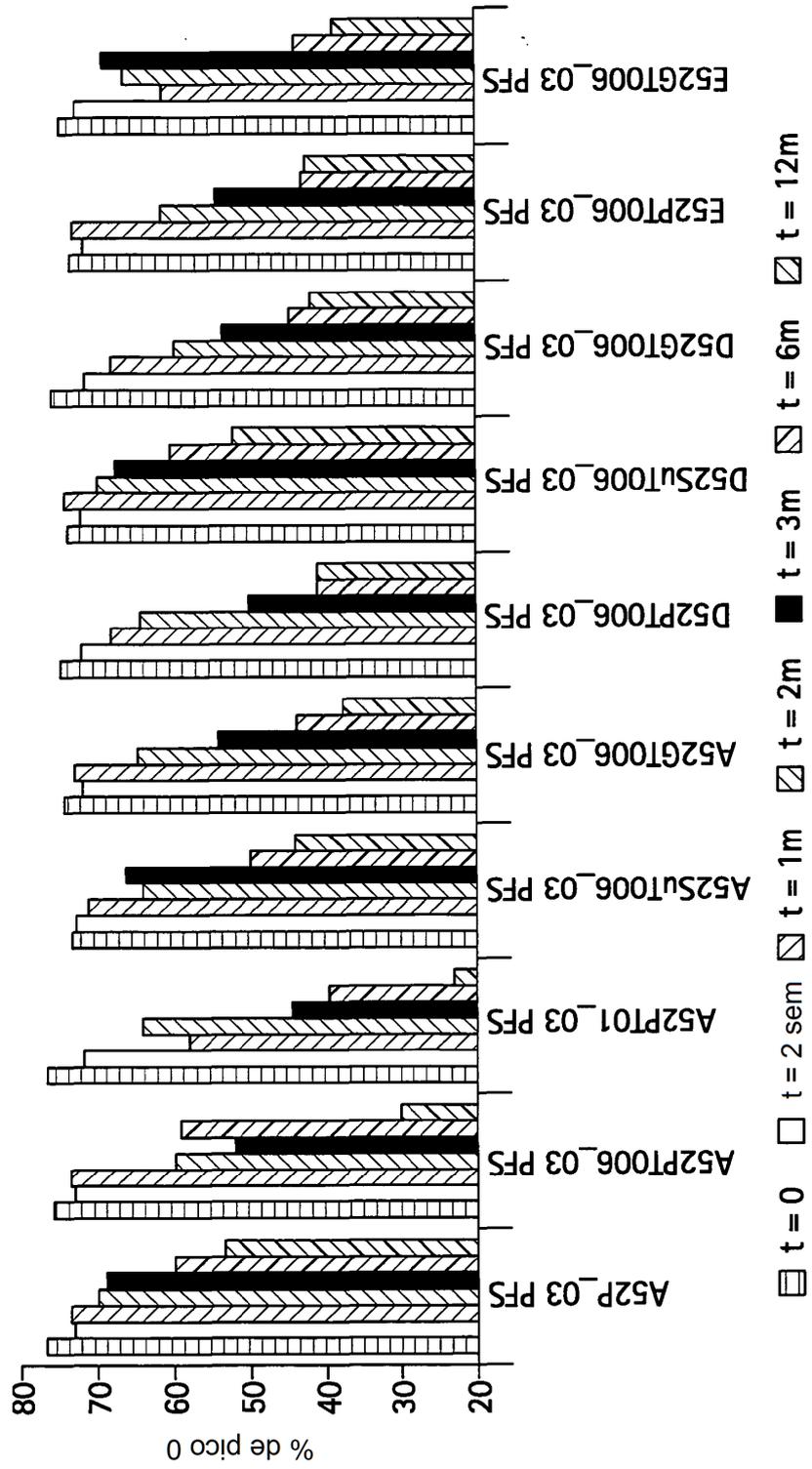


FIG. 7A

T = -30 °C, 40 mg/mL

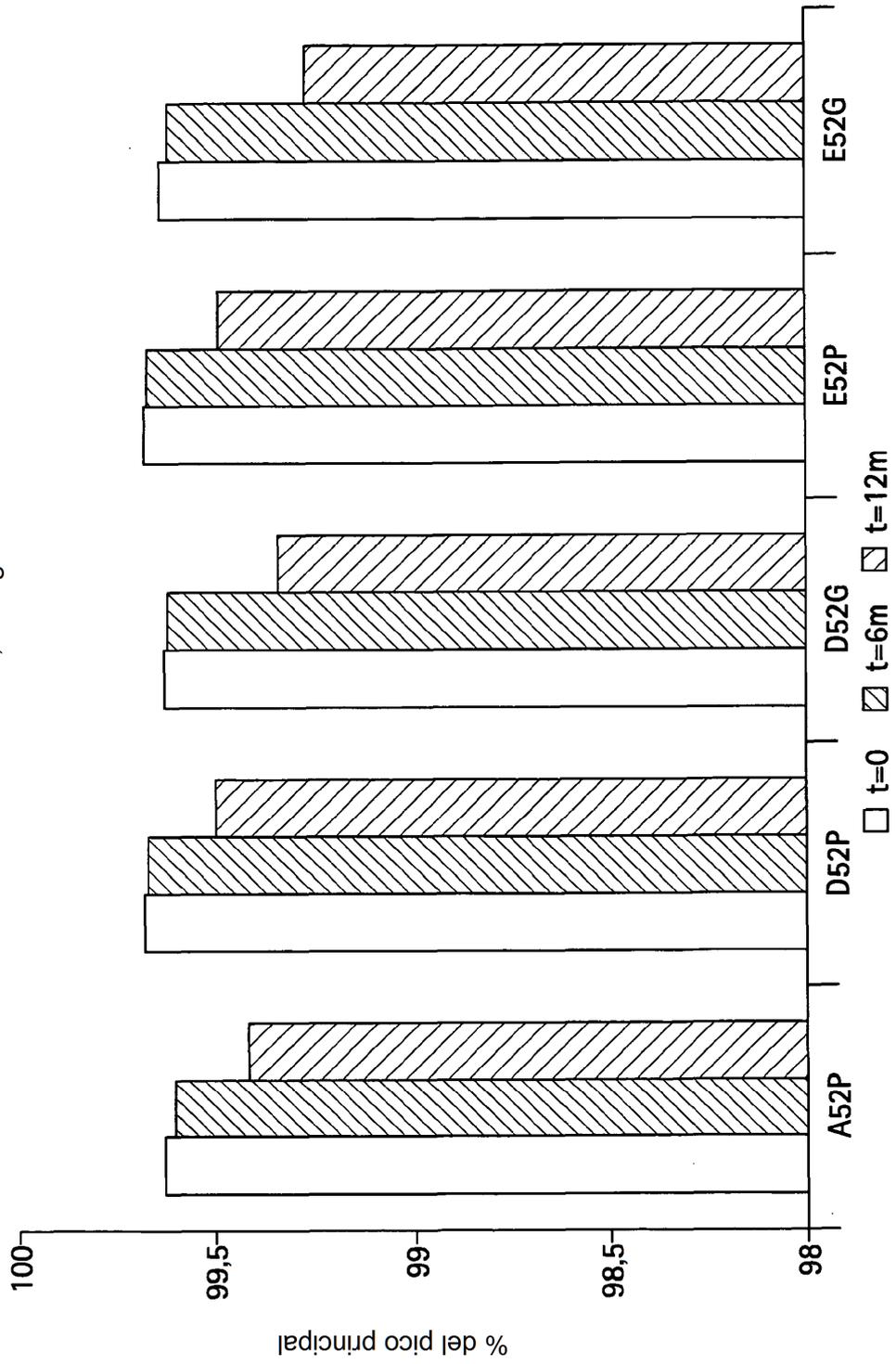


FIG. 7B

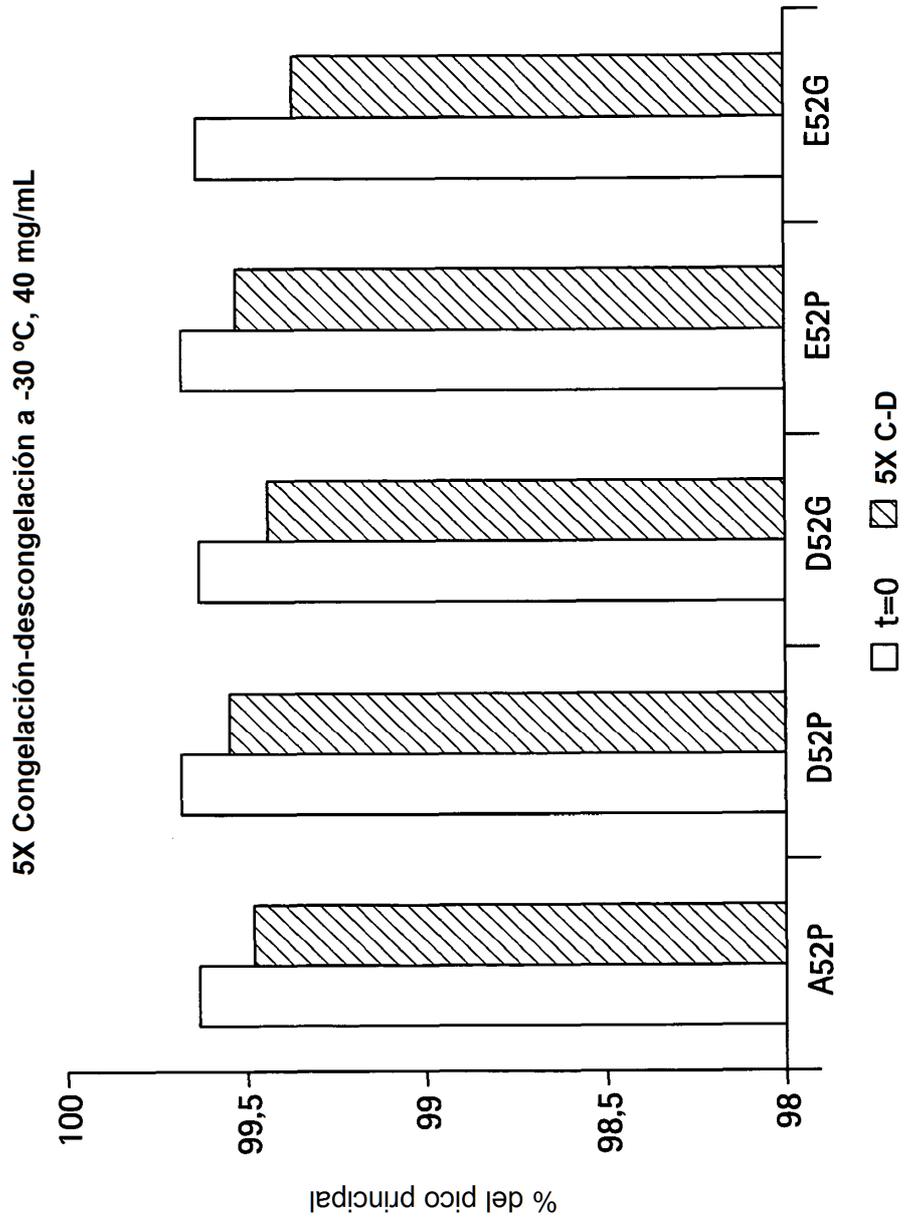


FIG. 8A

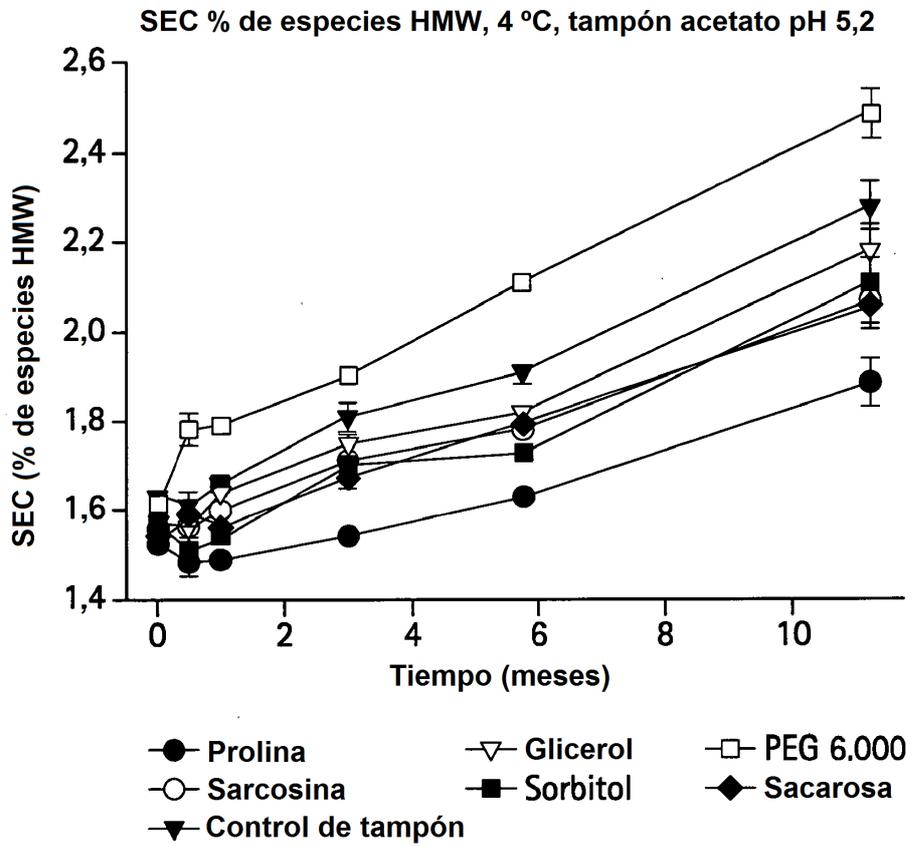


FIG. 8B

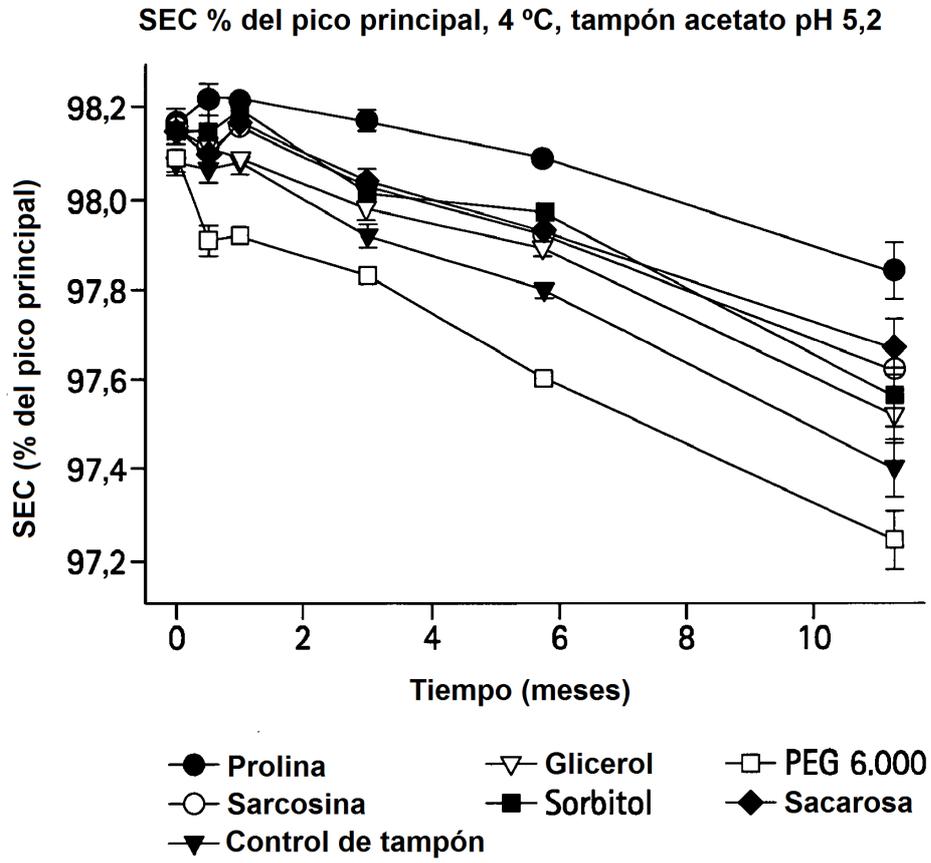


FIG. 8C

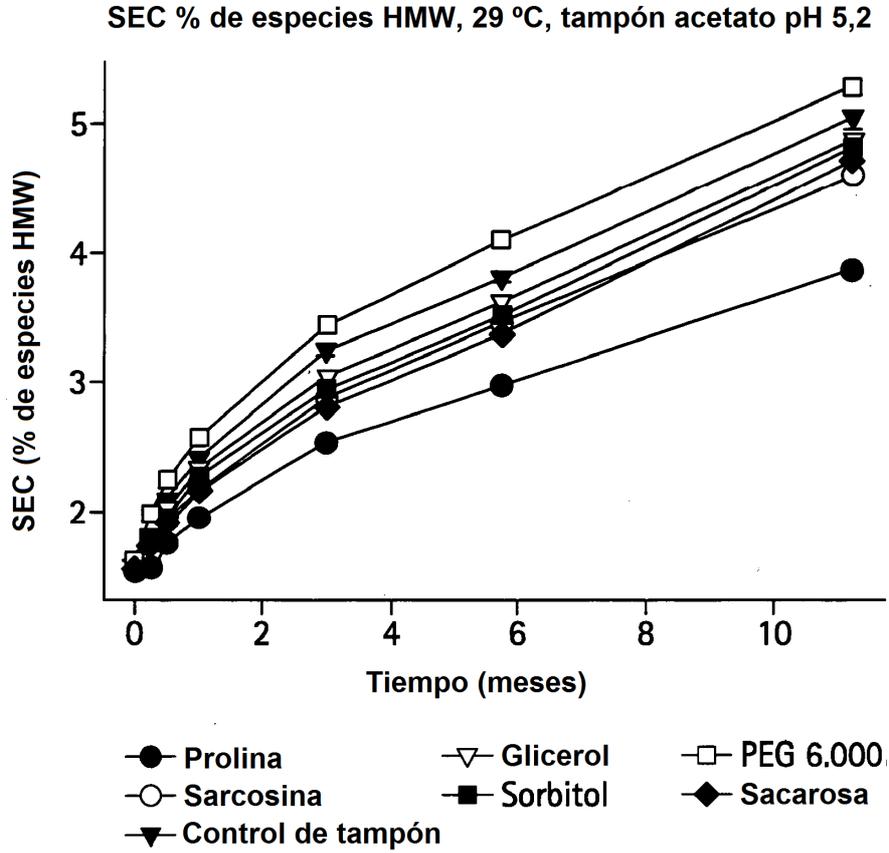


FIG. 8D

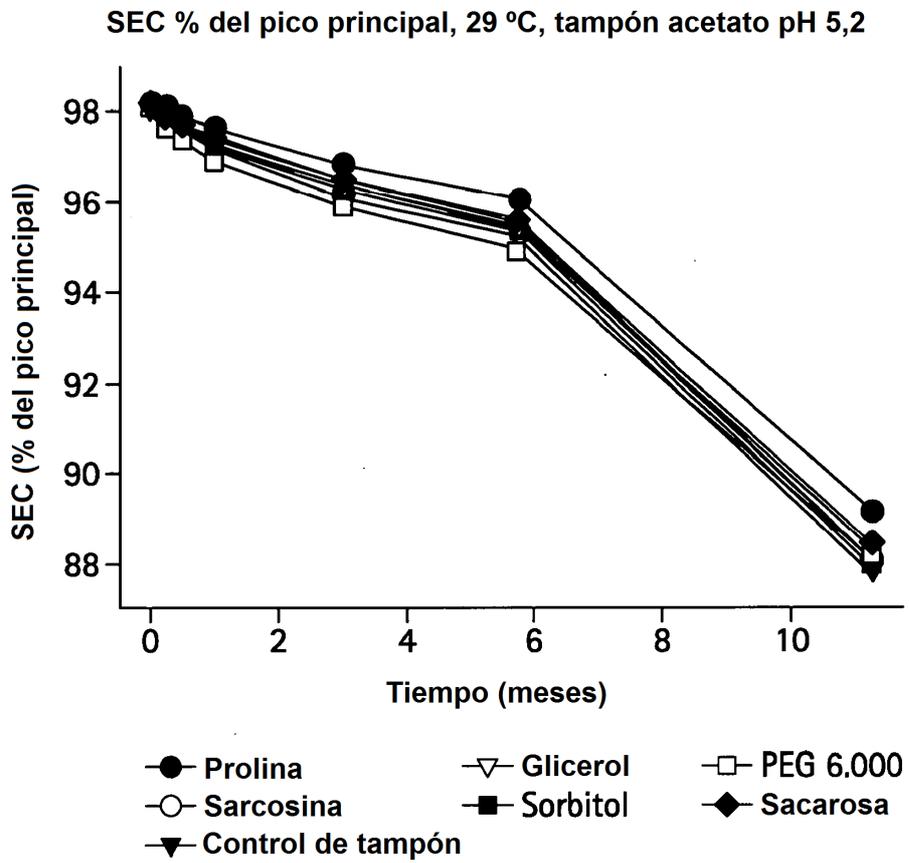


FIG. 8E

SEC % del pico principal, 29 °C, tampón acetato pH 5,2

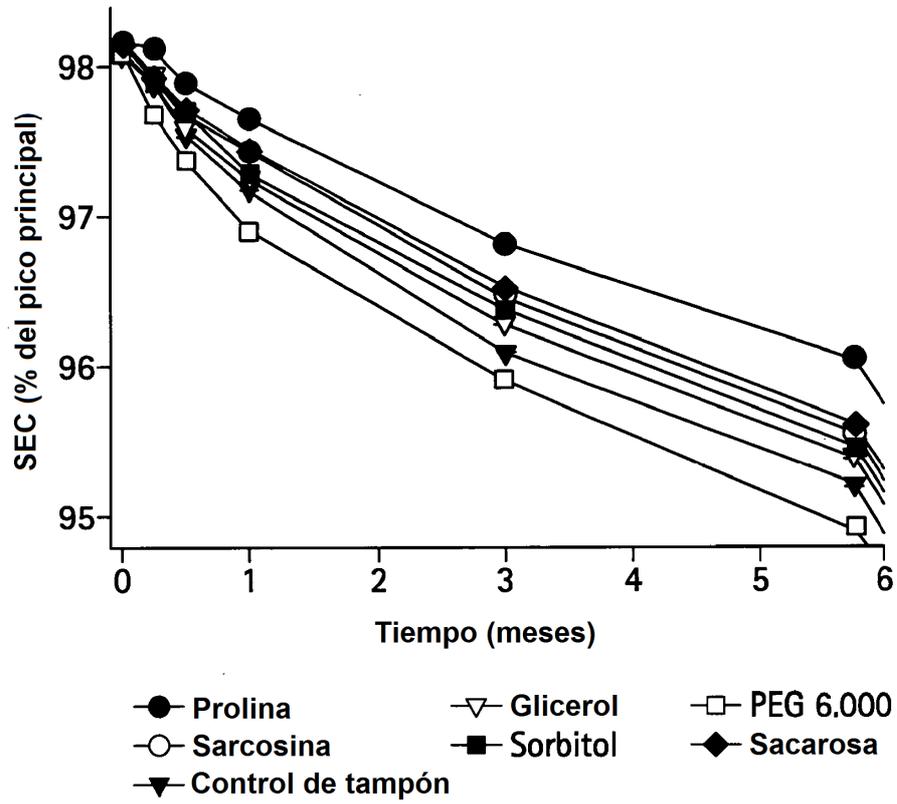


FIG. 8F

SEC % del pico principal, 29 °C, tampón acetato pH 5,2

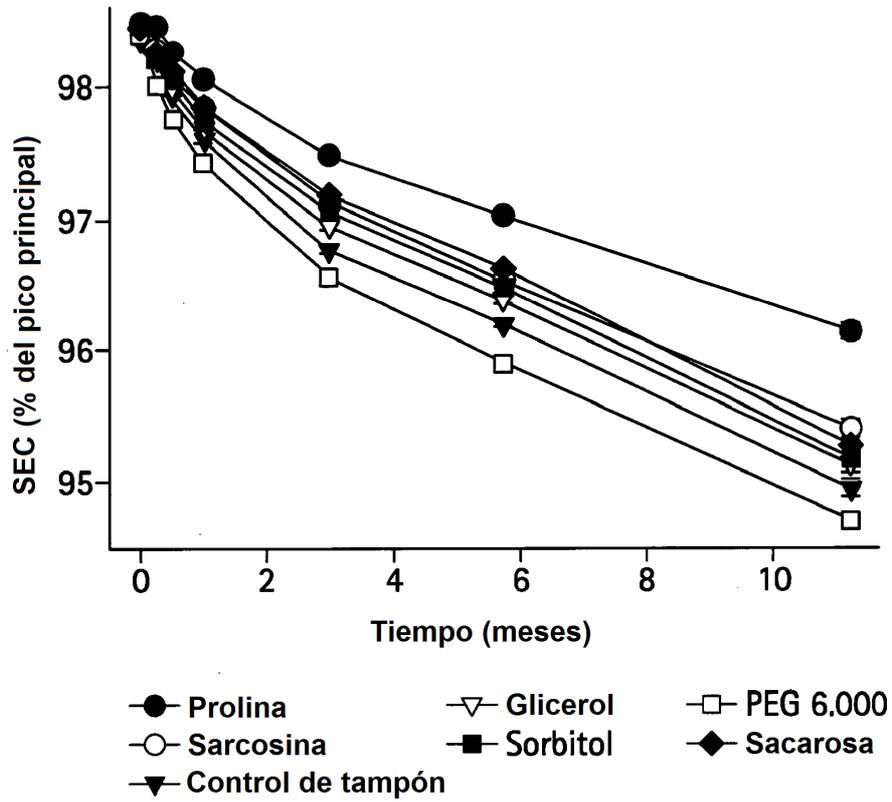


FIG. 8G

SEC % de especies HMW, 37 °C, tampón acetato pH 5,2

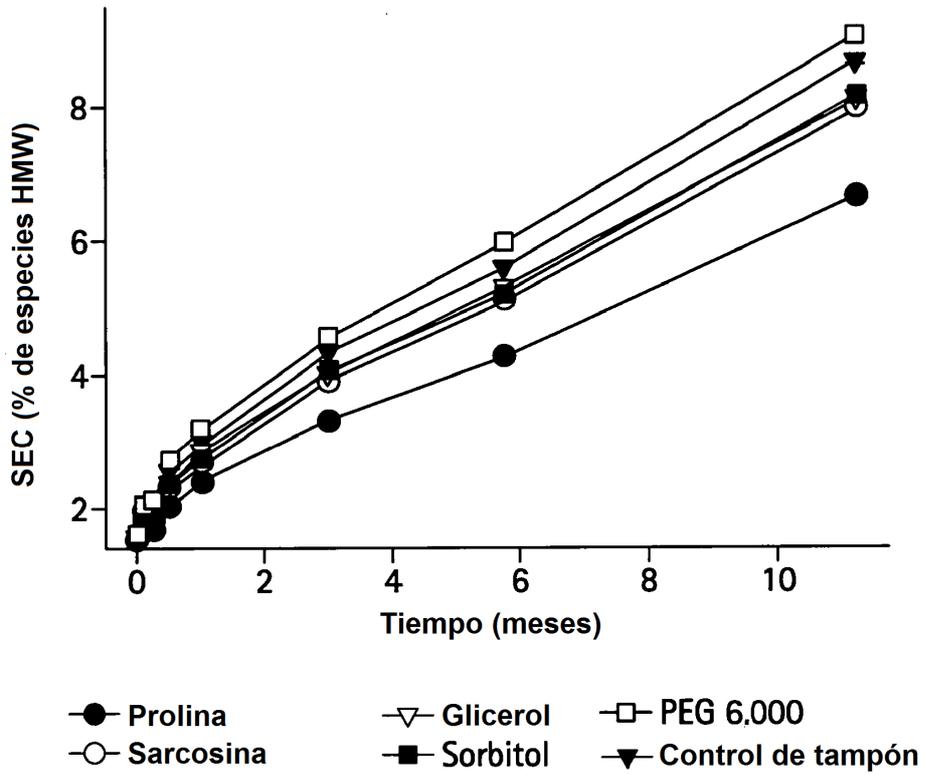


FIG. 9A

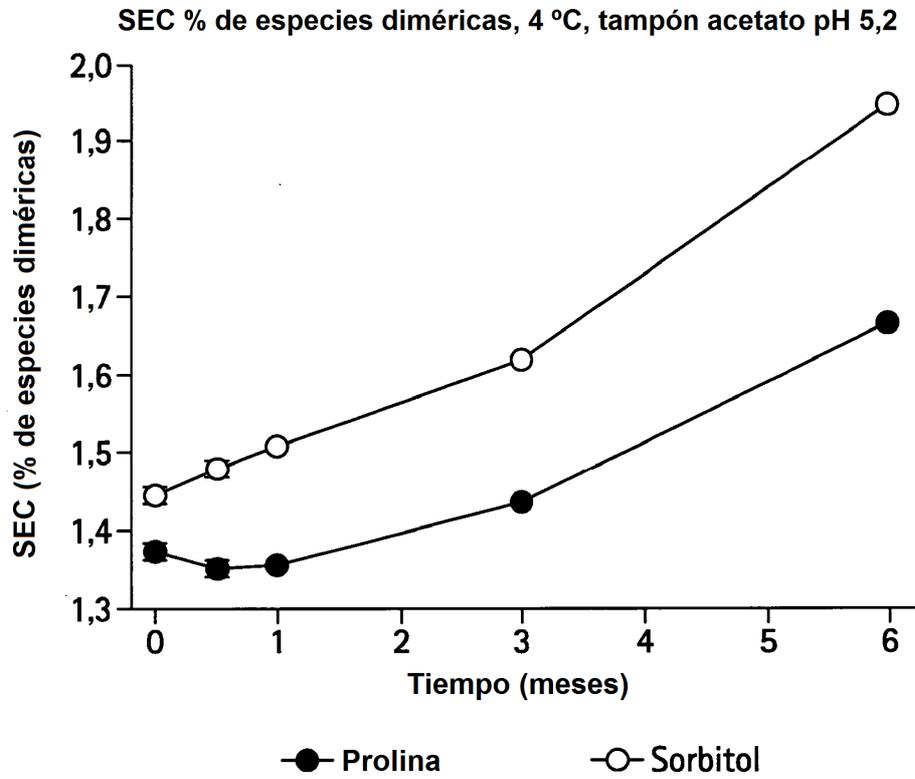


FIG. 9B

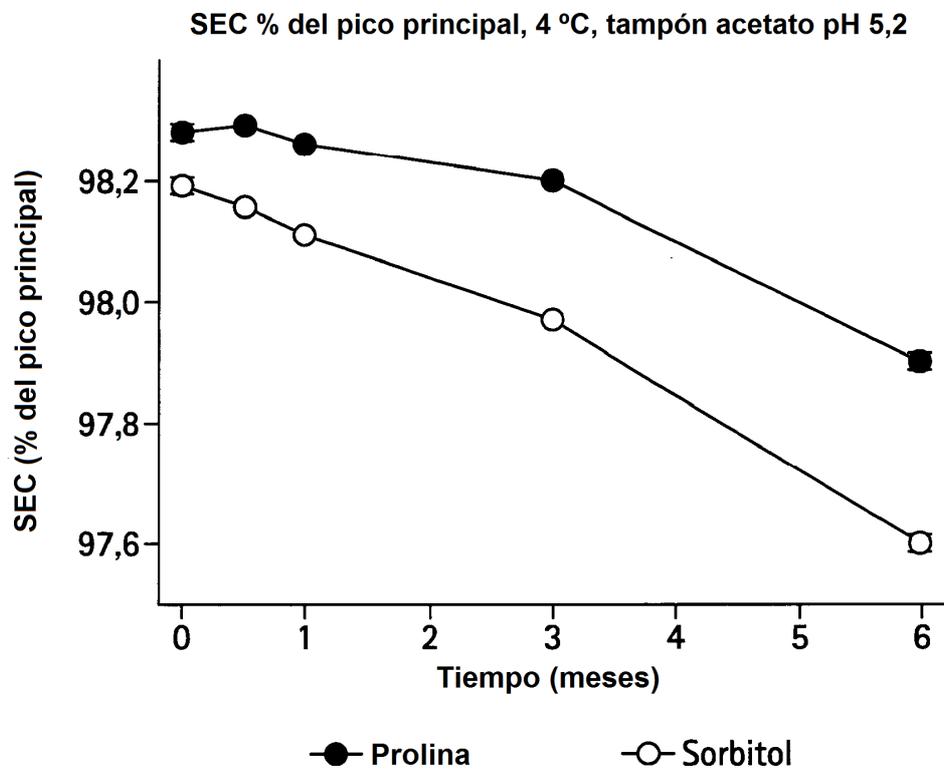


FIG. 9C

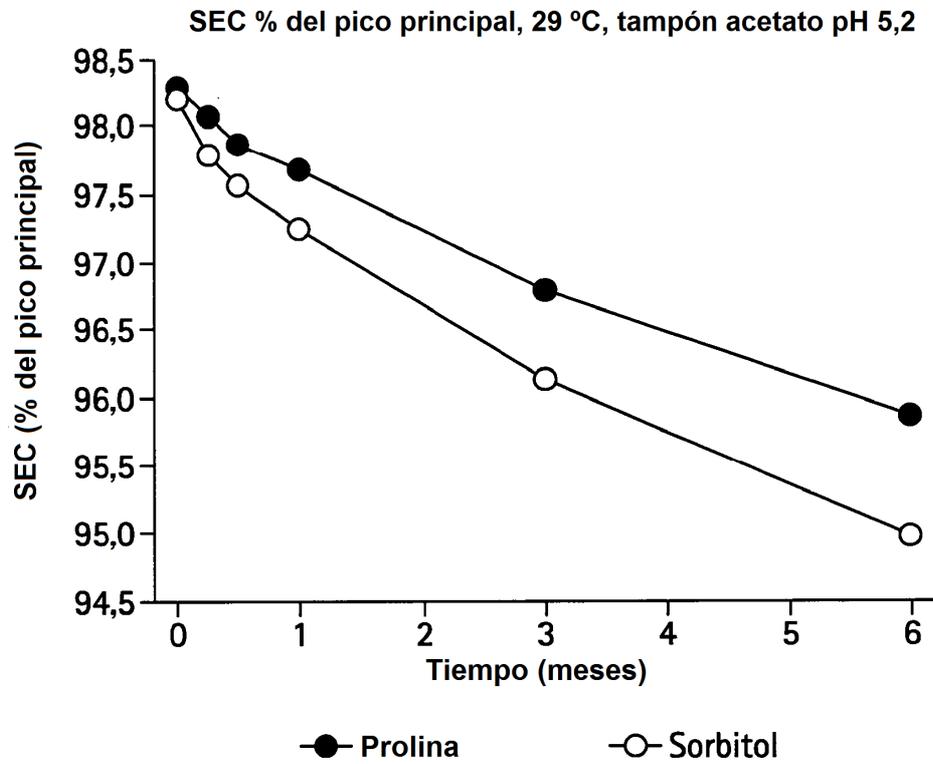


FIG. 9D

