(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 751 659**

(51) Int. CI.:

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

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **11.06.2013 PCT/IB2013/054777**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **19.12.2013 WO13186700**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **11.06.2013 E 13744818 (9)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **24.07.2019 EP 2858671**

(54) Título: **Formulación de anticuerpos**

(30) Prioridad:

12.06.2012 US 201261658472 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.04.2020

(73) Titular/es:

NOVARTIS AG (100.0%)
Lichtstrasse 35
4056 Basel, CH

(72) Inventor/es:

COSENZA, MARTA y
STARK, CHRISTOPH

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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

DESCRIPCIÓN

Formulación de anticuerpos

Campo técnico

La presente invención se refiere a una formulación farmacéutica de un anticuerpo contra BAFFR (receptor de BAFF), un proceso para su preparación y usos de la formulación.

Antecedentes

El par BAFFR:BAFF participa de forma crítica en la maduración de linfocitos B transicionales, para la supervivencia y activación de linfocitos B maduros y para el intercambio de la clase de isotipo como respuesta a antígenos dependientes de linfocitos T. BAFF y su receptor BAFFR también son importantes para la supervivencia y el crecimiento de linfocitos B malignos. Además, normalmente BAFFR no se expresa en prelinfocitos B, pero recientemente se ha demostrado que se expresa en células humanas ALL (siglas en inglés referentes a la leucemia linfoblástica aguda de linaje B) (Parameswaran, 2010, *Cancer Res.* 70(11) 4346-4356). La eliminación de linfocitos B autorreactivos y el bloqueo de la activación/supervivencia inadecuadas mediadas por niveles de BAFF en exceso en pacientes que padecen trastornos inmunitarios o cáncer representan un objetivo terapéutico bien validado. Por lo tanto, un anticuerpo anti-BAFFR, en particular un anticuerpo que pueda poseer citotoxicidad mediada por células dependientes del anticuerpo (ADCC) y capaz de bloquear el ligando de unión a BAFFR, puede ofrecer un agente terapéutico eficaz en enfermedades autoinmunitarias y neoplasias de linfocitos B.

Los anticuerpos contra BAFFR se describen, por ejemplo, en el documento WO 2010/007082 e incluyen anticuerpos que se caracterizan por comprender un dominio V_H con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y un dominio V_L con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. El anticuerpo MOR6654 es un anticuerpo de este tipo (IgG1 kappa). Tiene la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 9 y la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 10. Este anticuerpo se puede expresar a partir de las SEQ ID NO: 14 y 15, preferentemente en una célula hospedadora que carezca de fucosiltransferasa, por ejemplo, en una línea celular de mamífero con un gen FUT8(-/-) inactivo, para proporcionar un anticuerpo anti-BAFFR no fucosilado funcional con ADCC mejorada. Este anticuerpo se denomina en lo sucesivo en la presente MOR6654B. En la técnica se conocen medios alternativos para producir anticuerpos no fucosilados.

Los anticuerpos terapéuticos se formulan normalmente ya sea en forma acuosa lista para la administración parenteral o como liofilizados para su reconstitución con un diluyente adecuado antes de su administración.

La Solicitud Internacional PCT/EP2011/072248 describe liofilizados que pueden ser reconstituidos para obtener una solución con una concentración elevada del anticuerpo como principio activo y un nivel bajo de agregación del anticuerpo para su suministro a un paciente. Las concentraciones elevadas del anticuerpo son útiles ya que reducen el volumen de dosificación, que debe ser suministrado a un paciente. Los volúmenes de dosificación reducidos minimizan el tiempo necesario para suministrar una dosis fija al paciente.

Las composiciones farmacéuticas formuladas para que contengan una concentración elevada del anticuerpo pueden tener, sin embargo, un periodo de validez corto y los anticuerpos formulados pueden perder su actividad biológica como resultado de inestabilidades físicas y químicas durante el almacenamiento. Existe constancia de que, entre ellas, la agregación, desamidación y oxidación son las causas más habituales de la degradación de los anticuerpos. Además, la agregación puede conducir potencialmente a un incremento de la respuesta inmunitaria en los pacientes, lo cual conlleva problemas de seguridad. Por lo tanto, la agregación de los anticuerpos en las composiciones farmacéuticas se debe minimizar o prevenir.

Divulgación de la invención

Por consiguiente, un objetivo de la presente invención consiste en proporcionar composiciones farmacéuticas adicionales y mejoradas que comprendan anticuerpos anti-BAFFR, formuladas de modo que permitan una concentración elevada de los anticuerpos anti-BAFFR con una agregación de los anticuerpos nula o sustancialmente nula.

Otro objetivo de la presente invención consiste en proporcionar una formulación de anticuerpos anti-BAFFR adecuada para la administración subcutánea. La ventaja de la inyección subcutánea es que le permite al médico practicante realizarla en una intervención más bien corta con el paciente. Además, se puede enseñar al paciente para que realice la inyección subcutánea por sí mismo.

Este objetivo se cumple con las composiciones acuosas farmacéuticas de la presente invención. Las composiciones acuosas de la invención comprenden una concentración elevada de anticuerpos anti-BAFFR no fucosilados, pero no

contienen o esencialmente no contienen anticuerpos agregados y, por lo tanto, son particularmente adecuadas para la administración subcutánea.

En una realización, la presente invención se refiere a una composición acuosa de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende un anticuerpo anti-BAFFR no fucosilado.

La invención proporciona además un dispositivo de suministro que comprende la composición acuosa de la invención como se describe en la reivindicación 1.

El dispositivo de suministro se puede proporcionar en forma de una jeringa prerrellenada que comprende la composición acuosa de la invención como se describe en la presente.

La presente invención proporciona además la composición o el sistema de suministro, o la jeringa prerrellenada de la invención como se describe en la presente, para su uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno de acuerdo con las reivindicaciones 4-6.

En particular, la composición farmacéutica o el sistema de suministro, o la jeringa prerrellenada de la invención como se describe en la presente se puede utilizar en el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, neoplasias de linfocitos B tales como linfoma, leucemia o mieloma, artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren o pénfigo vulgar.

La invención se basa, al menos en parte, en las propiedades de anticuerpos formulados tales como MOR6654B, que conservan una estabilidad y unas propiedades bioactivas excepcionales cuando se formulan con una concentración elevada como una composición líquida (acuosa).

Una composición farmacéutica «acuosa», tal como se utiliza en la presente, es una composición adecuada para su uso farmacéutico, donde el portador acuoso es agua destilada. Una composición adecuada para su uso farmacéutico puede ser estéril, homogénea y/o isotónica. Las composiciones farmacéuticas acuosas se pueden preparar ya sea directamente en forma acuosa, por ejemplo, en una jeringa prerrellenada lista para ser utilizada (las «formulaciones líquidas») o como un liofilizado que ha de ser reconstituido poco antes de su uso.

La expresión «composición farmacéutica acuosa», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la formulación líquida o la formulación liofilizada reconstituida. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención son adecuadas para la administración parenteral a un sujeto humano. En una realización específica, las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención son adecuadas para la administración subcutánea.

La expresión «administración parenteral», tal como se utiliza en la presente, significa un modo de administración diferente de la administración enteral y tópica, generalmente por inyección e incluye, sin limitación, la inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, intraorbitaria, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

El uso de anticuerpos como principio activo de fármacos está muy extendido en la actualidad, incluidos los productos HERCEPTIN™ (trastuzumab), RITUXAN™ (rituximab), SYNAGIS™ (palivizumab), etc. Las técnicas para la purificación de anticuerpos terapéuticos hasta calidad farmacéutica son muy conocidas en la técnica.

La composición habitualmente no será pirógena, p. ej., contendrá < 1 UE (unidad de endotoxina, una medida estándar) por dosis y preferentemente < 0.1 UE por dosis. La composición está preferentemente exenta de gluten.

En realizaciones específicas, las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención exhiben niveles bajos o indetectables de degradación o agregación de los anticuerpos, con una pérdida de las actividades biológicas muy pequeña o nula durante la fabricación, preparación, transporte y periodos largos de almacenamiento, siendo la concentración del anticuerpo anti-BAFFR no fucosilado de 150 mg/mL.

En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica acuosa con 150 mg/mL de anticuerpo anti-BAFFR no fucosilado.

Existe constancia en la técnica de que tales composiciones farmacéuticas acuosas de concentración elevada se pueden diluir antes de su inyección, por ejemplo, si se requieren concentraciones del anticuerpo más bajas para intervenciones terapéuticas específicas o cuando se traten pacientes de peso corporal más bajo, incluidos los niños. Las concentraciones adecuadas pueden ser de 25 mg/mL o 10mg/mL. Como alternativa, la formulación original se puede producir con tal concentración más baja.

El término «anticuerpo», tal como se hace referencia a él en la presente, incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión al antígeno (es decir, «porción de unión al antígeno») o cadenas individuales de este. Un «anticuerpo» natural es una glucoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por

enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada en la presente como V_H) y una región constante de la cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres o cuatro dominios, dependiendo del isotipo, C_H1, C_H2, C_H3 y C_H4. Cada cadena ligera comprende una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente como V_L) y una región constante de la cadena ligera. La región constante de la cadena ligera comprende un dominio, C_L. Las regiones V_H y V_L se pueden subdividir además en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones de entramado (FR). Cada V_H y V_L está compuesta por tres CDR y cuatro FR dispuestas desde el extremo amínico hasta el extremo carboxílico en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interacciona con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a factores o tejidos hospedadores, que incluyen varias células del sistema inmunitario (p. ej., células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema del complemento clásico.

La expresión «porción de unión al antígeno» de un anticuerpo (o simplemente «porción del antígeno»), tal como se utiliza en la presente, se refiere a la longitud completa o uno o más fragmentos de un anticuerpo que conservan la capacidad para unirse específicamente a un antígeno (p. ej., una porción de BAFFR). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Los ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro de la expresión «porción de unión al antígeno» de un anticuerpo incluyen un fragmento Fab, un fragmento monovalente constituido por los dominios V_L, V_H, C_L y C_H1; un fragmento $F(ab)_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; un fragmento Fd constituido por los dominios V_H y C_H1; un fragmento Fv constituido por los dominios V_L y V_H de un único brazo de un anticuerpo; un fragmento dAb (Ward *et al*., 1989 *Nature* 341:544-546), que está constituido por un dominio V_H; y una región determinante de la complementariedad (CDR) aislada.

Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, V_L y V_H, estén codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes, a través de un conector sintético que les permite ser preparados como una única cadena proteica en la que las regiones V_L y V_H se aparean para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv monocatenario (scFv); remítase, p. ej., a Bird *et al*., 1988 *Science* 242:423-426; y Huston *et al*., 1988 *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:5879-5883). Se pretende que la expresión «región de unión al antígeno» de un anticuerpo también abarque los anticuerpos monocatenarios de este tipo. Estos fragmentos de anticuerpos se obtienen utilizando técnicas convencionales conocidos por los expertos en la materia y los fragmentos se criban para determinar su utilidad de la misma manera que para los anticuerpos intactos.

Un «anticuerpo aislado», tal como se utiliza en la presente, se refiere a un anticuerpo que está sustancialmente exento de otros anticuerpos con especificidades antigénicas diferentes, p. ej., un anticuerpo aislado que se une específicamente a BAFFR humano está sustancialmente exento de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos diferentes de BAFFR. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a BAFFR puede, sin embargo, presentar reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de BAFFR de otras especies. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente exento de otro material celular y/o productos químicos.

Las expresiones «anticuerpo monoclonal» o «composición de anticuerpo monoclonal», tal como se utilizan en la presente, se refieren a un preparado de moléculas de anticuerpo de composición molecular única. Una composición de anticuerpo monoclonal presenta una única especificidad de unión y afinidad por un epítopo particular.

La expresión «anticuerpo humano», tal como se utiliza en la presente, incluye anticuerpos con regiones variables en las que tanto las regiones de entramado como las CDR derivan de secuencias de origen humano. Además, si el anticuerpo contiene una región constante, la región constante también deriva de tales secuencias humanas, p. ej., secuencias de la línea germinal humana, o versiones mutadas de secuencias de la línea germinal humana o un anticuerpo que contiene secuencias de entramado consenso derivadas del análisis de secuencias de entramado humanas, por ejemplo, tal como se describe en Knappik, *et al.* (2000. *J Mol Biol* 296, 57-86).

Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina, p. ej. CDR, se pueden definir utilizando esquemas de numeración muy conocidos, p. ej., el esquema de numeración de Kabat, el esquema de numeración de Chothia, una combinación de Kabat y Chothia (AbM), etc. (remítase, p. ej., a las Secuencias de proteínas de interés inmunológico, Departamento Estadounidense de Sanidad y Servicios Humanos (1991), eds. Kabat *et al.*; Al Lazikani *et al.* (1997) *J. Mol. Bio.* 273:927 948). A lo largo de esta memoria descriptiva, la región determinante de la complementariedad («CDR») se define de acuerdo con la definición de Kabat con la excepción de CDRH1, que es el tramo de aminoácidos definido por una combinación de las dos definiciones de Kabat y Chothia para esta CDR.

Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos aminoacídicos no codificados por secuencias humanas (p. ej., mutaciones introducidas mediante mutagénesis aleatoria o dirigida *in vitro,* o mediante mutación somática *in vivo*). Sin embargo, no se pretende que la expresión «anticuerpo humano», tal como se utiliza en la presente, incluya anticuerpos en los que se han injertado secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otra especie de mamífero, tal como un ratón, en secuencias de entramado humanas.

La expresión «anticuerpo monoclonal humano» se refiere a anticuerpos que presentan una única especificidad de unión, los cuales presentan regiones variables en las que tanto las regiones de entramado como de CDR derivan de secuencias humanas.

La expresión «anticuerpo humano recombinante», tal como se utiliza en la presente, incluye todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan utilizando medios recombinantes tales como anticuerpos aislados a partir de un animal (p. ej., un ratón) que es transgénico o transcromosómico para genes de inmunoglobulina humana o un hibridoma preparado a partir de estos, anticuerpos aislados a partir de una célula hospedadora transformada para que exprese el anticuerpo humano, p. ej., a partir de un transfectoma, anticuerpos aislados a partir de una colección de anticuerpos humanos combinatoria recombinante, y anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados mediante cualquier otro medio que implique el corte y empalme de la totalidad o una porción de un gen de inmunoglobulina humana, secuencias para otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables en las que las regiones de CDR y entramado derivan de secuencias de inmunoglobulina de la línea germinal humana. En ciertas realizaciones, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se pueden someter a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se utiliza un animal transgénico para las secuencias de Ig humana, mutagénesis somática *in vivo*) y, de este modo, las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, aunque derivan de las secuencias de V_H y V_L de la línea germinal humana y están relacionadas con ellas, puede que no existan de forma natural en el repertorio de la línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

El término «isotipo», tal como se utiliza en la presente, se refiere a la clase de anticuerpo (p. ej., IgM, IgA, IgD, IgE e IgG tal como IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4) que es proporcionada por los genes de la región constante de la cadena pesada.

Las expresiones «un anticuerpo que reconoce a un antígeno» y «un anticuerpo específico para un antígeno» se utilizan indistintamente en la presente con la expresión «un anticuerpo que se une específicamente a un antígeno».

Un anticuerpo que «se une específicamente a un polipéptido BAFFR» o un «anticuerpo anti-BAFFR», tal como se utiliza la presente, se refiere a un anticuerpo que se une a un polipéptido BAFFR humano de SEQ ID NO: 13 con una K_D de 100 nM o inferior, 10 nM o inferior, 1 nM o inferior. Un anticuerpo que «reacciona de forma cruzada con un antígeno distinto de BAFFR» se refiere a un anticuerpo que se une a ese antígeno con una K_D de 0.5 x 10^{-8} M o inferior, 5 x 10^{-9} M o inferior, o 2 x 10^{-9} M o inferior. Se pretende que un anticuerpo que «no reacciona de forma cruzada con un antígeno particular» se refiera a un anticuerpo que se une a ese antígeno con una K_D de 1.5 x 10^{-8} M o superior, o una K_D de 5-10 x 10^{-8} M o 1 x 10^{-7} M o superior. En ciertas realizaciones, tales anticuerpos que no reaccionan de forma cruzada con el antígeno exhiben una unión esencialmente indetectable frente a esas proteínas en ensayos de unión estándar.

La concentración del anticuerpo anti-BAFFR no fucosilado en la composición farmacéutica acuosa de la invención es de 150 mg/mL.

La composición farmacéutica acuosa de la invención comprende 150 mg/mL de anticuerpo anti-BAFFR no fucosilado, tal como se describe en la reivindicación 1, es decir, MOR6654B.

Además, las composiciones farmacéuticas acuosas de acuerdo con la divulgación son estables de modo que, incluso después de un almacenamiento durante 4 semanas a 2-8 °C, menos de un 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.05% o 0.01% del anticuerpo anti-BAFFR no fucosilado total se ha agregado, según se mide mediante SEC-HPLC.

Las composiciones farmacéuticas acuosas de acuerdo con la divulgación son estables de modo que, incluso después de un almacenamiento durante 2 meses a 2-8 °C, menos de un 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.05% o 0.01% del anticuerpo anti-BAFFR no fucosilado total se ha agregado, según se mide mediante SEC-HPLC.

Las composiciones farmacéuticas acuosas pueden incluir, además del anticuerpo anti-BAFFR no fucosilado, componentes adicionales tales como uno o más de los siguientes: (i) un estabilizante; (ii) un agente tamponante; (iii) un surfactante; y (iv) un aminoácido libre. La inclusión de cada uno de tales componentes adicionales puede proporcionar a las composiciones una agregación baja del anticuerpo anti-BAFFR no fucosilado.

Un estabilizante adecuado para su uso con la invención puede actuar, p. ej., como agentes potenciadores de la viscosidad, agentes espesantes, agentes solubilizantes y/o similares. El estabilizante puede ser iónico o no iónico (p. ej., azúcares). Como azúcares se incluyen, sin carácter limitante, monosacáridos, p. ej., fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; disacáridos, p. ej., lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa y similares; polisacáridos, p. ej., rafinosa, melecitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y similares. Por ejemplo, el azúcar puede ser sacarosa, trehalosa, rafinosa, maltosa, sorbitol o manitol. El azúcar puede ser un alditol o un aminoazúcar. La sacarosa es particularmente útil. Como estabilizantes iónicos se incluyen sales tales como NaCl o componentes aminoacídicos tales como arginina-HCl.

Los agentes tamponantes adecuados para su uso con la invención incluyen, sin carácter limitante, sales de ácidos orgánicos tales como sales del ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de tometamina o tampón de fosfato. Además, también se pueden

utilizar componentes aminoacídicos como agente tamponante. Un componente aminoacídico de este tipo incluye, sin carácter limitante, glicina e histidina. Un tampón de histidina es particularmente útil.

Las composiciones farmacéuticas acuosas incluyen un agente tamponante o agente regulador del pH de este tipo para proporcionar un control del pH mejorado. La composición farmacéutica acuosa de la invención tiene un pH de 6.0.

El término «surfactante», tal como se utiliza en la presente, se refiere a sustancias orgánicas que tienen estructuras anfifáticas, es decir, se componen de grupos con tendencias de solubilidad opuestas, normalmente una cadena hidrocarbonada liposoluble y un grupo iónico hidrosoluble. Los surfactantes se pueden clasificar, dependiendo de la carga del resto de superficie activa, en agentes aniónicos, catiónicos y dispersantes para varias composiciones farmacéuticas y preparados de materiales biológicos.

Los surfactantes adecuados incluyen, sin carácter limitante, surfactantes no iónicos, surfactantes iónicos y surfactantes zwitteriónicos. Los surfactantes típicos para su uso con la invención incluyen, sin carácter limitante, ésteres de ácidos grasos y sorbitán (p. ej., monocaprilato de sorbitán, monolaurato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán), trioleato de sorbitán, ésteres de ácidos grasos y glicerina (p. ej., monocaprilato de glicerina, monomiristato de glicerina, monoestearato de glicerina), ésteres de ácidos grasos y poliglicerina (p. ej., monoestearato de decaglicerilo, diestearato de decaglicerilo, monolinoleato de decaglicerilo), ésteres de ácidos grasos y sorbitán polioxietilenados (p. ej., monolaurato de sorbitán polioxietilenado, monooleato de sorbitán polioxietilenado, monoestearato de sorbitán polioxietilenado, monopalmitato de sorbitán polioxietilenado, trioleato de sorbitán polioxietilenado, triestearato de sorbitán polioxietilenado), ésteres de ácidos grasos y sorbitol polioxietilenados (p. ej., tetraestearato de sorbitol polioxietilenado, tetraoleato de sorbitol polioxietilenado), ésteres de ácidos grasos y glicerina polioxietilenados (p. ej., monoestearato de glicerilo polioxietilenado), ésteres de ácidos grasos y polietilenglicol (p. ej., diestearato de polietilenglicol), éteres alquílicos de polioxietileno (p. ej., éter laurílico de polioxietileno), éteres alquílicos de polioxipropileno polioxietilenados (p. ej., polioxipropilenglicol polioxietilenado, éter propílico de polioxipropileno polioxietilenado, éter cetílico de polioxipropileno polioxietilenado), éteres alquilfenílicos de polioxietileno (p. ej., éter nonilfenílico de polioxietileno), aceites de ricino hidrogenados polioxietilenados (p. ej., aceite de ricino polioxietilenado, aceite de ricino hidrogenado polioxietilenado), derivados de cera de abejas polioxietilenados (p. ej., cera de abejas de sorbitol polioxietilenada), derivados de lanolina polioxietilenados (p. ej., lanolina polioxietilenada) y amidas de ácidos grasos polioxietilenadas (p. ej., amida del ácido esteárico polioxietilenada); (alquil C_{10}-C_{18})sulfatos (p. ej., cetilsulfato de sodio, laurilsulfato de sodio, oleilsulfato de sodio), sulfato de éter de alquilo C_{10}-C_{18} polioxietilenado con un promedio de 2 a 4 moles de unidades de óxido de etileno añadidas (p. ej., laurilsulfato sódico polioxietilenado) y sales de ésteres de tipo (alquil C_1-C_{18})sulfosuccinato (p. ej., éster laurilsulfosuccinato de sodio); y surfactantes naturales tales como lecitina, glicerofosfolípido, esfingofosfolípidos (p. ej., esfingomielina), y ésteres de sacarosa de ácidos grasos C_{12}-C_{18}. Una composición puede incluir uno o más de estos surfactantes. Los surfactantes preferidos son ésteres de ácidos grasos y sorbitán polioxietilenados, p. ej., polisorbato 20, 40, 60 u 80. El polisorbato 20 (Tween 20) es particularmente útil.

Los aminoácidos libres adecuados incluyen, sin carácter limitante, arginina, lisina, histidina, ornitina, isoleucina, leucina, alanina, glicina, ácido glutámico o ácido aspártico. Se prefiere la inclusión de un aminoácido básico, es decir, arginina, lisina y/o histidina. Si una composición incluye histidina, entonces esta puede actuar a la vez como agente tamponante y como aminoácido libre, pero cuando se utiliza un tampón de histidina es habitual incluir un aminoácido libre que no sea la histidina, p. ej., incluir lisina y un tampón de histidina. Un aminoácido puede estar presente en su forma D y/o L, pero la forma L es habitual. El aminoácido puede estar presente como cualquier sal adecuada, p. ej., una sal de tipo clorhidrato tal como arginina-HCl.

Otros excipientes contemplados, que se pueden utilizar en las composiciones farmacéuticas acuosas, incluyen, por ejemplo, agentes saborizantes, agentes antimicrobianos, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, lípidos tales como fosfolípidos o ácidos grasos, esteroides tales como colesterol, excipientes proteicos tales como albúmina de suero (albúmina de suero humano), albúmina humana recombinante, gelatina, caseína, contraiones que forman sales tales como sodio y similares. Estos y otros excipientes farmacéuticos conocidos y/o aditivos adecuados para su uso en las formulaciones son conocidos en la técnica, p. ej., tal como se enumeran en *The Handbook of Pharmaceutical Excipients*, 4.ª edición, Rowe *et al.*, Eds., *American Pharmaceuticals Association* (2003); y *Remington: the Science and Practice of Pharmacy*, 21.ª edición, Gennaro, Ed., Lippincott Williams & Wilkins (2005).

Las composiciones farmacéuticas acuosas pueden incluir otros principios activos además del anticuerpo anti-BAFFR no fucosilado. Otros agentes farmacológicos pueden incluir, por ejemplo, compuestos quimioterapéuticos.

Enfermedades y trastornos diana

Las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención que comprenden anticuerpos anti-BAFFR no fucosilados se pueden utilizar para tratar, mejorar o prevenir varias enfermedades o trastornos. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-BAFFR no fucosilados son particularmente útiles para tratar trastornos relacionados con BAFFR tales como trastornos autoinmunitarios, p. ej., lupus eritematoso sistémico, síndrome de Sjögren, pénfigo vulgar, artritis reumatoide, esclerosis múltiple y neoplasias de linfocitos B tales como leucemia linfoblástica aguda (ALL, por sus siglas en inglés) y leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (CLL, por sus siglas en inglés).

«Un trastorno relacionado con BAFFR», tal como se utiliza en la presente, incluye afecciones asociadas con o caracterizadas por niveles anómalos de BLyS y/o enfermedades o afecciones que se pueden tratar suprimiendo o destruyendo linfocitos B. Estas incluyen, sin carácter limitante, afecciones inflamatorias, enfermedades autoinmunitarias, infecciones graves y rechazo de trasplante de tejido u órgano. Estas incluyen además neoplasias de linfocitos B.

Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención que comprenden anticuerpos anti-BAFFR no fucosilados se pueden utilizar para el tratamiento, mejora o prevención de receptores de trasplantes de corazón, pulmón, corazón-pulmón combinados, hígado, riñón, páncreas, piel o córnea, que incluyen rechazo de aloinjerto o rechazo de xenoinjerto, y para la prevención de la enfermedad de injerto frente a hospedador, por ejemplo, tras un trasplante de médula ósea, y arteriosclerosis asociada con trasplante de órganos. Además, las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención son útiles en el trasplante de órganos sólidos y en el rechazo de trasplante crónico y agudo mediado por anticuerpos.

Las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención que comprenden anticuerpos anti-BAFFR no fucosilados son útiles para el tratamiento, prevención o mejora de una enfermedad autoinmunitaria y de afecciones inflamatorias, en particular afecciones inflamatorias con una etiología que incluye un componente autoinmunitario tales como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis proliferativa crónica y artritis deformante) y enfermedades reumáticas, que influyen afecciones inflamatorias y enfermedades reumáticas que implican pérdida ósea, dolor inflamatorio, espondiloartropatías, incluida la espondilitis anquilosante, síndrome de Reiter, artritis reactiva, artritis psoriásica y artritis enteropáticas, hipersensibilidad (que incluye tanto hipersensibilidad de las vías respiratorias como hipersensibilidad dérmica) y alergias. Las enfermedades autoinmunitarias específicas para las que se pueden emplear los anticuerpos de la invención incluyen trastornos hematológicos autoinmunitarios (que incluyen, p. ej., anemia hemolítica, anemia aplásica, anemia pura de glóbulos rojos y trombocitopenia idiopática), hemofilia A adquirida, enfermedad de las crioaglutininas, crioglobulinemia, púrpura trombocitopénica trombótica, síndrome de Sjögren, lupus eritematoso sistémico, trastornos musculares inflamatorios, policondritis, escleroderma, vasculitis tal como crioglobulinemia, vasculitis de vasos grandes tal como arteritis de células gigantes, polimialgia reumática, vasculitis necrotizante, que incluye vasculitis asociada con anticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos, arteritis de Takayasu, poliarteritis nodosa, púrpura de Henoch-Schonlein, y síndrome de Churg-Strauss, neuropatía mediada por IgM, espondartritis seronegativa, síndrome de opsoclono-mioclono, granulomatosis de Wegener, dermatomiositis, vasculitis de autoanticuerpos citoplasmáticos anti-neutrófilos (ANCA, por sus siglas en inglés), hepatitis activa crónica, miastenia grave, psoriasis, síndrome de Steven-Johnson, pénfigo vulgar, pénfigo foliáceo, celiaquía idiopática, enfermedad intestinal inflamatoria autoinmunitaria (que incluye, p. ej., colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn y síndrome de intestino irritable), oftalmopatía endocrina, enfermedad de Grave, sarcoidosis, esclerosis múltiple, neuromielitis óptica, cirrosis biliar primaria, diabetes juvenil (diabetes mellitus de tipo I), uveítis (anterior, intermedia y posterior, así como también panuveítis), queratoconjuntivitis seca y queratoconjuntivitis vernal, fibrosis pulmonar intersticial, artritis psoriásica y glomerulonefritis (con y sin síndrome nefrótico, p. ej., que incluye el síndrome nefrótico idiopático o la nefropatía de cambio mínimo), lupus nefrítico agudo, tumores, enfermedad inflamatoria de piel y córnea, miositis, pérdida de implantes óseos, trastornos metabólicos tales como aterosclerosis, diabetes y dislipidemia.

Las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención también pueden ser útiles en la prevención, mejora o tratamiento de neoplasias de linfocitos B. Los ejemplos de tales enfermedades y afecciones incluyen, sin carácter limitante, linfomas no hodgkinianos de linfocitos B, tales como linfoma linfocítico pequeño, linfoma linfoplasmacitoide, linfoma de células del manto, linfoma folicular, linfoma de tejido linfoide asociado con la mucosa, linfoma difuso de células grandes y linfoma de Burkitt; leucemia linfoblástica aguda (ALL), leucemia linfoblástica de precursores B; leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (CLL) y mieloma múltiple. En el alcance de la invención se engloban otras neoplasias de linfocitos B.

Administración al paciente

Una composición farmacéutica de la invención se puede administrar a un paciente. La administración se realizará habitualmente mediante infusión o a través de una jeringa. Por lo tanto, la invención proporciona un dispositivo de suministro (p. ej., una jeringa) que incluye una composición farmacéutica de la invención (p. ej., jeringa prerrellenada). Los pacientes recibirán una cantidad eficaz del anticuerpo anti-BAFFR no fucosilado como principio activo principal, es decir, una cantidad que sea suficiente para tratar, mejorar o prevenir la enfermedad o trastorno en cuestión. Los efectos terapéuticos también pueden incluir la reducción de los síntomas físicos. La cantidad y la concentración eficaces óptimas del anticuerpo para cualquier sujeto particular dependerán de varios factores, que incluyen la edad, tamaño, estado de salud y/o género del paciente, la naturaleza y el grado de la afección, la actividad del anticuerpo particular, la tasa de su eliminación por parte del cuerpo y también cual(es)quiera agente(s) terapéutico(s) adicional(es) posible(s) administrado(s) en combinación con el anticuerpo La cantidad eficaz suministrada para una situación dada puede ser determinada según el criterio de un médico. A los efectos de la presente invención, una dosis eficaz puede ser de aproximadamente 0.005 mg/kg a aproximadamente 50 mg/kg, o de aproximadamente 0.05 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg. Los agentes farmacéuticos basados en anticuerpos conocidos proporcionan una guía a este respecto, p. ej., HERCEPTIN™ se administra con una dosis de carga inicial de 4 mg/kg de peso corporal y una dosis de mantenimiento semanal de 2 mg/kg de peso corporal; RITUXAN™ se administra semanalmente con una dosis de 375 mg/m^2; SYNAGIS™ se administra por vía intramuscular con una dosis de 15 mg/kg de peso corporal; *etc.*

La invención también proporciona formulaciones de la invención tal como se describen en la presente para su uso en el tratamiento, prevención o mejora de uno o más de los trastornos y enfermedades que se mencionan en las reivindicaciones 4-6.

El mamífero es preferentemente un ser humano pero también puede ser, por ejemplo, un caballo o una vaca o un perro o un gato. Los anticuerpos se seleccionarán idealmente para que se correspondan con la especie diana, p. ej., un anticuerpo humano para la administración a seres humanos, un anticuerpo equino para caballos, un anticuerpo canino para perros, etc. Si no existen anticuerpos del hospedador nativos, entonces se puede lograr la transferencia de la especificidad del anticuerpo de una especie a otra mediante la transferencia de residuos de CDR (y habitualmente, además, uno o más residuos de entramado) de un anticuerpo dador hacia un entramado receptor de la especie hospedadora, p. ej., como en una humanización. En la técnica se conocen anticuerpos equinizados, bovinizados, caninizados y felinizados. El anticuerpo se unirá a BAFFR de la especie diana, pero también puede reaccionar de forma cruzada con BAFFR de otras especies.

La dosificación se puede llevar a cabo mediante un programa de dosis única o un programa de múltiples dosis.

Los ingredientes para formar las composiciones de la invención se pueden suministrar en envases sellados herméticamente.

El anticuerpo anti-BAFFR

La invención se refiere a la formulación del anticuerpo anti-BAFFR no fucosilado MOR6654B.

Un anticuerpo adecuado que puede estar comprendido en las composiciones farmacéuticas es el anticuerpo recombinante humano MOR6654, caracterizado estructuralmente como se describe adicionalmente a continuación. La secuencia de aminoácidos de V_H de tal anticuerpo anti-BAFFR aislado se muestra en la SEQ ID NO: 1. La secuencia de aminoácidos de V_L de tal anticuerpo anti-BAFFR aislado se muestra en la SEQ ID NO: 2. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa de tal anticuerpo anti-BAFFR aislado se muestra en la SEQ ID NO: 9. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa de tal anticuerpo anti-BAFFR aislado se muestra en la SEQ ID NO: 10. Otro ejemplo de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de tales anticuerpos anti-BAFFR aislados son las codificadas por las secuencias de nucleótidos de la SEQ ID NO: 11 y la SEQ ID NO: 12, respectivamente. Otro ejemplo de las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos son los codificados por las secuencias de ADN correspondientes contenidas en el plásmido pBW510 tal como lo depositó Novartis Pharma AG, Forum 1, CH-4002 Basilea, Suiza, en DSMZ, Inhoffenstrasse 7B, 38124 Braunschweig, Alemania el 29 de abril de 2009 con número de acceso DSM22542.

Otros anticuerpos anti-BAFFR que se pueden utilizar para preparar las composiciones farmacéuticas incluyen anticuerpos anti-BAFFR con aminoácidos que han sido mutados mediante la deleción, inserción o sustitución de aminoácidos, aunque no tienen más de 1, 2, 3, 4 o 5 deleciones, inserciones o sustituciones de aminoácidos ya sea en las regiones de cadena pesada o ligera que se han descrito anteriormente. En una realización específica, tales cambios de los aminoácidos aparecen únicamente dentro de las regiones constantes y/o de entramado y las regiones CDR presentan una identidad de un 100% respecto a las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena pesada de SEQ ID NO: 3, 4 y 5 y respecto a las regiones CDR1, CDR2 y CDR3 de la cadena ligera de SEQ ID NO: 6, 7 y 8, respectivamente. En una realización específica más, los cambios que se han realizado son únicamente sustituciones conservativas de aminoácidos fuera de las regiones CDR.

Las sustituciones conservativas de aminoácidos son unas en las que el residuo aminoacídico se reemplaza por un residuo aminoacídico que tiene una cadena lateral similar. En la técnica se han definido las familias de residuos aminoacídicos que tienen cadenas laterales similares. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (p. ej., lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (p. ej., ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares sin carga (p. ej., glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína, triptófano), cadenas laterales no polares (p. ej., alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina), cadenas laterales con ramificaciones beta (p. ej., treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (p. ej., tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina). Por lo tanto, uno o más residuos aminoacídicos fuera de las regiones CDR de un anticuerpo anti-BAFFR se pueden reemplazar por otros residuos aminoacídicos de la misma familia de cadena lateral, y el anticuerpo alterado se puede evaluar para determinar si retiene su función, en particular las mismas propiedades de unión a BAFFR.

Los anticuerpos pueden estar habitualmente glicosilados. Los glicanos enlazados a través de N que se unen al dominio C_H2 de una cadena pesada, por ejemplo, pueden ejercer una influencia sobre la unión a C1q y FcR, y los anticuerpos no glicosilados pueden presentar una afinidad de unión inferior o diferente para estos receptores. La estructura del glicano también puede afectar a la actividad, p. ej., se pueden observar diferencias en la muerte celular mediada por el complemento dependiendo del número de azúcares de tipo galactosa (0, 1 o 2) en el extremo de una cadena biantenaria de glicano. Los glicanos de un anticuerpo preferentemente no conllevan una respuesta inmunogénica humana tras su administración.

Adicionalmente o de forma alternativa, se puede preparar un anticuerpo que tenga un tipo alterado de glicosilación tal como un anticuerpo hipofucosilado o no fucosilado que tenga cantidades reducidas o nulas de residuos de fucosilo o un anticuerpo que tenga cantidades mayores de estructuras de GlcNac entrecruzadas. Se ha demostrado que tales patrones de glicosilación alterados incrementan la capacidad de los anticuerpos de citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpos (ADCC). Tales modificaciones de los carbohidratos se pueden conseguir, por ejemplo, expresando el anticuerpo en una célula hospedadora con una maquinaria de glicosilación alterada. En la técnica se han descrito células con una maquinaria de glicosilación alterada y estas se pueden utilizar como células hospedadoras en las que se expresan los anticuerpos recombinantes de la invención para producir de este modo un anticuerpo con una glicosilación alterada. Por ejemplo, el documento EP 1 176 195 de Hang *et al.* describe una línea celular con un gen *FUT8* funcionalmente alterado, que codifica una fucosil-transferasa, de modo que los anticuerpos expresados en una línea celular de este tipo exhiben hipofucosilación o carecen de residuos de fucosilo. Por consiguiente, en una realización, los anticuerpos anti-BAFFR que se incluyen en las composiciones farmacéuticas se producen mediante expresión recombinante en una línea celular que exhibe un patrón de hipofucosilación o no fucosilación, por ejemplo, una línea celular de mamífero con una expresión deficiente del gen *FUT8* que codifica la fucosil-transferasa. El término MOR6654, tal como se utiliza en la presente, engloba cualquier tipo de patrón de glicosilación. En una realización específica, las composiciones farmacéuticas comprenden un anticuerpo anti-BAFFR constituido por MOR6654, tal como se produce en una línea celular que exhibe un patrón de hipofucosilación o no fucosilación, tal como MOR6654B, el cual exhibe un patrón de no fucosilación (carece de residuos de fucosilo). La Publicación de PCT WO 03/035835 de Presta describe una variante de la línea celular CHO, células Lecl3, con una capacidad reducida para unir la fucosa a carbohidratos enlazados mediante Asn(297), lo cual asimismo da como resultado la hipofucosilación de los anticuerpos expresados en esa célula hospedadora (remítase también a Shields, R.L. *et al.*, 2002 *J. Biol. Chem.* 277:26733-26740). La Publicación de PCT WO 99/54342 de Umana *et al.* describe líneas celulares modificadas para que expresen glicosil-transferasas modificadoras de glicoproteínas (p. ej., beta(1,4)-*N*-acetilglucosaminiltransferasa III (GnTIII)) de modo que los anticuerpos expresados en las líneas celulares modificadas exhiben un incremento de estructuras GlcNac entrecruzadas, lo cual da como resultado una mayor actividad de ADCC de los anticuerpos (remítase también a Umana *et al.*, 1999 *Nat. Biotech.* 17:176-180). Eureka Therapeutics describe además células de mamífero CHO modificadas genéticamente capaces de producir anticuerpos con un patrón de glicosilación en mamíferos alterado que carece de residuos de fucosilo (http://www.eurekainc.com/about_us/ companyoverview.html). Como alternativa, los anticuerpos anti-BAFFR se pueden producir en levaduras u hongos filamentosos modificados para que tengan un patrón de glicosilación como el de los mamíferos y capaces de producir anticuerpos que carecen de fucosa como patrón de glicosilación (remítase, por ejemplo, al documento EP1297172B1).

Otra modificación de los anticuerpos anti-BAFFR de la presente contemplada por la invención es la pegilación. Un anticuerpo se puede pegilar para, por ejemplo, incrementar la semivida biológica (p. ej., en suero) del anticuerpo. Para pegilar un anticuerpo, el anticuerpo, o fragmento de este, se puede hacer reaccionar normalmente con polietilenglicol (PEG), tal como un éster reactivo o un derivado de tipo aldehído del PEG, en condiciones en las que uno o más grupos PEG se unan al anticuerpo o fragmento de anticuerpo. La pegilación se puede llevar a cabo mediante una reacción de acilación o una reacción de alquilación con una molécula reactiva de PEG (o un polímero hidrosoluble reactivo análogo).

Se pretende que el término «polietilenglicol», tal como se utiliza en la presente, englobe cualquiera de las formas de PEG que se han utilizado para derivatizar otras proteínas, tal como monoalcoxi- o ariloxi(C1-C10)polietilenglicol o polietilenglicol-maleimida. En ciertas realizaciones, el anticuerpo que se ha de pegilar es un anticuerpo aglicosilado. Los métodos para pegilar proteínas son conocidos en la técnica y se pueden aplicar a los anticuerpos de la invención. Remítase, por ejemplo, al documento EP 0 154 316 de Nishimura *et al.* y al documento EP 0 401 384 de Ishikawa *et al.*

Los anticuerpos se pueden preparar en una forma exenta de productos con los que se asociarían de forma natural. Los componentes contaminantes del entorno natural de un anticuerpo incluyen materiales tales como enzimas, hormonas u otras proteínas de las células hospedadoras.

Ejemplos

Preparación de anticuerpos anti-BAFFR

El anticuerpo MOR6654 se une específicamente a BAFFR y también se describe en una solicitud internacional publicada como WO2010/007082. Es un anticuerpo humano de tipo IgG1 kappa que se obtiene mediante presentación de fagos. Sus cadenas pesada y ligera están constituidas por las SEQ ID NO: 9 y 10. Las Tablas 1 y 2 siguientes resumen las características de las secuencias de MOR6654.

Tabla 1: Breve descripción de las secuencias enumeradas en la lista de secuencias de la Tabla 2

SEQ ID NO:	Descripción de la secuencia
1	Secuencia de aminoácidos de la región variable (V_H) de la cadena pesada de MOR6654

2	Secuencia de aminoácidos de la región variable (V_L) de la cadena ligera de MOR6654
3	Secuencia de aminoácidos de HCDR1 de MOR6654
4	Secuencia de aminoácidos de HCDR2 de MOR6654
5	Secuencia de aminoácidos de HCDR3 de MOR6654
6	Secuencia de aminoácidos de LCDR1 de MOR6654
7	Secuencia de aminoácidos de LCDR2 de MOR6654
8	Secuencia de aminoácidos de LCDR3 de MOR6654
9	Secuencia de aminoácidos de la cadena pesada de longitud completa de MOR6654
10	Secuencia de aminoácidos de la cadena ligera de longitud completa de MOR6654
11	Secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO:1
12	Secuencia de nucleótidos que codifica la SEQ ID NO:2
13	Secuencia de aminoácidos de BAFFR humano
14	Secuencia de nucleótidos de longitud completa (que incluye la secuencia líder y la parte constante) de la cadena pesada de MOR6654; nt 1-57 = líder; nt 58-429 = VH; nt 430-1419 = región constante (hIgG1)
15	Secuencia de nucleótidos de longitud completa (que incluye la secuencia líder y la parte constante) de la cadena ligera de MOR6654; nt 1-60 = líder; nt 61-384 = VL; nt 385-705 = región constante (hkappa)

Tabla 2: Lista de secuencias

SEQ ID NO:	Secuencia de aminoácidos o nucleótidos
1	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAIS**GDSVSSNSAAWG**WIRQSPGRGLEWLG **RIYYRSKWYNSYAVSVKS**RITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAR**YD WVPKIGVFDS**WGQGTLVTVSS
2	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQFISSSYLS**WYQQKPGQAPRLLIY**GSS SRAT**GVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYC**QQLYSSPMT**FGQGTKV EIK
3	GDSVSSNSAAWG
4	RIYYRSKWYNSYAVSVKS
5	YDWVPKIGVFDS
6	RASQFISSSYLS
7	GSSSRAT
8	QQLYSSPMT

9	QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWGWIRQSPGRGLEWLG RIYYRSKWYNSYAVSVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCARYDW VPKIGVFDSWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
10	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQFISSSYLSWYQQKPGQAPRLLIYGSS SRATGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQLYSSPMTFGQGTKV EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC
11	CAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCAGGCCTGGTCAAGCCCTCTCAGA CCCTGTCACTGACCTGCGCCATTTCAGGCGACAGCGTGAGCAGCAACAG CGCCGCCTGGGGCTGGATCAGGCAGAGCCCCGGTAGGGGCCTGGAATG GCTGGGCAGGATCTACTACAGGTCCAAGTGGTACAACAGCTACGCCGTG AGCGTGAAGAGCAGGATCACCATCAACCCTGACACCAGCAAGAACCAGTT CTCACTGCAGCTCAACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCCGTGTACTAC TGCGCCAGATACGACTGGGTGCCCAAGATCGGCGTGTTCGACAGCTGGG GCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCAAGC
12	GATATCGTGCTGACACAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCTGAGCCCAGGCG AGAGGGCCACCCTGTCCTGCAGGGCCAGCCAGTTTATCAGCAGCAGCTA CCTGTCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCTAGACTGCTGATC TACGGCAGCTCCTCTCGGGCCACCGGCGTGCCCGCCAGGTTCAGCGGC AGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGCCTGGAGCCCG AGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGCTGTACAGCTCACCCATGACC TTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAG
13	MRRGPRSLRGRDAPAPTPCVPAECFDLLVRHCVACGLLRTPRPKPAGASSP APRTALQPQESVGAGAGEAALPLPGLLFGAPALLGLALVLALVLVGLVSWRR RQRRLRGASSAEAPDGDKDAPEPLDKVIILSPGISDATAPAWPPPGEDPGTT PPGHSVPVPATELGSTELVTTKTAGPEQQ

14	ATGGCCTGGGTGTGGACCCTGCCCTTCCTGATGGCCGCTGCCCAGTCAG TGCAGGCCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGCCCAGGCCTGGTCAAGC CCTCTCAGACCCTGTCACTGACCTGCGCCATTTCAGGCGACAGCGTGAG CAGCAACAGCGCCGCCTGGGGCTGGATCAGGCAGAGCCCCGGTAGGGG CCTGGAATGGCTGGGCAGGATCTACTACAGGTCCAAGTGGTACAACAGCT ACGCCGTGAGCGTGAAGAGCAGGATCACCATCAACCCTGACACCAGCAA GAACCAGTTCTCACTGCAGCTCAACAGCGTGACCCCCGAGGACACCGCC GTGTACTACTGCGCCAGATACGACTGGGTGCCCAAGATCGGCGTGTTCG ACAGCTGGGGCCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCAAGCGCCAGCACCAA GGGCCCCAGCGTGTTCCCCCTGGCCCCCAGCAGCAAGAGCACCAGCGG CGGCACAGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCC GTGACCGTGTCCTGGAACAGCGGAGCCCTGACCTCCGGCGTGCACACCT TCCCCGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGTCCAGCGTGGT GACAGTGCCCAGCAGCAGCCTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTG AACCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTGGAGCCCAAGA GCTGCGACAAGACCCACACCTGCCCCCCCTGCCCAGCCCCAGAGCTGCT GGGCGGACCCTCCGTGTTCCTGTTCCCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTG ATGATCAGCAGGACCCCCGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCC ACGAGGACCCAGAGGTGAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGT GCACAACGCCAAGACCAAGCCCAGAGAGGAGCAGTACAACAGCACCTAC AGGGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCA AGGAATACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAGGCCCTGCCAGCCCCCATCGA AAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGGGAGCCCCAGGTGTAC ACCCTGCCCCCCTCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGTCCCTGA CCTGTCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAACGGCCAGCCCGAGAACAACTACAAGACCACCCCCCCAGTGCTG GACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCAAGCTGACCGTGGACAAGT CCAGGTGGCAGCAGGGCAACGTGTTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGC CCTGCACAACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGTCCCCCGGCAAG
15	ATGAGCGTGCTGACCCAGGTGCTGGCTCTGCTGCTGCTGTGGCTGACCG GCACCAGATGCGATATCGTGCTGACACAGAGCCCCGCCACCCTGAGCCT GAGCCCAGGCGAGAGGGCCACCCTGTCCTGCAGGGCCAGCCAGTTTATC AGCAGCAGCTACCTGTCCTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCCAGGCCCCTA GACTGCTGATCTACGGCAGCTCCTCTCGGGCCACCGGCGTGCCCGCCAG GTTCAGCGGCAGCGGCTCCGGCACCGACTTCACCCTGACAATCAGCAGC CTGGAGCCCGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGCAGCTGTACAGCT CACCCATGACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGTACGGT GGCCGCTCCCAGCGTGTTCATCTTCCCCCCCAGCGACGAGCAGCTGAAG AGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACCCCCGGG AGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACA GCCAGGAGAGCGTCACCGAGCAGGACAGCAAGGACTCCACCTACAGCCT GAGCAGCACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCATAAGGTG TACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGTCCAGCCCCGTGACCAAGA GCTTCAACAGGGGCGAGTGC

Ejemplos de formulaciones

Se deseaba obtener una formulación líquida de concentración elevada de MOR6654B y por lo tanto se realizaron estudios de formulación. Una formulación líquida que comprendía un azúcar, un agente tamponante y un surfactante fue estable y pudo mantener concentraciones elevadas del anticuerpo.

El anticuerpo se puede producir en células hospedadoras de mamífero tales como una línea celular CHO transfectada con vectores de expresión portadores de las secuencias codificantes de la cadena ligera y pesada con promotores de expresión adecuados.

El anticuerpo se produce preferentemente en una línea celular de mamífero, p. ej., una línea celular CHO, modificada utilizando, por ejemplo, la tecnología Potelligent™ (BioWa, Inc.) que conduce a un expresión deficiente del gen *FUT8* que codifica la fucosil-transferasa. El anticuerpo resultante no está fucosilado y se denomina en la presente MOR6654B.

El desarrollo de una formulación líquida de MOR6654B en un vial o una jeringa prerrellenada constó de dos estudios. Se llevó a cabo un primer cribado para definir los excipientes en la formulación. En un segundo cribado, la formulación seleccionada se confirmó en el envase primario final.

Estabilidad y plan analítico

Se llevaron a cabo los siguientes métodos analíticos: ensayo de UV, HPLC de tipo cromatografía de exclusión por tamaños, dispersión dinámica de la luz, HPLC de tipo cromatografía de intercambio catiónico, HPLC de tipo cromatografía de fase inversa, analizador de ALP, turbidez, valor de pH, osmolalidad, MFI (siglas en inglés referentes a la tomografía de microflujo), viscosidad, color, inspección visual.

Determinación de la estabilidad

La estabilidad se determinó adicionalmente tras someter las formulaciones a ciertas condiciones de estrés, que incluyeron agitación, ciclos de congelación-descongelación y exposición prolongada a la luz (1 mes a 40 °C).

Método turbidimétrico

La turbidez se midió utilizando un método turbidimétrico.

Las mediciones de las muestras con el turbidímetro se realizaron siguiendo el manual de operación (manual del instrumento modelo 2100AN, número: 47901-88, noviembre de 2006, edición 2). Al inicio del análisis, la curva de calibración para el instrumento se comprobó analizando 5 muestras de calibración, que incluyeron agua. Si los valores medidos por el instrumento se encontraban dentro de un 5% de los valores de los patrones, entonces la curva de calibración pasó. Si cualquiera de los patrones no cumplió el criterio de aceptación de un 5%, entonces el instrumento se recalibró siguiendo el manual de operación. Después de que el instrumento pasara la calibración, las muestras se introdujeron en tubos de ensayo de fondo plano de 11 mm y se analizaron.

Método de cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)

En el método de SEC utilizado para analizar las formulaciones líquidas, se utilizaron los siguientes parámetros del método:

Columna: TSKgel G3000SWXL
Tampón de análisis: fosfato de K 150 mM, pH de 6.5 +/- 0.1
Tasa de flujo: 0.4 mL/min
Temperatura de la columna: 30 °C
Detección: 210 nm
Volumen de inyección: 10 uL
Temperatura de la muestra: aprox. 5 °C
Tiempo de ejecución: 40 minutos
Velocidad del muestreo de datos: 1.0 punto/segundo (paso de Chromeleon = 1.0)

Método de HPLC de tipo cromatografía de intercambio catiónico (CEX)

El primer paso para el análisis de las muestras utilizando el método de HPLC de tipo CEX consistió en diluir todas las formulaciones hasta 10 mg/mL utilizando agua. El segundo paso consistió en tomar la muestra diluida de 10 mg/mL y diluirla de nuevo con la fase móvil A hasta 3 mg/mL. A continuación, la muestra se introdujo en el HPLC y se analizó.

Fase móvil A: fosfato de potasio 25 mM, pH de 6.5
Fase móvil B: fosfato de sodio 25 mM, NaCl 250 mM, pH de 6.5
Tasa de flujo: 1.0 mL/min
Temperatura de la columna: 30 °C +/- 2 °C
Temperatura de la muestra: 5 °C +/- 2 °C
Volumen de inyección: 40 uL
Tiempo de ejecución (min): 60
Detección: 215 nm
Gradiente:

Tiempo	% de A	% de B
0	100	0
46	0	100

51	0	10
52	100	0
60	100	0

Método de HPLC de tipo RP

El método de HPLC de tipo RP utilizado para analizar las muestras de LB-120 se llevó a cabo siguiendo los parámetros del método de RP siguientes. El gradiente en el protocolo de prueba dio como resultado la elución de la proteína en el volumen inválido de la columna.

Parámetros del método

Información sobre la columna: PoroShell 300SB-C8
Fase móvil A: 90% (v/v) de H_2O / 10% (v/v) de ACN / 0.1% (v/v) de TFA
Fase móvil B: 10% (v/v) de H_2O / 90% (v/v) de ACN / 0.1% (v/v) de TFA
Velocidad de flujo: 2 mL/min
Temperatura de la columna: 80 °C
Detección: 210 nm
Volumen de inyección: 5 µL
Temperatura de la muestra: aprox. 5 °C
Tiempo de ejecución: 6 minutos
Gradiente:

Tiempo	**% de A**	**% de B**
0	90	10
5	75	25
5.1	90	10
6	90	10

Método de MFI

Todas las muestras de estabilidad se evaluaron utilizando un instrumento de tomografía de microflujo (MFI) simple para proteínas, modelo DPA 4200 con una celda de flujo de 100 µm estándar (1.6 mm, SP3 con recubrimiento de silano, n.º de cat. 4002-002-001) y un objetivo de 5x. La versión del software para el *MFI View System Software* fue 2-R2.6.2.21.2171.

La puesta a punto del instrumento y las características seleccionadas incluyeron:

Rechazo de partículas periféricas - seleccionado
Partículas de relleno - seleccionado (excepto para T0)
Volumen de la muestra: 0.5 mL
Volumen de purga: 0.15 mL
Aproximación del volumen de la muestra: 0.30 mL (autocalculado)

El día de la evaluación, se agruparon tres (evaluación individual) o cuatro (evaluación por duplicado) jeringas por cada condición en tubos Nunc de 15 mL individuales (n.º de catálogo 339651). Todo el trabajo se llevó a cabo en una campana de flujo laminar y las muestras de MFI se evaluaron sin dilución.

Las secuencias de ejecución consistieron en blancos de agua corriente antes de cada muestra y un patrón para garantizar que los niveles de referencia de las partículas eran razonables (habitualmente por debajo de 600 partículas/mL o inferiores a un 1% de las partículas de la muestra/mL). Se emplearon lavados de agua de 30 mL o más entre diferentes muestras y entre muestras y patrones antes de medir los niveles de las partículas de referencia (blancos). Si los blancos no eran aceptables, se realizaron lavados adicionales y se analizó otro blanco. Se utilizaron lavados de agua de 10 mL entre muestras por replicado y patrones por replicado para eliminar de forma adecuada las burbujas de aire del sistema y reducir las partículas. Se utilizó agua Millipore Direct-Q de tipo 1 para los blancos y los lavados (filtrada a través de 0.22 µm, calidad de 18.2 MΩ). Se utilizaron puntas de barrera Neptune de 1000 µL para suministrar la muestra al orificio de entrada de la muestra.

Cada secuencia de muestra contenía una serie de patrones de partículas de 5.0 µm certificados por el NIST (siglas en inglés referentes al Instituto Nacional de Estándares y Tecnología) que contenían 3000 partículas/mL de tamaño superior

o igual a 3 µm (n.º de cat. CC05, Lote 39588, Exp. julio de 2012) para determinar la reproducibilidad durante la ejecución. El comportamiento de los patrones se enumera en la Tabla 3.

Tabla 3. Resumen del análisis de los patrones de partículas de NIST utilizando MFI

Punto de evaluación	Promedio del blanco	Promedio del patrón	Desviaciones de 3 patrones	N.º de patrones	Lote n.º
T0	207	3105	± 16%	4	39588, botella 2
T1	304	2222	± 6%	4	39588, botella 2
T2	337	3109	± 16%	7	39588, 042512

El tamaño individual de las partículas se determinó utilizando una técnica de medición simple para proteínas conocida como diámetro circular equivalente (ECD, por sus siglas en inglés). El ECD de un objeto se expresa en micras y representa el diámetro de una esfera que ocupa la misma área superficial bidimensional que la partícula. La plataforma del producto de MFI convierte el área de un objeto en un valor de ECD utilizando técnicas de conversión propias para evitar el error inherente que se produce cuando se realizan cálculos directos basados en el campo de dimensiones en perspectiva. Las técnicas de conversión se basan en un mapeo de todo el rango de tamaños del instrumento utilizando microesferas de poliestireno trazables de NIST. Aunque la conversión se basa en microesferas de poliestireno, la reivindicación del proveedor es que la operación única de la plataforma del producto de MFI garantizará que los resultados obtenidos a partir del instrumento son insensibles a las propiedades del material de las partículas. Por consiguiente, el instrumento no requiere calibración respecto a los tipos específicos de muestras para una operación adecuada.

Método colorimétrico

El color de la muestra se analizó utilizando un procedimiento de evaluación estándar. El valor del color para cada muestra está registrado en la definición del color de la Farmacopea europea (EP, por sus siglas en inglés) (Tabla 4). A modo de ejemplo, B1-B9 es la escala de color marrón tal como se define en la Farmacopea europea.

Tabla 4. Intervalo de color para la Farmacopea europea

Desde	Hasta	Descripción
Y7	Y1	Escala de color amarillo
B9	B1	Escala de color marrón
BY7	BY1	Escala de color marrón-amarillo
GY7	GY1	Escala de color verde-amarillo
R7	R1	Escala de color rojo

Evaluación de la fotoestabilidad

Se sometieron jeringas que contenían cada una de las cuatro formulaciones F1-F4 tal como se describe en la Tabla 16 a una evaluación de la fotoestabilidad. En resumen, se colocaron doce jeringas (tres de cada por formulación) sobre la superficie de una caja cubierta con 3.5 pulgadas de papel de impresión blanco que se colocó debajo de la fuente de la lámpara. Las jeringas se colocaron en orden numérico como se indica continuación (1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4) separadas por aproximadamente 1 pulgada. Las jeringas finales (1 y 4) estaban situadas cada una de ellas a una distancia de 5 pulgadas de los extremos de la lámpara.

Las fuentes de luz fueron dos lámparas de fluorescencia de color blanco frío (GE Ecolux F20T12-CW-ECO, de 20 W cada una) y dos lámparas fluorescentes casi UV con distribuciones espectrales de 320 a 400 nm, de 20 W cada una. El tiempo de exposición a temperatura ambiente fue de 14 días para las lámparas fluorescentes de color blanco frío y de 88 horas para las lámparas casi UV.

Estudios de agitación

Tres jeringas para cada una de las diferentes formulaciones que se debían evaluar se sacaron de las condiciones de refrigeración y se agruparon en tubos cónicos Nunc de 15 mL, y se inmovilizaron individualmente en la plataforma de un agitador orbital Thermo Scientific MaxQ 2000 y se agitaron a 150 rpm durante 24 horas en condiciones de temperatura y luz ambientales.

Estudios de ciclos de congelación-descongelación (F/T)

Las jeringas para cada una de las diferentes formulaciones que se debían evaluar se sacaron de las condiciones de refrigeración y se agruparon en tubos cónicos Nunc de 15 mL. A continuación, las muestras agrupadas se sometieron a 5 ciclos de congelación (-20 °C) y descongelación (utilizando agua a temperatura ambiente).

ESTUDIO I: Primer cribado de las formulaciones líquidas

Se preparó un cribado inicial de las formulaciones para una formulación líquida de MOR6654B, evaluando, p. ej., diferentes tampones, estabilizantes, excipientes y valores de pH. También se investigaron algunas formulaciones con el fin de obtener experiencia para la selección del envase primario y con el fin de obtener experiencia sobre la estabilidad de la formulación líquida de MOR6654B en diferentes tipos de PFS (siglas en inglés referentes a las jeringas prerrellenadas).

Preparación de las muestras

Las formulaciones se produjeron utilizando una sustancia farmacológica (MOR6654B) obtenida a partir de una línea celular CHO que expresaba el anticuerpo monoclonal afucosilado, del cual se aumentó su concentración hasta 160 g/L en agua. La sustancia farmacológica MOR6654B se mezcló con una cantidad adecuada de solución de dilución de excipientes, se filtró de forma estéril y se introdujo de forma aséptica en una PFS estéril de 1mL (volumen de rellenado de 0.7 mL) o viales de vidrio de 6 mL (volumen de rellenado de 3.6 mL) y se tapó con tapones Daikyo D21-7S V10-F7-3WRS RB2-TR lyo. Todas las formulaciones evaluadas tenían una concentración de 100 g/L de MOR6654B.

Tabla 5: Lista de formulaciones, primer cribado de formulaciones líquidas de MOR6654B (100 g/L)
EP (envase primario); HPbCD (hidroxiproil-b-ciclodextrina)

Form	pH	tampón 20 mM	estabilizante	surfactante	EP
1	6.5	Histidina	Trehalosa 270 mM	Polisorbato 20 0.04%	PFS
2	6.5	Citrato	ArgHCl 150 mM	Poloxámero 188 0.3%	PFS
3	6.5	Histidina	Trehalosa 270 mM	Polisorbato 20 0.04%	PFS
4	7	Succinato	ArgHCl 150 mM	Polisorbato 20 0.04%	PFS
5	7	Citrato	Trehalosa 270 mM	Ninguno	PFS
6	7	Histidina	Manitol 270 mM	Poloxámero 188 0.3%	PFS
7	6	Citrato	Manitol 270 mM	Polisorbato 20 0.04%	PFS
8	6.5	Histidina	Trehalosa 270 mM	Polisorbato 20 0.04%	PFS
9	6	Histidina	ArgHCl 150 mM	Ninguno	PFS
10	6	Succinato	Trehalosa 270 mM	Poloxámero 188 0.3%	PFS
11	6.5	Succinato	Manitol 270 mM	Ninguno	PFS
12	6.5	Succinato	Trehalosa 270 mM	Polisorbato 20 0.04%	PFS
13	6.5	Histidina	Trehalosa 270 mM	HPbCD 2.5 mM	PFS
14	6.5	Histidina	NaCl 150 mM	Polisorbato 20 0.04%	PFS
15	6.5	Histidina	Trehalosa 270 mM	Polisorbato 20 0.04%	VIAL
16	6.5	Histidina	Trehalosa 270 mM	Poloxámero 188 0.3%	VIAL

Resultados

Tablas de resultados para la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC-HPLC)

Tabla 6 Pureza según SEC, muestras en estrés de congelación-descongelación

Formulación	Productos de agregación	Pico principal	Productos de degradación
1	0.52	99.38	0.10
2	0.59	99.31	0.10
3	0.51	99.39	0.10
4	0.62	99.29	0.08
5	0.62	99.29	0.10
6	1.92	97.94	0.13
7	1.26	98.66	0.08

Formulación	Productos de agregación	Pico principal	Productos de degradación
8	0.53	99.36	0.10
9	0.56	99.35	0.10
10	0.64	99.28	0.08
11	1.75	98.15	0.10
12	0.56	99.38	0.07
13	0.51	99.40	0.09
14	0.72	99.19	0.08
15	0.56	99.35	0.09
16	0.56	99.36	0.09

Tabla 7 Pureza según SEC, muestras en estrés de agitación

Formulación	Productos de agregación	Pico principal	Productos de degradación
1	0.51	99.37	0.12
2	0.60	99.31	0.09
3	0.52	99.38	0.10
4	0.68	99.23	0.09
5	0.73	99.16	0.11
6	0.70	99.18	0.12
7	0.65	99.25	0.10
8	0.54	99.35	0.11
9	0.53	99.37	0.10
10	0.64	99.27	0.09
11	0.64	99.25	0.10
12	0.58	99.30	0.13
13	0.53	99.37	0.10
14	0.62	99.25	0.13
15	0.57	99.31	0.12
16	0.58	99.30	0.12

Tabla 8 Pureza según SEC, muestras en estrés térmico (40 °C)

Formulación	Productos de agregación	Pico principal	Productos de degradación
1	1.09	95.84	3.07
2	1.05	95.93	3.02
3	1.13	95.72	3.15
4	1.34	95.22	3.44
5	2.06	94.06	3.88
6	1.58	94.77	3.65
7	1.33	95.75	2.92

Formulación	Productos de agregación	Pico principal	Productos de degradación
8	1.13	95.75	3.12
9	0.90	95.89	3.21
10	1.24	95.78	2.98
11	1.45	95.48	3.07
12	1.14	95.81	3.05
13	1.02	95.90	3.08
14	1.21	95.63	3.17
15	1.32	94.75	3.92
16	1.51	93.56	4.93

Tabla 9: Pureza según SEC para t0 y muestras de estabilidad a 5 °C

Form	Productos de agregación	Productos de agregación	Productos de agregación	Productos de degradación	Productos de degradación	Productos de degradación
	T0	3 meses a 5 °C	6 meses a 5 °C	T0	3 meses a 5 °C	6 meses a 5 °C
1	0.46	0.53	0.54	0.1	0.09	0.12
2	0.54	0.62	0.61	0.09	0.07	0.11
3	0.46	0.56	0.53	0.09	0.09	0.12
4	0.61	0.77	0.76	0.08	0.07	0.12
5	0.59	0.79	0.76	0.1	0.08	0.13
6	0.63	0.75	0.69	0.08	0.08	0.14
7	0.59	0.67	0.57	0.08	0.05	0.11
8	0.5	0.59	0.48	0.1	0.08	0.12
9	0.5	0.57	0.47	0.1	0.08	0.12
10	0.6	0.67	0.51	0.08	0.06	0.12
11	0.57	0.71	0.55	0.09	0.08	0.12
12	0.52	0.61	0.45	0.09	0.06	0.13
13	0.51	0.57	0.42	0.11	0.05	0.11
14	0.55	0.65	0.49	0.07	0.04	0.13
15	0.51	0.61	0.43	0.1	0.09	0.13
16	0.53	0.64	0.44	0.09	0.07	0.14

Tabla 10: Pureza según SEC para t0 y muestras de estabilidad a 25 °C

Form	Productos de agregación	Productos de agregación	Productos de agregación	Productos de degradación	Productos de degradación	Productos de degradación
N.°	T0	3 meses a 25 °C	6 meses a 25 °C	T0	3 meses a 25 °C	6 meses a 25 °C
1	0.46	0.8	0.56	0.1	1.41	2.47
2	0.54	0.91	0.54	0.09	1.37	2.3
3	0.46	0.78	0.58	0.09	1.26	2.44
4	0.61	1.12	0.81	0.08	1.43	2.62
5	0.59	1.39	1.19	0.1	1.6	2.73
6	0.63	1.1	0.83	0.08	1.42	2.7
7	0.59	0.97	0.57	0.08	1.23	2.18
8	0.5	0.79	0.52	0.1	1.34	2.36
9	0.5	0.75	0.29	0.1	1.27	2.23
10	0.6	0.92	0.5	0.08	1.26	2.22
11	0.57	1.06	0.67	0.09	1.31	2.23
12	0.52	0.84	0.54	0.09	1.28	2.39
13	0.51	0.84	0.47	0.11	1.32	2.33
14	0.55	0.94	0.51	0.07	1.4	2.38
15	0.51	0.94	0.77	0.1	1.55	3.32
16	0.53	1.08	0.93	0.09	1.82	3.42

Tabla 11: Variantes de carga según CEX, muestras en estrés de congelación-descongelación

Formulación	Variantes ácidas	Pico principal	Variantes básicas
1	5.18	65.42	29.40
2	5.10	66.21	28.69
3	4.97	66.01	29.01
4	5.27	65.34	29.40
5	5.35	64.79	29.86
6	5.23	65.78	28.99
7	5.38	65.60	29.02
8	5.24	67.21	27.55
9	5.02	64.24	30.74
10	5.56	65.18	29.26
11	5.50	65.04	29.45
12	5.19	66.32	28.49
13	5.45	65.06	29.49
14	5.43	66.04	28.54
15	5.33	66.18	28.49
16	5.24	66.11	28.65

Tabla 12: Variantes de carga según CEX, muestras en estrés de agitación

Formulación	Variantes ácidas	Pico principal	Variantes básicas
1	5.09	66.35	28.56
2	5.03	66.83	28.13
3	5.05	66.98	27.97
4	5.07	66.60	28.33
5	5.17	65.47	29.36
6	5.34	66.70	27.97
7	5.36	66.63	28.01
8	5.11	66.95	27.94
9	4.78	66.45	28.77
10	4.99	67.25	27.76
11	5.12	66.21	28.67
12	5.21	67.18	27.60
13	5.41	66.40	28.19
14	5.05	67.29	27.66
15	5.14	66.70	28.16
16	5.15	66.84	28.01

Tabla 13: Variantes de carga según CEX, muestras en estrés térmico (40 °C)

Formulación	Variantes ácidas	Pico principal	Variantes básicas
1	13.41	59.24	27.35
2	12.00	61.63	26.37
3	14.43	58.54	27.03
4	13.59	60.20	26.21
5	14.40	58.18	27.42
6	15.36	58.63	26.01
7	14.83	58.99	26.18
8	14.10	59.34	26.55
9	12.70	58.92	28.38
10	15.17	58.64	26.19
11	14.09	58.86	27.05
12	14.31	59.15	26.54
13	14.54	58.97	26.49
14	12.22	61.15	26.62
15	15.01	58.21	26.79
16	16.54	56.43	27.03

Tabla 14: Variantes de carga según CEX para t0 y muestras de estabilidad a 5 °C

Form	Variantes ácidas	Variantes ácidas	Variantes ácidas	Variantes básicas	Variantes básicas	Variantes básicas
N.º	T0	3 meses a 5 °C	6 meses a 5 °C	T0	3 meses a 5 °C	6 meses a 5 °C
1	4.19	6.13	14.43	30.56	25.39	20.14
2	4.73	5.66	14.35	30.18	26.33	20.81
3	4.73	6.33	14.9	29.48	26.66	20.48
4	4.76	5.71	14.08	29.71	26.16	21.53
5	4.8	5.91	14.47	30.69	27.66	20.82
6	4.97	6.22	15.73	29.1	26.14	21.2
7	4.68	5.5	14.33	29.15	25.69	21.45
8	4.75	5.99	14.98	29.12	25.91	20.77
9	4.71	5.54	14.13	30.48	25.89	21.24
10	4.78	5.83	14.55	29.38	26.11	21.12
11	4.89	5.82	14.04	30.24	26.39	21.3
12	4.74	6.2	14.52	28.29	25.8	20.98
13	5.04	6.26	16.13	30.22	25.75	21.43
14	5.02	5.7	14.62	28.86	25.26	21.38
15	5.02	5.9	16.87	29.02	25.81	22.59
16	5.17	6.01	16.92	29.07	25.48	22.52

Tabla 15: Variantes de carga según CEX para t0 y muestras de estabilidad a 25 °C

Form	Variantes ácidas	Variantes ácidas	Variantes ácidas	Variantes básicas	Variantes básicas	Variantes básicas
N.º	T0	3 meses a 25 °C	6 meses a 25 °C	T0	3 meses a 25 °C	6 meses a 25 °C
1	4.19	7.75	27.71	30.56	24.44	21.16
2	4.73	6.81	22.26	30.18	25.64	20.38
3	4.73	6.81	24.95	29.48	24.38	20.28
4	4.76	8.02	24.73	29.71	24.96	20
5	4.8	7.67	28.55	30.69	23.86	21.46
6	4.97	7.36	25.94	29.1	24.86	18.62
7	4.68	7.05	31.1	29.15	23.96	20.23
8	4.75	7.85	27.67	29.12	24.73	20.93
9	4.71	7.72	29.52	30.48	24.65	19.3
10	4.78	7.87	27.61	29.38	24.76	20.33
11	4.89	8.7	36.3	30.24	23.58	19.85
12	4.74	7.24	25.53	28.29	24.91	20.58
13	5.04	7.41	24.77	30.22	24.14	19.91
14	5.02	7.75	29.63	28.86	25.37	21.95
15	5.02	8.09	28.7	29.02	24.56	20.01
16	5.17	8.18	32.26	29.07	24.94	22.16

Resumen de los resultados, primer cribado de las formulaciones líquidas

Dieciséis formulaciones del anticuerpo monoclonal, MOR6654B, se sometieron a un estudio de estabilidad durante un periodo de hasta seis meses a 5 °C y 25 °C. Además, las mismas formulaciones se sometieron a estrés de agitación, ciclos repetidos de F/T y estrés térmico (1 mes a 40 °C). Se utilizaron una amplia gama de métodos analíticos biofísicos y bioquímicos para determinar si existían diferencias entre las formulaciones en cuanto a su estabilidad. Los datos de SEC apuntaron hacia una diferencia en la estabilidad entre las formulaciones evaluadas. En las muestras de estrés de agitación, la formulación 5 (pH 7 sin surfactante) mostró un mayor incremento en productos de agregación, lo que demuestra el efecto beneficioso del polisorbato. Se registró un incremento más marcado en los productos de agregación tras el estrés de congelación-descongelación en las formulaciones de manitol y cloruro sódico.

El resultado de este primer estudio se puede resumir de la siguiente manera: El pH preferido es de 6.0. El estabilizante no iónico evaluado, la trehalosa, es beneficioso para la estabilidad de la formulación. El polisorbato 20 es beneficioso para la estabilidad de la formulación, ya que evita la formación de agregados.

ESTUDIO II: Segundo cribado de las formulaciones líquidas

Formulación de anticuerpos anti-BAFFR

Se evaluaron tres formulaciones (F1, F2 y F3) de MOR6654B con una concentración elevada del anticuerpo de 150 mg/mL y una formulación con una concentración más baja del anticuerpo de 20 mg/mL (F4) para determinar su estabilidad. Las cuatro formulaciones F1, F2, F3 y F4 se introdujeron en una jeringa de vidrio siliconizado de 1.0 mL e incluían tampón, azúcar, surfactante y aminoácido libre tal como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16: Composición de las formulaciones experimentales

	MOR6654B	Tampón	Azúcar	Surfactante	Aminoácido
F1	150mg/mL	histidina 20 mM; 6.0	sacarosa 220 mM	polisorbato 20 al 0.04%	-

F2	150mg/mL	histidina 20 mM; 6.0	trehalosa 220 mM	polisorbato 20 al 0.04%	-
F3	150mg/mL	histidina 20 mM; 6.0	sacarosa 120 mM	polisorbato 20 al 0.04%	arginina-HCl 50 mM
F4	20mg/mL	histidina 20 mM; 6.0	sacarosa 220 mM	polisorbato 20 al 0.04%	-

Las muestras de cada formulación se prepararon y evaluaron para determinar su estabilidad a tres temperaturas diferentes. Las cuatro formulaciones líquidas se colocaron en condiciones de almacenamiento experimental y se evaluaron para determinar su estabilidad tras el almacenamiento a
2 °C-8 °C en los puntos de evaluación 0 (t_0) y 2 meses (t_2)
25 °C en los puntos de evaluación 0 (t_0) y 2 meses (t_2)
40 °C en los puntos de evaluación 0 (t_0), 1 (t_1) y 2 meses (t_2)

Además del almacenamiento a varias temperaturas, las formulaciones se sometieron a una serie de condiciones de estrés tales como una exposición prolongada a la luz, agitación y múltiples ciclos de congelación-descongelación (F/T). Cada muestra se analizó utilizando varios métodos.

Resultados y discusión, segundo cribado de las formulaciones

Las cuatro formulaciones se evaluaron a la vez, dependiendo de la condición de estrés. En el punto de evaluación cero (t_0), las mediciones se realizaron por duplicado, así como también las mediciones realizadas después de dos meses (t_2). Todas las demás muestras se analizaron únicamente con réplicas únicas. Los resultados más relevantes se exponen a continuación.

Nefelometría

La nefelometría es un método turbidimétrico utilizado para detectar la presencia de agregados solubles o para indicar opalescencia. El resultado se enumera en términos de unidades nefelométricas de turbidez (NTU, por sus siglas en inglés).

Tabla 17: Unidades nefelométricas de turbidez (NTU) para las formulaciones de MOR6654B almacenadas a 40 °C durante un periodo de hasta dos meses.

	t_0	**40 °C durante 1 mes**	**40 °C durante 2 meses**
F1	5.16 / 5.26	6.19	4.00 / 4.07
F2	4.63 / 4.39	4.99	4.12 / 3.95
F3	8.94 / 8.54	9.60	8.34 / 8.33
F4	3.54 / 3.63	4.39	3.40 / 3.39

Los resultados de nefelometría muestran que la proteína es bastante estable físicamente, sin ningún cambio aparente incluso después de dos meses a 40 °C.

No es sorprendente que el almacenamiento a temperaturas más bajas tampoco produjera ningún cambio apreciable en los niveles de NTU para ninguna de las formulaciones (Tabla 18). No es obvio por qué la formulación 3 exhibe un número más elevado de NTU.

Tabla 18: Unidades nefelométricas de turbidez (NTU) para las formulaciones de MOR6654B almacenadas a 4 °C o 25 °C durante dos meses.

	t_0	**2-8 °C durante 2 meses**	**25 °C durante 2 meses**
F1	5.16 / 5.26	4.56 / 4.48	4.10 / 3.65

F2	4.63 / 4.39	5.56 / 4.09	3.43 / 3.39
F3	8.94 / 8.54	8.11 / 7.95	9.57 / 8.55
F4	3.54 / 3.63	3.43 / 3.47	2.98 / 2.76

Tabla 19: Unidades nefelométricas de turbidez (NTU) para las formulaciones de MOR6654B sometidas a estrés de agitación (agit), ciclos múltiples de F/T (F/T) y exposición prolongada a la luz (foto).

	t_0	**Agit**	**F/T**	**Foto**
F1	5.16 / 5.26	6.72	6.28	4.02
F2	4.63 / 4.39	5.22	5.26	3.91
F3	8.94 / 8.54	9.58	9.18	8.59
F4	3.54 / 3.63	4.48	4.22	3.15

Finalmente, la nefelometría de las muestras sometidas a condiciones de estrés tales como agitación, ciclos múltiples de F/T y exposición prolongada a la luz revelaron únicamente pequeños cambios en algunas de las formulaciones para algunas de las condiciones de estrés. Por ejemplo, la formulación 1 presentó un incremento de aproximadamente 1.5 NTU tras la agitación y de aprox. 1 NTU tras el estrés de F/T. En comparación, el incremento en la formulación 2 fue inferior a 1 NTU para cualquier condición de estrés. De modo similar, la formulación 4 de concentración más baja, que también contiene sacarosa, muestra un ligero incremento de aproximadamente 1 NTU tras la agitación.

Mediciones de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

Cromatografía de exclusión por tamaños (SEC)

Se llevaron a cabo tres tipos de análisis de HPLC para estas muestras, empezando con la cromatografía de exclusión por tamaños (SEC). Se produce una clara pérdida de monómero, que se mide mediante SEC, para las muestras almacenadas a 40 °C durante uno o dos meses (Tabla 20).

Tabla 20: Pureza (en términos de porcentaje de monómero) mediante SEC-HPLC para muestras de MOR6654B almacenadas a 40 °C durante un periodo de hasta dos meses.

	t_0	**40 °C durante 1 mes**	**40 °C durante 2 meses**
F1	99.74 / 99.78	92.71	92.08 / 92.27
F2	99.64 / 99.60	93.51	92.39 / 92.61
F3	99.77 / 99.76	93.26	92.43 / 92.32
F4	99.67 / 99.53	93.80	93.58 / 92.87

Se produce una pérdida de aproximadamente un 7%-8% de monómero, que se mide mediante SEC, para las muestras almacenadas a 40 °C durante uno o dos meses.

Tabla 21: Pureza (en términos de porcentaje de monómero) mediante SEC-HPLC SEC para muestras de MOR6654B almacenadas a 4 °C y 25 °C durante dos meses.

	t_0	2-8 °C durante 2 meses	25 °C durante 2 meses
F1	99.74 / 99.78	99.62 / 99.63	99.35 / 99.58
F2	99.64 / 99.60	99.61 / 99.59	99.50 / 99.35
F3	99.77 / 99.76	99.58 / 99.57	99.18 / 99.26
F4	99.67 / 99.53	99.60 / 99.57	99.26 / 99.42

Para las muestras almacenadas a una temperatura más baja, no se produce ninguna pérdida de monómero a 4 °C y se produce únicamente una pequeña pérdida de aprox. un 1% a 25 °C. Cuando se consideran los efectos de las condiciones de estrés, se produce una ligera reducción en todas las formulaciones tras la agitación y los ciclos de F/T, pero no se observa ninguna diferencia real entre las formulaciones. Tras la fotólisis, también se produce una pequeña reducción en el contenido de monómero. De nuevo, no se observan diferencias obvias entre las formulaciones.

Tabla 22: Unidades nefelométricas de turbidez (NTU) para las formulaciones de MOR6654B sometidas a estrés de agitación (agit), ciclos múltiples de F/T (F/T) y exposición prolongada a la luz (foto).

	t_0	Agit	F/T	Foto
F1	99.74 / 99.78	99.29	98.86	98.94
F2	99.64 /99.60	99.04	98.96	98.86
F3	99.77 / 99.76	98.85	98.98	98.44
F4	99.67 / 99.53	99.01	98.93	98.68

Aunque la examinación del contenido global de monómero resulta provechosa, puede ser más útil considerar el perfil de estabilidad global. Las siguientes tablas se han preparado para resumir el porcentaje de cada pico observado en cada sitio. A modo de conveniencia, los picos se ordenan según su tiempo de retención relativo (TRR) para eliminar pequeñas variaciones en los tiempos de ejecución.

Tabla 23. Perfil de estabilidad global tal como se mide mediante SEC para muestras de MOR6654B almacenadas a 40 °C durante un periodo de hasta dos meses.

			TRR									
Formulación	Rep	Punto de evaluación	0.81	0.84	0.88	0.91	0.95	1.00	1.07	1.22	1.38	1.58
Formulación 1	1	0			0.13			99.74		0.04	0.09	
	2	0			0.14			99.78		0.03	0.04	
Formulación 2	1	0			0.31			99.64		0.05		
	2	0			0.33			99.60		0.07		
Formulación 3	1	0			0.17			99.78		0.05	0.05	
	2	0			0.19			99.77		0.05		
Formulación 4	1	0			0.12			99.71				0.17
	2	0			0.17			99.59		0.07		0.17
Formulación 1	1	1		1.12				92.85	5.35	0.68		
Formulación 2	1	1		1.10				93.98	4.43	0.49		
Formulación 3	1	1		0.90		0.07		93.61	4.84	0.58		
Formulación 4	1	1		0.78				94.70	4.03	0.49		
Formulación 1	1	2	0.16		0.18			92.08	6.40	1.18		

	2	2	0.17		0.21			92.27	6.31	1.05		
Formulación 2	1	2			0.44			92.39	6.05	1.12		
	2	2			0.19		0.25	92.61	5.94	1.01		
Formulación 3	1	2			0.14		0.20	92.43	6.27	0.96		
	2	2			0.17		0.19	92.32	6.27	1.05		
Formulación 4	1	2			0.30	0.18		93.58	4.79	1.15		
	2	2			0.29	0.18		92.87	5.39	1.26		

No se detectó ningún pico de agregados de peso molecular elevado en t_0 (Tabla 23) y se encontraron únicamente tres impurezas, incluido un pico en el TRR 0.88, el cual es probablemente un oligómero de algún tipo. Tras el almacenamiento a 40 °C durante un mes o dos meses, se produce una reducción sustancial en el contenido de monómero, eluyéndose la mayoría de los productos de degradación más tarde que el pico principal (Tabla 23). Esto indica que la fragmentación es más problemática que la agregación para estas formulaciones.

Para las muestras calentadas a 25 °C durante dos meses, se produce una pérdida muy pequeña de monómero (< 1%) (Tabla 24). Esto sugiere que la energía de activación aparente para la vía de degradación primaria es bastante grande, lo cual concuerda con la degradación hidrolítica. Se observan los dos mismos picos de fragmentación en TRR 1.07 y 1.22, siendo el pico en 1.07 bastante más grande en todas las muestras. De hecho, el TRR de 1.22 es tan pequeño en las formulaciones 1 y 2 que estos no se integraron en los análisis. Por el contrario, existen únicamente las diferencias más pequeñas entre formulaciones almacenadas a 25 °C cuando se evalúan mediante SEC.

Tabla 24. Perfil de estabilidad global tal como se mide mediante SEC para muestras de MOR6654B almacenadas a 25°C durante dos meses.

			TRR								
Formulación	Rep	Punto de evaluación	0.81	0.88	0.91	0.96	1.00	1.07	1.22	1.38	1.58
25 °C											
Formulación 1	1	0		0.13			99.74		0.04	0.09	
	2	0		0.14			99.78		0.03	0.04	
Formulación 2	1	0		0.31			99.64		0.05		
	2	0		0.33			99.60		0.07		
Formulación 3	1	0		0.17			99.78		0.05	0.05	
	2	0		0.19			99.77		0.05		
Formulación 4	1	0		0.12			99.71				0.17
	2	0		0.17			99.59		0.07		0.17
Formulación 1	1	2				0.33	99.35		0.32		
	2	2		0.13			99.58		0.29		
Formulación 2	1	2		0.29			99.50		0.21		
	2	2		0.34			99.35		0.31		
Formulación 3	1	2		0.47			99.18		0.31	0.03	
	2	2		0.41			99.26		0.29	0.03	
Formulación 4	1	2		0.40			99.26		0.33	0.01	
	2	2		0.35			99.42		0.21	0.02	

Para las muestras almacenadas a 4 °C durante dos meses, no se observa virtualmente ninguna pérdida de monómero mediante SEC en ningún punto (Tablas 23). Las cantidades de oligómero son casi idénticas para todas las formulaciones.

Cuando se examinan las diferentes condiciones de estrés (evaluación de la agitación, F/T y fotoestabilidad), se observa poca degradación mediante SEC. Al parecer la agitación no provoca ninguna degradación química apreciable y provoca unos pequeños incrementos en los niveles de oligómero, del mismo modo que los ciclos repetidos de F/T. Todas las formulaciones se comportan prácticamente igual. Tras la exposición a la luz, los análisis de SEC indican unos niveles de fragmentación más elevados para la formulación 3 (Tabla 26).

Tabla 25. Perfil de estabilidad global tal como se mide mediante SEC para muestras de MOR6654B almacenadas a 4 °C durante dos meses.

			TRR								
Formulación	Rep	Punto de evaluación	0.81	0.84	0.88	0.91	1.00	1.07	1.22	1.38	1.58

4 °C											
Formulación 1	1	0			0.13		99.74		0.04	0.09	
	2	0			0.14		99.78		0.03	0.04	
Formulación 2	1	0			0.31		99.64		0.05		
	2	0			0.33		99.60		0.07		
Formulación 3	1	0			0.17		99.78		0.05	0.05	
	2	0			0.19		99.77		0.05		
Formulación 4	1	0			0.12		99.71				0.17
	2	0			0.17		99.59		0.07		0.17
Formulación 1	1	2			0.32		99.62		0.06		
	2	2			0.32		99.63		0.05		
Formulación 2	1	2			0.34		99.61		0.05		
	2	2			0.35		99.59		0.06		
Formulación 3	1	2			0.35		99.58		0.07		
	2	2			0.36		99.57		0.07		
Formulación 4	1	2			0.34		99.60		0.05		
	2	2			0.37		99.57		0.06		

Tabla 26. Perfil de estabilidad global tal como se mide mediante SEC para formulaciones de MOR6654B sometidas a estrés de agitación (agit), ciclos múltiples de F/T (f/t) y exposición prolongada a la luz (foto).

			TRR									
Formulación	Rep	Punto de evaluación	0.81	0.88	0.95	1.00	1.07	1.22	1.29	1.38	1.40	1.58
Formulación 1	1	0		0.13		99.74		0.04		0.09		
	2	0		0.14		99.78		0.03		0.04		
Formulación 2	1	0		0.31		99.64		0.05				
	2	0		0.33		99.60		0.07				
Formulación 3	1	0		0.17		99.78		0.05		0.05		
	2	0		0.19		99.77		0.05				
Formulación 4	1	0		0.12		99.71						0.17
	2	0		0.17		99.59		0.07				0.17
Formulación 1	1	agit		0.69		99.31						
Formulación 2	1	agit		0.94		99.06						
Formulación 3	1	agit		0.98		98.89		0.11			0.02	
Formulación 4	1	agit		0.85		99.15						
Formulación 1	1	F/T		0.94		98.85		0.20				
	2	F/T		0.94		98.91		0.15				
Formulación 2	1	F/T		0.90		98.96		0.13				
	2	F/T		0.90		99.00		0.09				
Formulación 3	1	F/T		0.92		98.99		0.09				
	2	F/T		0.92		98.99		0.09				
Formulación 4	1	F/T		0.79		99.09		0.12				
	2	F/T		0.79		99.09		0.10				
Formulación 1	1	foto		0.77		98.94		0.25	0.04			
	2	foto		0.80		98.92		0.25	0.04			
Formulación 2	1	foto		0.87		98.86		0.24	0.03			
	2	foto		0.90		98.84		0.24	0.03			
Formulación 3	1	foto		0.61	0.26	98.44	0.09	0.57	0.03			
	2	foto		0.62	0.25	98.49	0.10	0.52	0.02			
Formulación 4	1	foto		0.91		98.68		0.36	0.05			
	2	foto		0.95		98.56		0.44	0.05			

HPLC de tipo RP

La HPLC de tipo RP proporciona información sobre la degradación química que se podría estar produciendo en la proteína.

Ya que al parecer se está produciendo degradación química en MOR6654B, el análisis de HPLC de tipo RP podría ser bastante informativo.

En t_0, las cuatro formulaciones tienen una pureza cercana a un 99.9% según HPLC de tipo RP.

Después del almacenamiento de un mes a 40 °C, la pureza se reduce hasta aprox. un 96%, aunque la pureza fue notablemente superior para la formulación 4. La discrepancia en estos valores hace cuestionar si este valor es correcto (Tabla 27).

A los dos meses, las cuatro formulaciones se han reducido hasta aproximadamente un 94%, con diferencias pequeñas, si es que las hay, entre las formulaciones.

Tabla 27: Pureza de las formulaciones de MOR6654B determinada mediante HPLC de tipo RP después del almacenamiento a 40 °C durante un periodo de hasta dos meses

Form N.º	**[proteína] mg/mL**		**t0**		**t1**	**t2**	
1	150	sacarosa	99.86	99.89	96.09	93.97	94.01
2	150	trehalosa	99.94	99.92	96.27	94.61	94.12
3	150	sacarosa/Arg	99.93	99.93	95.82	94.13	94.30
4	20	sacarosa	99.85	99.84	98.44	94.44	94.67

Tabla 28. Pureza de las formulaciones de MOR6654B determinada mediante HPLC de tipo RP después del almacenamiento a 4 °C o 25 °C durante dos meses

Form N.º	**[proteína] mg/mL**		**t0**		**t2 4 °C**		**t2 25 °C**	
1	150	sacarosa	99.86	99.89	96.92	96.85	96.63	96.61
2	150	trehalosa	99.94	99.92	97.12	96.99	96.95	96.63
3	150	sacarosa/Arg	99.93	99.93	96.88	96.99	96.49	96.46
4	20	sacarosa	99.85	99.84	96.81	97.07	96.34	96.41

El almacenamiento a 25 °C durante dos meses produce una reducción en la pureza mediante HPLC de tipo RP hasta ~96.5% (Tabla 28). La pureza de las muestras almacenadas a 4 °C no fue tan diferente, con purezas cercanas a un 97%. De nuevo, las cuatro formulaciones se comportaron de forma similar.

Después de someterse a condiciones de estrés, la pureza también se reduce. Para los estudios de agitación y F/T, la pureza es de aproximadamente un 97-98% para todas las formulaciones. Sin embargo, tras la exposición a la luz se produce un mayor grado de degradación. Las formulaciones de 150 mg/mL se reducen hasta aproximadamente un 94%, mientras que la formulación de 20 mg/mL se reduce incluso hasta < 90%.

Tabla 29. Pureza determinada mediante HPLC de tipo RP de las formulaciones de MOR6654B sometidas a estrés de agitación (agit), ciclos múltiples de F/T (F/T) y exposición prolongada a la luz (foto).

Form N.º	[proteína] mg/mL		t0		agit	F/T	foto
1	150	sacarosa	99.86	99.89	97.51	98.14	94.47
2	150	trehalosa	99.94	99.92	97.46	97.67	94.45
3	150	sacarosa/Arg	99.93	99.93	97.89	96.68	94.82
4	20	sacarosa	99.85	99.84	96.74	97.29	89.51

Del mismo modo que con SEC, resulta útil examinar la aparición de productos de degradación, así como también considerar la pérdida del pico principal. Para las muestras almacenadas a 40 °C, el perfil de degradación se resume en la Tabla 30. En t0 se observa únicamente una impureza, pero se observan múltiples especies tras el almacenamiento a una temperatura elevada. Parece ser que la pureza relativamente elevada observada para la formulación 4 en t1 fue debida simplemente al hecho de que no se observó el pico en el TRR 1.19 (Tabla 30). En resumen, existe una diferencia muy pequeña entre cualquiera de las cuatro formulaciones respecto al perfil de estabilidad global tal como se mide mediante HPLC de tipo RP.

Tabla 30. Perfil de degradación de las formulaciones de MOR6654B determinado mediante HPLC de tipo RP después del almacenamiento a 40 °C durante un mes (negrita) y dos meses (cursiva)

Formulación	Rep	Punto de evaluación	0.67	0.70	0.76	0.86	0.93	1.00	1.11	1.16	1.19
40 °C											
Formulación 1	1	0					0.14	99.86			
	2	0					0.11	99.89			
Formulación 2	1	0					0.11	99.89			
	2	0					0.21	99.79			
Formulación 3	1	0					0.12	99.88			
	2	0					0.11	99.89			
Formulación 4	1	0					0.15	99.85			
	2	0					0.16	99.84			
Formulación 1	**1**	**1**		**0.01**	**0.04**	**1.35**		**96.09**			**2.51**
Formulación 2	**1**	**1**		**0.01**	**0.02**	**1.44**		**96.33**			**2.20**
Formulación 3	**1**	**1**		**0.02**	**0.06**	**1.70**		**95.99**			**2.24**
Formulación 4	**1**	**1**		**0.01**	**0.03**	**1.52**		**98.44**			
Formulación 1	*1*	*2*	*0.04*			*2.72*		*93.97*	*1.97*	*1.29*	
	2	*2*	*0.05*			*2.73*		*94.01*		*3.21*	
Formulación 2	*1*	*2*	*0.02*			*2.67*		*94.61*		*2.70*	
	2	*2*	*0.06*			*2.73*		*94.12*	*1.86*	*1.24*	
Formulación 3	*1*	*2*	*0.08*			*2.87*		*94.13*	*2.19*	*0.73*	
	2	*2*	*0.08*			*2.88*		*94.30*		*2.74*	
Formulación 4	*1*	*2*	*0.05*			*2.89*		*94.44*	*2.62*		
	2	*2*	*0.05*			*2.72*		*94.67*	*2.57*		

Para las muestras almacenadas a 25 °C, hay dos productos de degradación principales que se eluyen después del pico principal (Tabla 31). El perfil de estabilidad para las cuatro formulaciones es esencialmente el mismo a 25 °C cuando se evalúa utilizando HPLC de tipo RP. Del mismo modo, se observa un perfil de degradación similar para las muestras almacenadas a 4 °C (Tabla 32).

Tabla 31. Perfil de degradación de las formulaciones de MOR6654B determinado mediante HPLC de tipo RP después del almacenamiento a 25 °C para t0 y dos meses

Formulación	Rep	Punto de evaluación	0.67	0.76	0.86	0.93	1.00	1.11	1.16	1.19
25 °C										
Formulación 1	1	0				0.14	99.86			
	2	0				0.11	99.89			
Formulación 2	1	0				0.11	99.89			
	2	0				0.21	99.79			
Formulación 3	1	0				0.12	99.88			
	2	0				0.11	99.89			
Formulación 4	1	0				0.15	99.85			
	2	0				0.16	99.84			
Formulación 1	1	2			0.64		96.63	2.13		0.60
	2	2			0.56		96.61	2.24		0.59
Formulación 2	1	2			0.55		96.95	1.77		0.72
	2	2			0.56		96.63	2.21		0.60
Formulación 3	1	2			0.63		96.49	2.33		0.55
	2	2			0.65		96.46	2.17		0.72

Formulación 4	1	2			0.55		96.34	2.37		0.74
	2	2			0.54		96.41	2.16		0.88

Tabla 32. Perfil de degradación de las formulaciones de MOR6654B determinada mediante HPLC de tipo RP después del almacenamiento a 4 °C durante un periodo de hasta dos meses

Formulación	Rep	Punto de evaluación	0.67	0.76	0.86	0.93	1.00	1.11	1.16	1.19
4 °C										
Formulación 1	1	0				0.14	99.86			
	2	0				0.11	99.89			
Formulación 2	1	0				0.11	99.89			
	2	0				0.21	99.79			
Formulación 3	1	0				0.12	99.88			
	2	0				0.11	99.89			
Formulación 4	1	0				0.15	99.85			
	2	0				0.16	99.84			
Formulación 1	1	2			0.25		96.92	2.20	0.63	
	2	2			0.24		96.85	2.34	0.58	
Formulación 2	2	2			0.17		97.12	1.87	0.83	
	2	2			0.23		96.99	1.95	0.83	
Formulación 3	1	2			0.16		96.88	2.96		
	2	2			0.17		96.99	2.84		
Formulación 4	1	2			0.23		96.81	2.20	0.76	
	2	2			0.16		97.07	2.06	0.71	

Cuando las muestras se someten a agitación, aparece únicamente un producto de degradación y los niveles son similares en todas las muestras (Tabla 33). La formulación 4 parece ligeramente menos estable que las otras tres, posiblemente debido a la concentración de proteína más baja. Los ciclos repetidos de F/T también provocan cierto daño moderado según se observa mediante HPLC de tipo RP, con un perfil similar al observado para la agitación. Esto se observa de forma repetida a lo largo del estudio, lo cual indica que la sensibilidad interfacial de esta proteína se puede observar tanto si se realiza una prueba como la otra. No parece que sea necesario realizar ambas para evaluar la sensibilidad global frente al estrés interfacial. Finalmente, la exposición a la luz genera ciertas especies de elución temprana, las cuales son probablemente fragmentos. De las cuatro formulaciones, los niveles de estas especies son más elevados para la formulación 3 (Tabla 33).

Tabla 33. Perfil de degradación determinado mediante HPLC de tipo RP de las formulaciones de MOR6654B sometidas a estrés de agitación (agit), ciclos múltiples de F/T (F/T) y exposición prolongada a la luz (foto).

Formulación	Rep	Condición	0.68	0.75	0.87	0.93	0.96	1.00	1.10	1.16	1.24	1.29
Agitación												
Formulación 1	1	t0				0.14		99.86				
	2					0.11		99.89				
Formulación 2	1	t0				0.11		99.89				
	2					0.21		99.79				
Formulación 3	1	t0				0.12		99.88				
	2					0.11		99.89				
Formulación 4	1	t0				0.15		99.85				
	2					0.16		99.84				
Formulación 1	1	Agit				0.10		98.07	1.83			
	2					0.12		96.96	2.92			
Formulación 2	1	Agit				0.29		97.52	2.20			
	2					0.13		97.40	2.47			
Formulación 3	1	Agit				0.10		98.14	1.76			

	2					0.11		97.64	2.25			
Formulación 4	1	Agit				0.11		96.79			3.10	
	2					0.11		96.68			3.21	
Formulación 1	1	F/T				0.17		99.31				0.51
	2					0.23		96.96	2.81			
Formulación 2	1	F/T				0.26		97.94	1.80			
	2					0.27		97.40	2.33			
Formulación 3	1	F/T				0.17		96.68	3.15			
Formulación 4	1	F/T				0.12		97.11	2.78			
	2					0.10		97.48	2.42			
Formulación 1	1	foto	0.01		0.62		1.17	94.47	3.73			
	2		0.01		0.63		1.42	96.93		1.02		
Formulación 2	2	foto	0.01		0.65		1.52	94.45	3.38			
	2		0.01		0.68		1.56	94.08	3.68			
Formulación 3	1	foto	0.03		1.36		0.62	94.82	3.17			
	2		0.03		1.40		0.87	93.98	3.73			
Formulación 4	1	foto		0.24	0.98		6.05	89.51	3.23			
	2			0.25	0.93		5.45	89.69	3.68			

Cromatografía de intercambio catiónico (HPLC de tipo CEX)

El tercer método de HPLC utilizado para evaluar la estabilidad de las cuatro formulaciones de MOR6654B es la cromatografía de intercambio catiónico (CEX). Este método está diseñado para identificar los productos de degradación que difieren en carga respecto al compuesto original. Inicialmente, las cuatro formulaciones presentan un pico principal ancho que comprende aproximadamente un 98% del área total de los picos (Tabla 34). Tras el almacenamiento a 40 °C durante un mes, el pico principal se reduce hasta aproximadamente un 96%, teniendo la formulación 4 una pureza ligeramente superior (Tabla 34). Después de dos meses a 40 °C, este se ha reducido adicionalmente hasta aproximadamente un 95%, mostrando la formulación 1 la pureza más elevada.

Tabla 34. Pureza tal como se determina mediante HPLC de tipo CEX de las formulaciones de MOR6654B después del almacenamiento a 40 °C durante un periodo de hasta dos meses

			t0		t1	t2	
Form N.º	[proteína] mg/mL		CEX		CEX	CEX	
1	150	sacarosa	98.30	98.28	96.76	95.76	95.69
2	150	trehalosa	98.35	98.28	96.62	95.17	95.31
3	150	sacarosa/Arg	98.34	98.26	96.62	94.75	94.89
4	20	sacarosa	98.30	98.22	97.31	95.39	95.13

Tabla 35. Pureza tal como se determina mediante HPLC de tipo CEX de las formulaciones de MOR6654B después del almacenamiento a 4 °C y 25 °C durante dos meses

			t0		t2 4 °C		t2 25 °C	
Form N.º	[proteína] mg/mL		CEX		CEX		CEX	
1	150	sacarosa	98.30	98.28	97.29	97.70	97.09	97.36
2	150	trehalosa	98.35	98.28	97.45	97.35	97.31	97.20
3	150	sacarosa/Arg	98.34	98.26	97.33	97.45	97.36	97.35
4	20	sacarosa	98.30	98.22	97.05	97.38	97.42	97.46

Para las formulaciones de MOR6654B almacenadas durante dos meses a 25 °C, la pureza se reduce desde > 98% hasta ~97%, siendo la formulación 4 ligeramente, aunque tan solo ligeramente, más estable (Tabla 35). Cuando se almacenaron a 4 °C durante la misma cantidad de tiempo, se produce cierta pérdida de la pureza, similar a la que se observó con los

datos de HPLC de tipo RP. De nuevo, no está claro por qué se produce prácticamente la misma degradación en las muestras de 4 °C que en las de 25 °C, pero el grado de degradación es pequeño y todas las formulaciones de MOR6654B se comportan aproximadamente igual.

Tabla 36. Pureza tal como se determinó mediante HPLC de tipo CEX de las formulaciones de MOR6654B sometidas a estrés de agitación (agit), ciclos múltiples de F/T (F/T) y exposición prolongada a la luz (foto).

			t0		agit	F/T	foto
Form N.º	[proteína] mg/mL		CEX		CEX	CEX	CEX
1	150	sacarosa	98.30	98.28	97.59	97.54	98.91
2	150	trehalosa	98.35	98.28	97.37	97.49	98.82
3	150	sacarosa/Arg	98.34	98.26	97.33	97.96	98.41
4	20	sacarosa	98.30	98.22	97.31	97.56	98.82

Tras la agitación o ciclos repetidos de F/T, se produce cierta pérdida basándose en la HPLC de tipo CEX, comportándose las cuatro formulaciones por igual (Tabla 36). La exposición prolongada a la luz produjo daños muy pequeños según la HPLC de tipo CEX, a diferencia de lo que se ha observado con la HP LC de tipo SEC y RP (Tablas 26 y 29, respectivamente). Esto sugiere que los productos de degradación generados por la luz no difieren en cuanto a la carga respecto al compuesto original.

Electroforesis capilar reductora (rCE-SDS)

El método de electroforesis capilar permite aquí analizar el grado de daños en la cadena ligera (LC) y la cadena pesada (HC) del anticuerpo de forma independiente. Además, puede proporcionar una estimación de qué cantidad de la proteína no es LC y HC intacta, según indica el contenido de especies que no son LC/HC. En t0, hay aproximadamente un 25% de LC y un 70% de HC según el área de los picos, que no está corregida teniendo en cuenta las diferencias en el tamaño (Tabla 37), contándose el resto (~5 %) como especies que no son LC/HC (Tabla 38).

Tabla 37. Porcentaje de LC y HC tal como se determina mediante rCE-SDS en las formulaciones de MOR6654B almacenadas a 40 °C durante un periodo de hasta dos meses

			t0				t1		t2			
Form N.º	[proteína] mg/mL		LC	HC	LC	HC	LC	HC	LC	HC	LC	HC
1	150	sacarosa	25.0	69.8	25.5	69.4	26.3	64.4	27.5	62.7	27.6	62.3
2	150	trehalosa	25.9	69.4	26.0	69.2	26.9	64.7	27.0	62.3	27.0	61.3
3	150	sacarosa/Arg	24.1	70.2	24.5	69.6	27.6	62.8	27.5	61.7	27.2	63.8
4	20	sacarosa	24.9	67.8	24.9	67.9	27.3	67.5	26.5	65.0	27.0	63.6

Tras el almacenamiento durante un mes a 40 °C, las cantidades relativas de LC y HC han cambiado, representando ahora LC ~27% y HC entre un 62 y un 68% (Tabla 37). Esto indica que se está perdiendo HC. Esto se refleja en un incremento marcado de la cantidad de especies que no son LC/HC (Tabla 38), donde estas cantidades se han casi duplicado respecto a los niveles previos al almacenamiento.

Tabla 38. Porcentaje de especies que no son LC/HC tal como se determina mediante rCE-SDS en las formulaciones de MOR6654B almacenadas a 40 °C durante un periodo de hasta dos meses

			t0	t1	t2
Form N.º	[proteína]		especies que no son LC/HC	especies que no son LC/HC	especies que no son LC/HC
1	150	sacarosa	5.2	9.3	9.9
2	150	trehalosa	4.8	8.4	11.2
3	150	sacarosa/Arg	5.8	9.6	9.9
4	20	sacarosa	7.3	5.2	9.0

Al final de los dos meses, hay aproximadamente un 10% (o más) de las especies que no son LC/HC. Estos datos sugieren que la formulación 4 es la más robusta, con el incremento porcentual más pequeño en los niveles de especies que no son LC/HC.

Tabla 39. Porcentaje de LC y HC tal como se determina mediante rCE-SDS en las formulaciones de MOR6654B almacenadas a 4 °C durante dos meses

			t0				t2 4 °C				
Form N.º	[proteína] mg/mL		LC	HC	LC	HC	LC	HC	LC	HC	especies que no son LC/HC
1	150	sacarosa	25.0	69.8	25.5	69.4	26.4	66.2	26.7	66.8	7.0
2	150	trehalosa	25.9	69.4	26.0	69.2	27.3	68.7	27.3	67.9	4.4
3	150	sacarosa/Arg	24.1	70.2	24.5	69.6	27.7	67.3	26.9	66.3	5.9
4	20	sacarosa	24.9	67.8	24.9	67.9	25.8	67.6	25.9	67.3	6.7

Cuando las muestras se almacenan a 4 °C, todavía se observa cierta degradación mediante rCE-SDS, ya que los niveles de LC se incrementan desde ~25% hasta ~27% (Tabla 39). En este caso, la formulación 2 es la más estable, con un incremento pequeño en las cantidades de las especies que no son LC/HC.

Tabla 40. Porcentaje de LC y HC tal como se determina mediante rCE-SDS en las formulaciones de MOR6654B almacenadas a 25 °C durante dos meses

			t0				t2 25 °C				
Form N.º	[proteína] mg/mL		LC	HC	LC	HC	LC	HC	LC	HC	especies que no son LC/HC
1	150	sacarosa	25.0	69.8	25.5	69.4	27.9	67.4	28.0	67.5	4.6
2	150	trehalosa	25.9	69.4	26.0	69.2	27.9	66.1	27.8	67.5	5.3
3	150	sacarosa/Arg	24.1	70.2	24.5	69.6	26.4	67.5	26.9	66.0	6.6
4	20	sacarosa	24.9	67.8	24.9	67.9	26.1	68.0	26.7	68.0	5.6

Cuando se almacenan a 25° durante dos meses, se produce un incremento comparable en LC y una reducción en el contenido de HC (Tabla 40). Los niveles de especies que no son LC/HC se incrementan, pero casi tanto como para las muestras de 40 °C. De entre ellas, la formulación 3 parece presentar la estabilidad más deficiente, pero las diferencias son pequeñas.

Tabla 41. Porcentaje de LC y HC tal como se determina mediante rCE-SDS en las formulaciones de MOR6654B sometidas a estrés de agitación (agit), ciclos múltiples de F/T (F/T) y exposición prolongada a la luz (foto).

			agit			F/T			foto		
Form N.º	[proteína] mg/mL		LC	HC	especies que no son LC/HC	LC	HC	especies que no son LC/HC	LC	HC	especies que no son LC/HC
1	150	sacarosa	28.3	67.2	4.5	28.7	67.6	3.7	27.3	66.2	6.5
2	150	trehalosa	28.2	68.3	3.5	27.9	67.7	4.4	27.0	66.1	6.9
3	150	sacarosa/ Arg	28.3	68.4	3.3	27.6	69.3	3.1	26.6	66.1	7.3
4	20	sacarosa	26.9	69.1	4.0	26.9	69.5	3.6	26.2	64.6	9.2

El conjunto final de muestras que se debían analizar mediante rCE-SDS fueron aquellas sometidas a las tres condiciones de estrés diferentes (Tabla 41). Cuando las muestras se agitan o exponen a ciclos de F/T, no se observa ningún incremento apreciable en las especies que no son LC/HC para ninguna de las cuatro formulaciones de MOR6654B. Esto concuerda con las otras observaciones, en el hecho de que MOR6654B en estas formulaciones no es muy sensible al estrés interfacial. También refuerza la idea de que estas dos pruebas proporcionan evaluaciones comparables de la estabilidad interfacial. La exposición prolongada a la luz dio como resultado cierta pérdida de HC y un incremento en los niveles de especies que no son LC/HC (Tabla 41). De entre estas formulaciones, la formulación 4 presentó los cambios más grandes.

Tomografía de microflujo (MFI)

En los últimos años, ha aumentado el interés en los niveles de partículas subvisibles en productos proteicos inyectables. Como resultado, se han desarrollado una serie de métodos analíticos diferentes. Uno de los conocidos de forma más generalizada es la tomografía de microflujo (MFI). Esta técnica se utilizó para medir el contenido de partículas subvisibles (en términos de partículas por mL) en diferentes intervalos de tamaños. Aunque se recolectaron datos hasta 100 um en cuanto al tamaño, solo se presentan los datos hasta 25 um. La reproducibilidad en los datos de MFI es muy buena. La desviación estándar relativa promedio para las mediciones por duplicado es de aproximadamente un 5%.

Tabla 42. Contenido subvisible (en partículas/mL) tal como se mide utilizando MFI para las formulaciones de MOR6654B almacenadas a 40 °C durante un mes (en negrita) y dos meses (en cursiva). Las muestras en t1 no se evaluaron por duplicado. Por lo demás, los valores indicados son promedios ± una desviación estándar.

Form N.º	[proteína] mg/mL	Excipiente	total	1-2 um	2-5 um	5-10 um	10-25 um
1	150	sacarosa	24137 ± 486	18257 ± 391	4968 ± 33	518 ± 6	78 ± 16
2	150	trehalosa	12614 ± 660	9580 ± 661	2298 ± 64	568 ± 47	148 ± 10
3	150	sacarosa/ Arg	33374 ± 975	23593 ± 718	8554 ± 174	1134 ±88	82 ± 5
4	20	sacarosa	4130 ± 28	2463 ± 134	1197 ± 15	441 ± 76	26 ± 14
1	**150**	**sacarosa**	**46508**	**36658**	**7768**	**1684**	**326**
2	**150**	**trehalosa**	**22154**	**14920**	**5153**	**1867**	**214**
3	**150**	**sacarosa/ Arg**	**34800**	**22990**	**9791**	**1926**	**82**
4	**20**	**sacarosa**	**27372**	**15663**	**9660**	**1943**	**98**
1	*150*	*sacarosa*	*35130 ± 2897*	*21931 ± 1725*	*8703 ± 544*	*3793 ± 596*	*683 ± 34*
2	*150*	*trehalosa*	*24843 ± 3887*	*19692 ± 3789*	*4246 ± 39*	*757 ± 21*	*107 ± 1*
3	*150*	*sacarosa/ Arg*	*46220 ± 3152*	*33038 ± 849*	*10853 ± 1957*	*2000 ± 110*	*239 ± 109*
4	*20*	*sacarosa*	*51835 ±1703*	*33847 ± 905*	*14942 ± 74*	*2411 ± 6*	*127 ± 11*

A menudo, los datos resumidos para MFI indican únicamente el recuento total de partículas (en partículas por mL), pero esto puede llevar a confusión, ya que los números están dominados por partículas que se cuentan en el intervalo de tamaños de 1-2 um. En este intervalo de tamaños, el aceite de silicona y las burbujas de aire predominan, y desvían el recuento de las partículas basadas en proteínas. Aunque se proporcionan estos números, lo mejor es mirar a las partículas de tamaño superior a 2 um, posiblemente superior a 5 um. Además, para las muestras en las que se indican promedios y desviaciones estándar, estos son los resultados de análisis por duplicado.

Cuando se almacenan a 40 °C, el recuento de partículas subvisibles aumenta para todas las formulaciones (Tabla 42). Cabe destacar en particular la formulación 4, donde el recuento total de partículas es inferior a 5000 partículas por mL en t0, mucho más bajo que para las otras formulaciones de concentración más elevada. Después de un mes, todas las formulaciones exceden ahora 20 000 partículas por mL, aunque el incremento para la formulación 3 es bastante pequeño (Tabla 42). A los dos meses, únicamente la formulación 2 es inferior a 30 000 partículas por mL. La diferencia es aún más sorprendente para las partículas de 2-5 um (donde esta formulación contiene menos de 5000 partículas por mL) y 5-10 um, donde los niveles son inferiores a 1000 partículas por mL, siendo únicamente la formulación 1 parecida en cuanto a la cantidad total de partículas subvisibles presentes.

Tabla 43. Contenido subvisible (en partículas/mL) tal como se mide utilizando MFI para las formulaciones de MOR6654B almacenadas a 25 °C durante dos meses (en negrita). Los valores indicados son promedios ± una desviación estándar.

Form N.º	[proteína] mg/mL	**Excipiente**	total	1-2 um	2-5 um	5-10 um	10-25 um
1	150	sacarosa	24137 ± 486	18257 ± 391	4968 ± 33	518 ± 6	78 ± 16
2	150	trehalosa	12614 ± 660	9580 ± 661	2298 ± 64	568 ± 47	148 ± 10
3	150	sacarosa/ Arg	33374 ± 975	23593 ± 718	8554 ± 174	1134 ±88	82 ± 5
4	20	sacarosa	4130 ± 28	2463 ± 134	1197 ± 15	441 ± 76	26 ± 14
1	150	sacarosa	21362 ± 600	14928 ± 192	5420 ± 648	907 ± 124	101 ± 20
2	150	trehalosa	35948 ± 1900	24189 ± 2258	9257 ± 252	**2416 ± 609**	70 ± 13
3	150	sacarosa/ Arg	67603 ± 1743	49362 ± 2758	12381 ± 154	**4303 ± 282**	1243 ± 560
4	20	sacarosa	**48163 ± 2420**	31446 ± 950	**15394 ± 1356**	1240 ± 126	83 ± 13

Cuando las muestras de MOR6654B se almacenan a 25 °C durante dos meses, se produce un incremento en las partículas subvisibles en todas las formulaciones, aunque el incremento en la formulación 1 es muy pequeño (Tabla 43). Para la formulación 1, se produce únicamente un incremento moderado en las partículas de 5 a 10 um de tamaño. Por lo demás, no se produce virtualmente ningún cambio. Sin embargo, se produce un incremento considerable en todas las demás formulaciones, especialmente en los intervalos de tamaños de 2 a 25 um. En particular, las formulaciones 3 y 4 muestran incrementos significativos en la mayoría de franjas de intervalos de tamaños.

Para las formulaciones de MOR6654B almacenadas a 4 °C durante dos meses, se observa un cambio pequeño en los niveles de partículas subvisibles. La formulación 1 muestra únicamente un incremento pequeño en las partículas de 5-10 mm, con una reducción ligera en todos los demás intervalos de tamaños. La formulación 2 muestra únicamente incrementos pequeños a lo largo de los diferentes intervalos de tamaños, mientras que la formulación 3 presenta reducciones pequeñas en los niveles globales de partículas. En comparación, la formulación 4, que empezó con una carga de partículas subvisibles muy baja (apenas por encima de la del agua pura), muestra un incremento significativo en las partículas por mL en todos los intervalos de tamaños.

Cuando las formulaciones de MOR6654B se someten a las condiciones de estrés de agitación, ciclos de F/T y exposición a la luz, se producen grandes incrementos únicamente para las muestras de fotoestabilidad (Tabla 44). Tanto la agitación como los ciclos de F/T provocan únicamente incrementos de pequeños a moderados en los niveles de partículas, especialmente si se ignoran las partículas por debajo de 2 um. Por otro lado, una exposición prolongada a la luz provoca que la formación de partículas subvisibles se incremente considerablemente (Tabla 44). Esto se confirma particularmente para las formulaciones 3 y 4. En comparación, la formulación 1 casi no muestra ningún cambio en la carga global de partículas subvisibles.

Tabla 44. Contenido subvisible (en partículas/mL) tal como se mide utilizando MFI para las formulaciones de MOR6654B sometidas a estrés de agitación (en negrita), ciclos múltiples de F/T (en *cursiva*) y exposición prolongada a la luz (subrayado). Los valores indicados para t0 son promedios ± una desviación estándar.
His (histidina); P20 (polisorbato 20); Arg (arginina)

Form N.º	[proteína] mg/mL	Excipientes	total	1-2 um	2-5 um	5-10 um	10-25 um
1	150	sacarosa/PS20/His	24137 ± 486	18257 ± 391	4968 ± 33	518 ± 6	78 ± 16
2	150	trehalosa/PS20/His	12614 ± 660	9580 ± 661	2298 ± 64	568 ± 47	148 ± 10
3	150	sacarosa/Arg/PS20/His	33374 ± 975	23593 ± 718	8554 ± 174	1134 ±88	82 ± 5
4	20	sacarosa/PS20/His	4130 ± 28	2463 ± 134	1197 ± 15	441 ± 76	26 ± 14
1	**150**	**sacarosa/PS20/His**	**22306**	**14913**	**6288**	**1071**	**33**
2	**150**	**trehalosa/PS20/His**	**35220**	**21637**	**9932**	**3345**	**301**
3	**150**	**sacarosa/Arg/PS20/His**	**26857**	**16889**	**7264**	**2428**	**220**
4	**20**	**sacarosa/PS20/His**	**10528**	**6511**	**3355**	**576**	**85**
1	*150*	*sacarosa/PS20/His*	*35027*	*26159*	*7278*	*1343*	*226*
2	*150*	*trehalosa/PS20/His*	*23502*	*17580*	*4856*	*979*	*89*
3	*150*	*sacarosa/Arg/PS20/His*	*21686*	*15257*	*5256*	*1104*	*66*
4	*20*	*sacarosa/PS20/His*	*9667*	*6078*	*2198*	*1340*	*45*
1	150	sacarosa/PS20/His	25417	18711	5723	864	102
2	150	trehalosa/PS20/His	29238	22107	6160	823	147
3	150	sacarosa/Arg/PS20/His	186398	167017	16314	2790	270
4	20	sacarosa/PS20/His	46159	29359	14428	1224	131

Colorimetría

El último método analítico que se utilizó en este estudio de estabilidad fue la colorimetría. En t0, las cuatro formulaciones presentan todas ellas un color marrón (Tabla 45), con una intensidad de color ligeramente diferente para la formulación más diluida (formulación 4). La incubación a 40 °C durante uno o dos meses conduce a un pequeño cambio en el color, aunque la formulación 4 muestra ciertos cambios menores (Tabla 45). Cuando se almacenan a temperaturas más bajas, se produce un cambio pequeño en el color, si es que se produce (Tabla 46). Cuando se someten a cualquiera de las condiciones de estrés, el color también se mantiene igual (Tabla 47).

Tabla 45. Color de las formulaciones de MOR6654B almacenadas a 40 °C durante un periodo de hasta dos meses

Form N.º	**[proteína] mg/mL**		**t0**		**t1**		**t2**	
1	150	sacarosa	B6	B7	B6	B6	B6	B6
2	150	trehalosa	B7	B7	B7	B6	B6	B6
3	150	sacarosa/Arg	B6	B6	B6	B6	B6	B6

4	20	sacarosa	B8	B8	BY7	BY7	B7	B6

Tabla 46: Color de las formulaciones de MOR6654B almacenadas a 4 °C y 25 °C durante cero y dos meses

Form N.º	**[proteína] mg/mL**		**t0**		**t2 4 °C**		**t2 25 °C**	
1	150	sacarosa	B6	B7	B7	B7	B6	B6
2	150	trehalosa	B7	B7	B7	B7	B7	B7
3	150	sacarosa/Arg	B6	B6	B6	B6	B6	B6
4	20	sacarosa	B8	B8	B8	B9	B8	B8

Tabla 47. Color de las formulaciones de MOR6654B sometidas a estrés de agitación (agit), ciclos múltiples de F/T (F/T) y exposición prolongada a la luz (foto).

Form N.º	**[proteína] mg/mL**		**t0**		**agit**		**F/T**		**foto**	
1	150	sacarosa	B6	B7	B7	B7	B6	B7	B6	B6
2	150	trehalosa	B7	B7	B7	B7	B7	B7	B6	B6
3	150	sacarosa/Arg	B6	B6	B6	B6	B6	B6	B6	B6
4	20	sacarosa	B8	B8	B8	B8	B8	B8	B7	B7

COMPENDIO

Se utilizaron una amplia gama de métodos analíticos biofísicos y bioquímicos para determinar si existían diferencias entre las formulaciones en cuanto a su estabilidad. Entre las formulaciones seleccionadas para el segundo cribado, se observó poca diferencia utilizando muchas de las técnicas analíticas. Únicamente el almacenamiento a 40 °C y la exposición prolongada a la luz provocaron cierta cantidad significativa de degradación. Aunque las cuatro formulaciones fueron muy similares en cuanto a su perfil de estabilidad, la formulación 1 (150 mg/mL de MOR6654B, sacarosa 220 mM, histidina 20 mM, polisorbato 20 al 0.04%, pH 6.0) mostró la menor propensión a degradarse en general tal como se determinó con esta batería de métodos analíticos. La formulación 1 fue más estable en condiciones de estrés térmico y luminoso, menos propensa a la degradación y además fue más estable en cuanto a la formación de partículas en el intervalo subvisible.

Lista de secuencias

<110> Novartis AG
<120> Formulación de anticuerpos
<130> PAT055133A
<150> US 61/658,472
<151> 2012-06-12
<160> 15
<170> PatentIn versión 3.5
<210> 1
<211> 124
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 1

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1               5                   10                  15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
            20                  25                  30

Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
        35                  40                  45

Trp Leu Gly Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Ser Tyr Ala
    50                  55                  60

Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65                  70                  75                  80

Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
                85                  90                  95

Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Trp Val Pro Lys Ile Gly Val Phe Asp
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 2
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 2

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Ser Pro
85 90 95

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

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 3

Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn Ser Ala Ala Trp Gly
1 5 10

<210> 4
<211> 18
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 4

Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Ser Tyr Ala Val Ser Val
1 5 10 15

Lys Ser

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 5

Tyr Asp Trp Val Pro Lys Ile Gly Val Phe Asp Ser
1 5 10

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 6

Arg Ala Ser Gln Phe Ile Ser Ser Ser Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 7
<211> 7
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 7

```
Gly Ser Ser Ser Arg Ala Thr
1               5
```

<210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 8

```
Gln Gln Leu Tyr Ser Ser Pro Met Thr
1               5
```

<210> 9
<211> 454
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 9

```
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln
1               5                   10                  15


Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn
            20                  25                  30


Ser Ala Ala Trp Gly Trp Ile Arg Gln Ser Pro Gly Arg Gly Leu Glu
        35                  40                  45


Trp Leu Gly Arg Ile Tyr Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr Asn Ser Tyr Ala
    50                  55                  60


Val Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn
65                  70                  75                  80


Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Pro Glu Asp Thr Ala Val
                85                  90                  95
```

```
Tyr Tyr Cys Ala Arg Tyr Asp Trp Val Pro Lys Ile Gly Val Phe Asp
            100                 105                 110

Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        115                 120                 125

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
    130                 135                 140

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145                 150                 155                 160

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190

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

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
    210                 215                 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
                245                 250                 255

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
            260                 265                 270

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
        275                 280                 285

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

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305                 310                 315                 320

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
                325                 330                 335

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
            340                 345                 350
```

```
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
        355                 360                 365

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
    370                 375                 380

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385                 390                 395                 400

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

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
            420                 425                 430

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
        435                 440                 445

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 10
<211> 215
<212> PRT
<213> Homo sapiens
<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Phe Ile Ser Ser Ser
            20                  25                  30

Tyr Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35                  40                  45

Ile Tyr Gly Ser Ser Ser Arg Ala Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
    50                  55                  60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu
65                  70                  75                  80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Leu Tyr Ser Ser Pro
                85                  90                  95

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

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

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

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

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

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

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

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 11
<211> 372
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 11

```
caggtgcagc tgcagcagag cggcccaggc ctggtcaagc cctctcagac cctgtcactg       60

acctgcgcca tttcaggcga cagcgtgagc agcaacagcg ccgcctgggg ctggatcagg      120

cagagccccg gtaggggcct ggaatggctg ggcaggatct actacaggtc caagtggtac      180

aacagctacg ccgtgagcgt gaagagcagg atcaccatca accctgacac cagcaagaac      240

cagttctcac tgcagctcaa cagcgtgacc cccgaggaca ccgccgtgta ctactgcgcc      300

agatacgact gggtgcccaa gatcggcgtg ttcgacagct ggggccaggg caccctggtg      360

accgtgtcaa gc                                                          372
```

<210> 12
<211> 324
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 12

```
gatatcgtgc tgacacagag ccccgccacc ctgagcctga gcccaggcga gagggccacc       60

ctgtcctgca gggccagcca gtttatcagc agcagctacc tgtcctggta tcagcagaag      120

cccggccagg cccctagact gctgatctac ggcagctcct ctcgggccac cggcgtgccc      180

gccaggttca gcggcagcgg ctccggcacc gacttcaccc tgacaatcag cagcctggag      240

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagctgtaca gctcacccat gaccttcggc      300

cagggcacca aggtggagat caag                                             324
```

<210> 13
<211> 184
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

```
Met Arg Arg Gly Pro Arg Ser Leu Arg Gly Arg Asp Ala Pro Ala Pro
1               5                  10                  15

Thr Pro Cys Val Pro Ala Glu Cys Phe Asp Leu Leu Val Arg His Cys
            20                  25                  30

Val Ala Cys Gly Leu Leu Arg Thr Pro Arg Pro Lys Pro Ala Gly Ala
        35                  40                  45

Ser Ser Pro Ala Pro Arg Thr Ala Leu Gln Pro Gln Glu Ser Val Gly
    50                  55                  60

Ala Gly Ala Gly Glu Ala Ala Leu Pro Leu Pro Gly Leu Leu Phe Gly
65                  70                  75                  80

Ala Pro Ala Leu Leu Gly Leu Ala Leu Val Leu Ala Leu Val Leu Val
                85                  90                  95

Gly Leu Val Ser Trp Arg Arg Arg Gln Arg Arg Leu Arg Gly Ala Ser
            100                 105                 110

Ser Ala Glu Ala Pro Asp Gly Asp Lys Asp Ala Pro Glu Pro Leu Asp
        115                 120                 125

Lys Val Ile Ile Leu Ser Pro Gly Ile Ser Asp Ala Thr Ala Pro Ala
    130                 135                 140

Trp Pro Pro Pro Gly Glu Asp Pro Gly Thr Thr Pro Pro Gly His Ser
145                 150                 155                 160

Val Pro Val Pro Ala Thr Glu Leu Gly Ser Thr Glu Leu Val Thr Thr
                165                 170                 175

Lys Thr Ala Gly Pro Glu Gln Gln
            180
```

<210> 14
<211> 1419
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 14

```
atggcctggg tgtggaccct gcccttcctg atggccgctg cccagtcagt gcaggcccag       60

gtgcagctgc agcagagcgg cccaggcctg gtcaagccct ctcagaccct gtcactgacc      120

tgcgccattt caggcgacag cgtgagcagc aacagcgccg cctggggctg gatcaggcag      180

agccccggta ggggcctgga atggctgggc aggatctact acaggtccaa gtggtacaac      240

agctacgccg tgagcgtgaa gagcaggatc accatcaacc ctgacaccag caagaaccag      300

ttctcactgc agctcaacag cgtgaccccc gaggacaccg ccgtgtacta ctgcgccaga      360

tacgactggg tgcccaagat cggcgtgttc gacagctggg gccagggcac cctggtgacc      420

gtgtcaagcg ccagcaccaa gggccccagc gtgttccccc tggcccccag cagcaagagc      480

accagcggcg gcacagccgc cctgggctgc ctggtgaagg actacttccc cgagcccgtg      540

accgtgtcct ggaacagcgg agccctgacc tccggcgtgc acaccttccc cgccgtgctg      600

cagagcagcg gcctgtacag cctgtccagc gtggtgacag tgcccagcag cagcctgggc      660

acccagacct acatctgcaa cgtgaaccac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga      720

gtggagccca agagctgcga caagacccac acctgccccc cctgcccagc cccagagctg      780

ctgggcggac cctccgtgtt cctgttcccc cccaagccca aggacaccct gatgatcagc      840

aggacccccg aggtgacctg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaggaccc agaggtgaag      900

ttcaactggt acgtggacgg cgtggaggtg cacaacgcca agaccaagcc cagagaggag      960

cagtacaaca gcacctacag ggtggtgtcc gtgctgaccg tgctgcacca ggactggctg     1020

aacggcaagg aatacaagtg caaggtctcc aacaaggccc tgccagcccc catcgaaaag     1080

accatcagca aggccaaggg ccagccacgg gagccccagg tgtacaccct gccccctcc      1140

cgggaggaga tgaccaagaa ccaggtgtcc ctgacctgtc tggtgaaggg cttctacccc     1200

agcgacatcg ccgtggagtg ggagagcaac ggccagcccg agaacaacta caagaccacc     1260

cccccagtgc tggacagcga cggcagcttc ttcctgtaca gcaagctgac cgtggacaag     1320

tccaggtggc agcagggcaa cgtgttcagc tgcagcgtga tgcacgaggc cctgcacaac     1380

cactacaccc agaagagcct gagcctgtcc cccggcaag                            1419
```

<210> 15
<211> 705
<212> ADN
<213> Homo sapiens
<400> 15

```
atgagcgtgc tgacccaggt gctggctctg ctgctgctgt ggctgaccgg caccagatgc       60

gatatcgtgc tgacacagag ccccgccacc ctgagcctga gcccaggcga gagggccacc      120
```

```
ctgtcctgca gggccagcca gtttatcagc agcagctacc tgtcctggta tcagcagaag      180

cccggccagg cccctagact gctgatctac ggcagctcct ctcgggccac cggcgtgccc      240

gccaggttca gcggcagcgg ctccggcacc gacttcaccc tgacaatcag cagcctggag      300

cccgaggact tcgccgtgta ctactgccag cagctgtaca gctcacccat gaccttcggc      360

cagggcacca aggtggagat caagcgtacg gtggccgctc ccagcgtgtt catcttcccc      420

cccagcgacg agcagctgaa gagcggcacc gccagcgtgg tgtgcctgct gaacaacttc      480

taccccccgg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaacg ccctgcagag cggcaacagc      540

caggagagcg tcaccgagca ggacagcaag gactccacct acagcctgag cagcaccctg      600

accctgagca aggccgacta cgagaagcat aaggtgtacg cctgcgaggt gacccaccag      660

ggcctgtcca gccccgtgac caagagcttc aacaggggcg agtgc                      705
```

REIVINDICACIONES

1. Una composición acuosa que tiene un pH de 6.0 y que comprende

(i) un anticuerpo anti-BAFFR no fucosilado donde el anticuerpo tiene una concentración de 150 mg/mL y donde dicho anticuerpo anti-BAFFR comprende una región de la cadena pesada de SEQ ID NO: 9 y una región de la cadena ligera de SEQ ID NO: 10,

(ii) sacarosa 220 mM como estabilizante,

(iii) histidina 20 mM como agente tamponante y

(iv) polisorbato 20 al 0.04% como surfactante.

2. Un dispositivo de suministro que comprende la composición acuosa de acuerdo con la reivindicación 1.

3. Una jeringa prerrellenada que comprende la composición acuosa de acuerdo con la reivindicación 1.

4. La composición acuosa de acuerdo con la reivindicación 1, o el dispositivo de suministro de la reivindicación 2, o la jeringa prerrellenada de la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento de una enfermedad autoinmunitaria.

5. La composición acuosa de acuerdo con la reivindicación 1, o el dispositivo de suministro de la reivindicación 2, o la jeringa prerrellenada de la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento de una neoplasia de linfocitos B tal como linfoma, leucemia o mieloma.

6. La composición acuosa de acuerdo con la reivindicación 1, o el dispositivo de suministro de la reivindicación 2, o la jeringa prerrellenada de la reivindicación 3, para su uso en el tratamiento de artritis reumatoide, lupus eritematoso sistémico, esclerosis múltiple, síndrome de Sjögren, hepatitis activa crónica o pénfigo vulgar.