(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 763 309**

(51) Int. Cl.:

A61K 9/00	(2006.01)
A61K 9/08	(2006.01)
A61K 47/26	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01)
C07K 16/28	(2006.01)
A61K 47/12	(2006.01)
A61K 47/18	(2007.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **05.02.2016 PCT/EP2016/052494**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.08.2016 WO16128318**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **05.02.2016 E 16703297 (8)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **02.10.2019 EP 3256154**

(54) Título: **Formulación farmacéutica que comprende anticuerpos**

(30) Prioridad:

09.02.2015 EP 15154301

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
28.05.2020

(73) Titular/es:

UCB BIOPHARMA SRL (100.0%)
Allé de la Recherche 60
1070 Brussels, BE

(72) Inventor/es:

BOONEN, MICHAEL JOSEPH EDOUARD y PEERBOOM, CLAUDE

(74) Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 763 309 T3

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

DESCRIPCIÓN

Formulación farmacéutica que comprende anticuerpos

Campo de la invención.

La presente invención pertenece a la campo de las formulaciones farmacéuticas. Más específicamente, se refiere a una formulación farmacéutica que comprende una proteína tal como un anticuerpo.

Antecedentes de la invención.

Los anticuerpos, como otras proteínas terapéuticas, son moléculas grandes y complejas, y son inherentemente inestables cuando se almacenan durante un período de tiempo, tanto químicamente como físicamente, resultando en potencia una reducción o una pérdida de actividad. La inestabilidad química típica puede traer como consecuencia la desamidación, hidrólisis, oxidación, eliminación beta o intercambios de disulfuro. La inestabilidad física puede acarrear desnaturalización, agregación o precipitación.

Por tanto, para el almacenamiento, transporte, manejo y administración, las formulaciones farmacéuticas de anticuerpos y otras proteínas tienen que minimizar cualquiera de los fenómenos anteriores. Los anticuerpos pueden ser formulados en forma liofilizada, es decir, secados por congelación, para la reconstitución en un disolvente poco antes de su administración, o los anticuerpos pueden ser formulados en forma líquida, tal como en disolución acuosa. Las formulaciones liofilizadas de anticuerpos tienden a ser más estables ya que o el agua es un reactivo o, como disolvente, facilita la transferencia de las sustancias reaccionantes y es por lo tanto crítico para muchas rutas de degradación química que conducen a la inestabilidad de la proteína (Andya, J. D., Hsu, C. C., y Shire, S. J. (2003). “Mecanismos de formación de agregados y estabilización de excipientes de carbohidratos de formulaciones de anticuerpos monoclonales humanizados liofilizados”. AAPS. PharmSci. 5, E10). Sin embargo, a pesar de la tendencia a ser menos estable, el interés se ha centrado recientemente en formulaciones líquidas de anticuerpos y otras proteínas, ya que estas son más fáciles y prácticas de manejar y administrar para el paciente y para el profesional médico en comparación con las formulaciones liofilizadas. Las formulaciones líquidas no necesitan ser reconstituidas y pueden ser administradas con una preparación mínima. Sin embargo, la estabilización de proteínas en formulaciones líquidas para evitar o minimizar reacciones no deseadas, tales como la agregación, la precipitación o la degradación, sigue constituyendo un desafío especial. Las moléculas de proteína individuales se pegan unas a otras físicamente con el resultado, por ejemplo, de la formación de materia insoluble o precipitado, que puede dejar de ser activo e incluso causa reacciones inmunológicas no deseadas al administrarlo. Además, un problema importante causado por la formación de agregados es que, durante la administración, la formulación farmacéutica puede bloquear jeringas o bombas.

Las rutas físicas de degradación sugeridas para la formación de agregados y partículas se describen a menudo como resultantes de una combinación de efectos de estabilidad conformacionales y coloidales. La estabilidad conformacional es la diferencia de energía libre entre el estado nativo plegado y el estado desplegado bajo condiciones fisiológicas, y como tal mide la propensión de un anticuerpo a desplegarse. El despliegue a menudo es responsable de la tasa de agregación global. La estabilidad coloidal se refiere a la propensión a la auto-repulsión de las moléculas en estado nativo, debido principalmente a cargas no específicas ubicadas en el área superficial de la molécula.

La agregación y degradación de la proteína durante un plazo largo de almacenamiento se evalúan generalmente determinando los niveles de especies de alto peso molecular (HMWS) presentes en la formulación después de un período de almacenamiento dado, típicamente usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). A veces, estos eventos pueden dar como resultado una precipitación que es visible para el observador.

Para que sean útiles, las formulaciones farmacéuticas líquidas de anticuerpos y otros terapéuticos proteínicos necesitan ser estables a largo plazo, y minimizar las anteriores reacciones con el fin de contener la cantidad correcta de ingrediente farmacéutico en forma activa.

En consecuencia, se han explorado en la técnica varios estabilizantes para ayudar a disminuir las tasas de degradación de los anticuerpos a través de un mecanismo de exclusión preferido, que da lugar a una capa de exceso de agua que rodea al anticuerpo y obliga a la proteína a adquirir un estado más compacto para minimizar el área de su superficie. Los estabilizantes incluyen ciertos azúcares, polioles, aminoácidos, sales y polímeros tales como el polietilenglicol. Generalmente se elige un estabilizante preferido para una formulación dada, aunque ocasionalmente se puede usar una combinación de estabilizantes.

Típicamente se han empleado estabilizantes de aminoácidos en formulaciones líquidas de anticuerpos para inyección, como alternativa a los azúcares, y generalmente se han formulado a un pH menor para optimizar la estabilidad del anticuerpo. Además, la glicina es una opción frecuente de agente de volumen en productos liofilizados en los que son necesarios compuestos cristalizables, para actuar proporcionando la textura adecuada así como para evitar problemas de volumen aparente y de consistencia con la formulación, tales como el colapso durante el proceso de secado primario. Un agente de volumen cristalino aumentaría como carga que aumenta la densidad del producto sólido y evita cualquier riesgo de pérdida de estructura. Un agente de volumen cristalino también proporciona composiciones densas homogéneas, es fácil de reconstituir y tiene una elevada temperatura eutéctica que permite una alta temperatura de

sublimación durante el secado principal del proceso de liofilización. En este contexto se utiliza glicina debido a sus propiedades de cristalización, es decir crioprotectoras, si bien una vez cristalizada deja de tener la capacidad de estabilización, y por ello a tal formulación se le añade otro agente estabilizante.

La elección de estabilizante está también afectada por sus respectivos perfiles de riesgo, tales como los posibles efectos sobre la glucosa en sangre y su efecto sobre la función renal. Respecto a esto, cuando es administrada a través de una inyección intravenosa, la sacarosa no puede hidrolizarse y por lo tanto no afecta a los niveles de glucosa en sangre. Sin embargo, los productos de anticuerpos intravenosos se han asociado con la disfunción renal, la insuficiencia renal aguda y la nefrosis osmótica, en donde las formulaciones estabilizadas con azúcar, y en particular la sacarosa, presentan el más alto riesgo de insuficiencia renal aguda debido a la nefrosis osmótica. La sacarosa es un disacárido compuesto por los monosacáridos glucosa y fructosa, y, en comparación con otros osmolitos orgánicos, la sacarosa es un estabilizante de proteínas de fuerza intermedia (Street T.O. et al., “Un mecanismo molecular para la estabilidad de proteínas inducida por osmolitos”. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2006; 103 (38): 13997-14002).

Además, las formulaciones contienen normalmente excipientes adicionales tales como agentes tampón, agentes tensioactivos o agentes de volumen (presentes típicamente en formulaciones liofilizadas).

El documento US 8.632.778 describe una formulación líquida que contiene un anticuerpo PM-1 humanizado en un tampón de histidina que contiene glicina y está libre de azúcar.

El documento US 2004/0033228 describe una formulación líquida que comprende un anticuerpo, manitol y polisorbato en un tampón de citrato o fosfato.

El documento US 6.372.716 describe una formulación liofilizada que contiene factor IX en un tampón de histidina que contiene glicina y sacarosa.

El documento WO 2013/087699 describe un anticuerpo que se une al receptor CSF1R humano.

Aunque los anticuerpos tienen una estructura global parecida, difieren en la composición de aminoácidos y en su patrón de glicosilación, así como posibles modificaciones post-traduccionales tales como variantes de carga y glicosilación. Estas diferencias pueden tener como resultado interacciones alteradas con otros componentes que afectarán a la estabilidad a largo plazo de la formulación resultante, que por consiguiente también requerirá optimización.

Con la tendencia al aumento de la concentración de proteína en las formulaciones, para permitir volúmenes de administración más bajos, los problemas relativos a la agregación y precipitación de proteínas se hacen más evidentes. Teniendo en cuenta lo anterior, en la técnica sigue habiendo necesidad de proporcionar formulaciones farmacéuticas líquidas de anticuerpos aún más mejoradas con agregación y precipitación reducida de proteína después de un almacenamiento prolongado.

Descripción detallada de la invención.

La presente invención se dirige a la necesidad anteriormente identificada de proporcionar una formulación líquida novedosa que comprende una proteína terapéutica de acuerdo con las reivindicaciones como ingrediente activo, en particular un anticuerpo. Ahora se ha observado sorprendentemente un efecto de estabilización diferencial entre estabilizantes con respecto a la aparición de agregados solubles en comparación con los grandes agregados (precipitados) insolubles de una formulación líquida farmacéutica. Este sorprendente hallazgo ha llevado a una nueva formulación farmacéutica que presenta una agregación y precipitación de proteínas reducidas después del almacenamiento a largo plazo. La invención proporciona una formulación líquida que comprende un anticuerpo de unión específicamente a CSF1R como ingrediente activo.

En una primera realización la invención proporciona una formulación líquida farmacéutica que comprende un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones como ingrediente activo, glicina y sacarosa.

En una segunda realización la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con la primera realización de la invención comprende glicina en una concentración de 20 mM a 200 mM. En otra realización de la formulación líquida farmacéutica de la invención la concentración de glicina es de 50 mM a 200 mM, de 75 mM a 175 mM, preferiblemente de 100 mM a 150 mM, o 125 mM.

En una tercera realización la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con la primera o la segunda realización de la invención comprende sacarosa en una concentración de 20 mM a 200 mM. En otra realización de la formulación líquida farmacéutica de la invención, la concentración de sacarosa es de 50 mM a 200 mM, de 75 mM a 175 mM, preferiblemente de 100 mM a 150 mM, o 125 mM.

En una cuarta realización la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención comprende al menos 50 mg/mL de anticuerpo, preferiblemente de 50 mg/mL a 300 mg/mL, o de 50 mg/mL a 250 mg/mL, o de 50 mg/mL a 200 mg/mL, o de 50 mg/mL a 150 mg/mL, o de 50 mg/mL a 100 mg/mL.

En otra realización en particular, la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de

realización de la invención comprende de 40 mg/mL a 80 mg/mL de anticuerpo, alternativamente de 40 mg/mL a 60 mg/mL de anticuerpo.

En una quinta realización la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención comprende adicionalmente un agente tensioactivo. El experto en la técnica es consciente de la elección de los tensioactivos disponibles para el uso de la formulación líquida de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención tales como, pero sin ser limitantes, polisorbato 80, polisorbato 20, lecitina, poloxámero (por ejemplo, poloxámero 188), dodecil sulfato sódico (SDS), lauril sulfato sódico, octil glucósido sódico, lauril-, miristil-, linoleil-, o estearil- sulfobetaína, lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina, linoleil -, miristil -, o cetil-betaína, lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil-, o isostearamido propil-betaína, miristamidopropil-, palmidopropil-, o isostearamidopropil-dimetilamina, metil cocoil sódico, o metil oleil-taurato disódico, polietil glicol, polipropil glicol, y copolímeros de etilen y propilenglicol. En una realización particular adicional de la invención, la formulación líquida farmacéutica comprende Polisorbato 80.

En una sexta realización, la formulación líquida de la invención comprende 0,01% a 10% de Polisorbato 80. La cantidad de tensioactivo se puede ajustar de acuerdo con la proteína en particular y el contenido de la formulación. Por lo tanto, en otra realización, la formulación de la invención comprende de 0,01% a 5% de Polisorbato 80, de 0,01 a 1% de Polisorbato 80, de 0,01 a 0,1% de Polisorbato 80, preferiblemente de 0,02 a 0,1%, o 0,05% de Polisorbato 80.

La formulación líquida farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención puede contener un agente tampón para mantener un pH constante durante el almacenamiento y la administración. Hay muchos agentes tampón utilizados en el campo de las formulaciones líquidas farmacéuticas tales como, pero sin ser limitantes, citrato, fosfato, lactato, histidina, glutamato, maleato, tartrato, o succinato. Un especie de tampón preferido se selecciona típicamente entre los que tienen un pKa que es próximo (± 1 unidad de pH) al pH preferido para una óptima estabilidad de la proteína con el fin de mantener una alta capacidad de tamponamiento, y se asocian con la máxima estabilidad demostrada observada para una proteína particular cuando se pone en una serie de especies tampón variadas. Los márgenes de pH adecuados de una formulación se eligen generalmente a partir de los asociados con la máxima estabilidad demostrada observada para una determinada proteína cuando se pone en una serie de formulaciones diversas de pH.

En una determinada realización de la invención, la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención comprende citrato, preferentemente un citrato de concentración de 10 mM a 100 mM, 10 mM a 80 mM, 10 mM a 60 mM, 25 mM de 60 mM, preferiblemente 40 mM a 60 mM, o 50 mM.

En otra realización en particular, la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención tiene un pH de 4 a 7, preferiblemente de 4 a 6, preferiblemente de 4,5 a 5,5, o 5.

En la séptima realización de la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención, el anticuerpo se une específicamente al receptor del factor-1 estimulante de colonias (CSF1R).

En una octava realización de la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las realizaciones de la invención, el CSF1R humano se une específicamente.

En una novena realización de la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención, el anticuerpo neutraliza el CSF1R.

En una décima realización de la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención, el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o humano.

En una undécima realización de la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención, el anticuerpo comprende (a) una cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 como se define en la SEQ ID NO: 1, SEC ID NO: 2 y SEC ID NO: 3, respectivamente, y (b) una cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 como se define en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

En una duodécima realización de la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención, el anticuerpo comprende una cadena ligera variable como se define en la SEQ ID NO: 7 o 8, y una cadena pesada variable como se define en la SEQ ID NO: 11 o 12.

En otra realización de la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención, el anticuerpo comprende una cadena ligera como se define en la SEQ ID NO: 9 o 10 y una cadena pesada como se define en la SEQ ID NO: 13 o 14.

En una decimotercera realización, la formulación líquida farmacéutica de la invención comprende de 40 mM a 60 mM de tampón de citrato a pH 5, de 100 mM a 150 mM glicina, de 100 mM a 150 mM de sacarosa y de 0,02% a 0,1% de polisorbato 80.

En otra realización particular la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con la invención comprende al menos 50 mg/mL de anticuerpo, 50 mM de tampón citrato a pH 5, 125 mM de glicina, 125 mM de sacarosa y 0,05% de polisorbato

80, en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-CSF1R .

En otro modo de realización de la formulación líquida farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención, una formulación farmacéutica estable exhibe un incremento igual o menor que el 10%, preferiblemente igual o menor que el 5%, más preferiblemente igual o menor que el 3,5% en especies de peso molecular elevado (HMWS) medido después de tres meses de almacenamiento a aproximadamente 35 °C. Alternativamente, una formulación farmacéutica estable exhibe un incremento igual o menor que 1,2%, preferiblemente igual o menor que 1,05%, en especies de alto peso molecular (HMWS) en cada caso medido después de 3 meses de almacenamiento a aproximadamente 25 °C. Preferiblemente, la cantidad de HMWS en la formulación se mide preferiblemente mediante cromatografía de exclusión por tamaño.

El alcance de la invención está definido por las reivindicaciones. Cualquier mención de los métodos de tratamiento en la descripción se refiere a los compuestos, composiciones farmacéuticas y medicamentos de la presente invención para uso en un método para el tratamiento del cuerpo humano (o animal) por la terapia (o para diagnóstico).

En otra realización, la invención proporciona un método para tratar un mamífero, en concreto un sujeto humano, que comprende administrar una cantidad terapéuticamente efectiva de la formulación farmacéutica líquida de cualquiera de las realizaciones descritas en el presente documento, que comprende un anticuerpo de acuerdo con las reivindicaciones, que se une específicamente a CSF1R, tales como un anticuerpo que tiene una cadena ligera como se define en la SEQ ID NO: 9 o 10 y una cadena pesada como se define en la SEQ ID NO: 13 o 14, como ingrediente activo a un mamífero, particularmente un sujeto humano, en el que el mamífero, en particular un sujeto humano, tiene un trastorno que puede ser mejorado mediante el tratamiento con tal anticuerpo que se une específicamente a CSF1R, en el que el trastorno es cáncer, tal como por ejemplo, la leucemia y el linfoma no Hodgkin, leucemia linfoblástica aguda, leucemia mieloide aguda del adulto, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, astrocitoma, carcinoma de células basales, cáncer del conducto biliar, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, tal como osteosarcoma e histiocitoma fibroso maligno, glioma, ependimoma, meduloblastoma, cáncer de mama, adenomas bronquiales, cáncer cervical, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer de esófago, familia de tumores de Ewing, tumor de células germinales extracraneales, tumor de células germinales extragonadales, cáncer de conducto biliar extrahepático, retinoblastoma, cáncer de la vesícula biliar, cáncer gástrico (cáncer de estómago), tumor carcinoide gastrointestinal, tumor estromal gastrointestinal (GIST), tumor de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular (hígado), linfoma, tal como linfoma de Hodgkin, linfoma de Burkitt, linfoma de células T cutáneas, tales como micosis fungoides y síndrome de Sezary, cáncer de hipofaringe, melanoma, tal como melanoma intraocular, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón (células renales), cáncer de laringe, cáncer de labios y cavidad oral, cáncer de pulmón, tal como cáncer de pulmón de células no pequeñas o cáncer de pulmón de células pequeñas, macroglobulinemia de Waldenstrom, carcinoma de células de Merkel, mesotelioma, cáncer de boca, mieloma múltiple, síndromes mielodisplásicos, cáncer nasofaríngeo, neuroblastoma, cáncer orofaríngeo, cáncer de ovarios, cáncer de páncreas, cáncer paratiroideo, cáncer de pene, cáncer faríngeo, feocromocitoma, pineoblastoma y tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales, tumor de la pituitaria, neoplasia de células plasmáticas, blastoma pleuropulmonar, cáncer de próstata, cáncer rectal, rabdomiosarcoma, cáncer de glándula salival, sarcoma, cáncer testicular, cáncer de garganta, timoma, cáncer de tiroides, cáncer uretral, o tumor de Wilms.

En otra realización más, el trastorno que puede ser mejorado a través del tratamiento con un anticuerpo de unión específica a CSF1R es una enfermedad fibrótica, tal como por ejemplo fibrosis pulmonar tal como fibrosis pulmonar idiopática y fibrosis quística, fibrosis renal, incluyendo atrofia tubular y fibrosis intersticial, fibrosis hepática, cirrosis hepática, colangitis esclerosante primaria, cirrosis biliar primaria, fibrosis endomiocárdica, fibrosis mediastinal, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, enfermedad de Crohn, queloides, infarto de miocardio, esclerodermia, esclerosis sistémica y artofibrosis.

La formulación líquida farmacéutica de la invención es adecuadamente administrada al paciente en un tiempo o durante una serie de tratamientos y puede ser administrada al paciente en cualquier momento desde el diagnóstico en adelante; puede ser administrada como único tratamiento o conjuntamente con otros fármacos o terapias útiles en el tratamiento de las condiciones como se describió anteriormente en el presente documento.

La molécula de anticuerpo puede ser el único ingrediente activo de la composición líquida farmacéutica. Alternativamente, el anticuerpo puede ser administrado en combinación, por ejemplo simultáneamente, secuencialmente o por separado, con uno o más de otros ingredientes terapéuticamente activos. En consecuencia, la molécula de anticuerpo en la composición farmacéutica líquida puede estar acompañada de otros ingredientes activos que incluyen otros ingredientes de anticuerpos, por ejemplo la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, HER-2), receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR), anticuerpos del receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (PDGFR), o ingredientes no anticuerpo tales como imatinib, dasatinib, nioltinib, basutinib, gefitinib, erlotinib, temsirolimus, vandetanib, vemurafenib, crizotinib, vorinostat, romidepsin, bortezomib, sorafenib, sunitinib, pazopanib, regorafenib, cabozantinib, perfenidone, esteroides u otras moléculas farmacológicas. En una realización específica, la composición líquida farmacéutica de la invención comprende un anticuerpo de unión específicamente a CSF1R como primer ingrediente activo, y adicionalmente comprende un segundo ingrediente activo.

El ingrediente activo como se emplea aquí se refiere a un ingrediente con efecto farmacológico, tal como un efecto terapéutico, a una dosis pertinente.

Las composiciones farmacéuticas comprenden adecuadamente una cantidad de anticuerpo terapéuticamente efectiva. La expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" como se usa en el presente documento se refiere a la cantidad de un agente terapéutico necesaria para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad o afección dirigida, o para presentar un efecto terapéutico, farmacológico o preventivo detectable. Para cualquier anticuerpo, la cantidad terapéuticamente efectiva puede ser estimada inicialmente bien sea en células de cultivo de ensayos o en animales modelos, por lo general en roedores, conejos, perros, cerdos o primates. El animal modelo puede también ser utilizado para determinar la gama de concentración y la ruta de administración apropiadas. Tal información puede entonces ser utilizada para determinar las dosis y rutas de administración útiles en los seres humanos.

La cantidad terapéuticamente efectiva precisa para un sujeto humano dependerá de la gravedad del estado patológico, la salud del sujeto en general, la edad, el peso y el género del sujeto, la dieta, el tiempo y frecuencia de administración, combinaciones de fármacos, sensibilización de la reacción y tolerancia y respuesta a la terapia. Esta cantidad puede ser determinada por experimentación rutinaria y está en el dictamen del médico. Generalmente, una cantidad de anticuerpo terapéuticamente efectiva será de 0,01 mg/kg a 500 mg/kg, por ejemplo 0,1 mg/kg a 200 mg/kg, tal como 100 mg/kg.

Las composiciones farmacéuticas pueden ser convenientemente presentadas en forma de dosis unitarias que contienen una cantidad predeterminada de un agente de la invención activo por dosis.

Para el tratamiento de las enfermedades anteriores, la dosis apropiada variará dependiendo, por ejemplo, del anticuerpo en particular que se va a emplear, el sujeto a tratar, el modo de administración y la naturaleza y gravedad de la condición que se está tratando. En una realización concreta, la formulación líquida farmacéutica de la invención se administra por vía intravenosa o subcutánea. Cuando se administra mediante inyección por vía intravenosa, puede ser administrada como inyección en bolo o como una infusión continua. La formulación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las formas de realización de la invención puede también ser administrada mediante inyección intramuscular. La formulación farmacéutica puede ser inyectada utilizando una jeringa, un dispositivo de inyección tal como un autoinyector, un dispositivo sin aguja, un implante y un parche. La formulación de la invención puede también ser administrada por inhalación usando un dispositivo de inhalación que contiene dicha formulación para tal suministro, por ejemplo usando un nebulizador o un inhalador de líquido.

El proceso para la producción de moléculas de anticuerpos comprende típicamente cultivar una célula anfitriona que contiene un vector que codifica la secuencia de anticuerpos en condiciones adecuadas para conducir a la expresión de proteína a partir del DNA que codifica la molécula de anticuerpo de la presente invención, y aislar la molécula de anticuerpo.

La molécula de anticuerpo puede comprender solamente un polipéptido de cadena pesada o ligera, en cuyo caso se necesita usar solamente una secuencia de codificación del polipéptido de cadena pesada o de cadena ligera para transfectar las células anfitrionas. Para la preparación de productos que comprenden tanto cadenas pesadas como ligeras, la línea de células puede ser transfectada con dos vectores, un primer vector que codifica un polipéptido de cadena ligera y un segundo vector que codifica un polipéptido de cadena pesada.

Alternativamente, puede ser utilizado un único vector, que incluye secuencias que codifican los polipéptidos de cadena ligera y de cadena pesada.

Un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que puede ser fabricado de acuerdo con escalas industriales pueden ser producidos mediante el cultivo de células hospedadoras eucariotas transfectadas con uno o más vectores de expresión que codifican el fragmento de anticuerpo recombinante. Las células hospedadoras eucariotas son preferiblemente células de mamífero, más preferiblemente células de ovario de hámster chino (CHO).

Las células de mamífero pueden ser cultivadas en cualquier medio que apoye su crecimiento y la expresión de la proteína recombinante, preferiblemente el medio es un medio definido químicamente que está libre de productos derivados de animales tales como suero animal y peptona. Hay diferentes medios de cultivo de células disponibles para los expertos en la técnica, que comprenden diferentes combinaciones de vitaminas, aminoácidos, hormonas, factores de crecimiento, iones, tampones, nucleósidos, glucosa o una fuente de energía equivalente, presentes en concentraciones adecuadas para permitir el crecimiento de las células y la producción de proteínas. Pueden incluirse componentes del medio de cultivo adicionales en el medio de cultivo de las células a concentraciones apropiadas a tiempos diferentes durante un ciclo de cultivo de células que serían ya conocidos por los expertos en la técnica.

El cultivo de células de mamíferos puede llevarse a cabo en cualquier recipiente adecuado tal como un frasco agitador o un biorreactor que puede funcionar o no en un modo de alimentación por lotes (*fed-batch*) dependiendo de la escala de producción requerida. Estos biorreactores pueden ser de tanque agitado o bien de levantamiento con aire comprimido. Se dispone de varios biorreactores a escala grande con una capacidad de más de 1.000 L a 50.000 L, preferiblemente entre 5.000 L y 20.000 L, o a 10.000 L. Alternativamente, pueden también ser utilizados biorreactores de una escala más pequeña, tales como entre 2 L y 100 L, para fabricar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo.

Un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo se encuentra típicamente en el sobrenadante de un cultivo de células hospedadoras de mamífero, típicamente un cultivo de células CHO. Para los procesos de cultivo de CHO en los que la proteína de interés, como un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo, se segrega en el sobrenadante, dicho sobrenadante se recoge por métodos conocidos en la técnica, típicamente mediante centrifugación.

Por tanto, el método de producción de anticuerpos comprende una etapa de centrifugación y recuperación del sobrenadante después del cultivo de las células y antes de la purificación de las proteínas. En una realización más concreta, dicha centrifugación es centrifugación continua. Para evitar dudas, el sobrenadante indica el líquido que se encuentra por encima de las células sedimentadas resultantes de la centrifugación del cultivo de células.

Alternativamente, las células hospedadoras son células procariotas, preferiblemente bacterias gram-negativas. Más preferiblemente, las células hospedadoras son células de *E. coli*. Las células hospedadoras procariotas para la expresión de proteínas son bien conocidas en la técnica (Terpe, K. (2006). “Descripción general de los sistemas de expresión bacteriana para la producción de proteínas heterólogas: de los fundamentos moleculares y bioquímicos hasta los sistemas industriales”. Appl Microbiol Biotechnol 72, 211-222.). Las células hospedadoras son células recombinantes que han sido modificadas genéticamente para producir la proteína de interés, tales como un fragmento de anticuerpo. Las células hospedadoras de *E. coli* recombinantes pueden ser derivadas de cualquier cepa de *E. coli* adecuada, incluyendo desde MC4100, TG1, TG2, DHB4, DH5α, DH1, BL21, K12, XL1 Blue y JM109. Un ejemplo es la cepa de *E. coli* W3110 (ATCC 27,325), una cepa hospedadora utilizada comúnmente para fermentaciones de proteínas recombinantes. También pueden producirse fragmentos de anticuerpo cultivando cepas de *E. coli* modificadas, por ejemplo mutantes metabólicos o cepas de *E. coli* deficientes en proteasa.

Un fragmento de anticuerpo que puede ser purificado de acuerdo con los métodos de la presente invención se encuentra típicamente ya sea en el periplasma de la célula hospedadora de *E. coli* o en el sobrenadante del cultivo de la célula hospedadora, dependiendo de la naturaleza de la proteína, la escala de producción y la cepa de *E. coli* utilizada. Los métodos para dirigir proteínas a estos compartimentos son bien conocidos en la técnica (Makrides, S. C. (1996). “Estrategias para lograr la expresión de alto nivel de genes en *Escherichia coli*”. Microbiol Rev 60, 512-538). Los ejemplos de secuencias señal adecuadas para dirigir proteínas al periplasma de *E. coli* incluyen las secuencias señal de *E. coli* PhoA, OmpA, OmpT, LamB y OmpF. Las proteínas pueden ser dirigidas al sobrenadante basándose en las vías de secreción naturales o por la inducción de fugas limitadas de la membrana exterior para causar la secreción de proteína, ejemplos de los cuales son el uso de pelB líder, proteína A líder, la co-expresión de proteína de liberación de bacteriocina, la proteína de liberación de bacteriocina inducida por mitomicina, junto con la adición de glicina al medio de cultivo y la co-expresión del gen kil para permeabilización de la membrana. Lo más preferiblemente, la proteína recombinante se expresa en el periplasma del *E. coli* anfitrión.

La expresión de la proteína recombinante en las células hospedadoras de *E. coli* puede también ser bajo el control de un sistema inducible mediante el cual la expresión del anticuerpo recombinante en *E. coli* está bajo el control de un promotor inducible. Muchos promotores inducibles adecuados para su uso en *E. coli* son bien conocidos en la técnica y, dependiendo de la expresión del promotor de la proteína recombinante, pueden ser inducidos por diversos factores tales como la temperatura o la concentración de una determinada sustancia en el medio de crecimiento. Los ejemplos de promotores inducibles incluyen los promotores de *E. coli* lac, tac, y trc que son inducibles con lactosa o el análogo de lactosa no hidrolizable, isopropil-b-D-1-tiogalactopiranósido (IPTG) y los promotores phoA, trp y araBAD que son inducidos por fosfato, triptófano y L-arabinosa, respectivamente. La expresión puede ser inducida, por ejemplo, por la adición de un inductor o un cambio en la temperatura, cuando la inducción es dependiente de la temperatura. Cuando la inducción de la expresión de la proteína recombinante se logra por la adición de un inductor al cultivo, el inductor puede ser añadido por cualquier método adecuado dependiendo del sistema de fermentación y del inductor, por ejemplo por adiciones *shot* individuales o múltiples o por una adición gradual de inductor a través de un alimento. Se apreciará que puede haber un retardo entre la adición del inductor y la inducción real de la expresión de proteína por ejemplo cuando el inductor es lactosa puede haber un retraso antes de que la inducción de expresión de proteína se produzca mientras se utiliza cualquier fuente de carbono preexistente antes de la lactosa.

Los cultivos de células hospedadoras de *E. coli* (fermentaciones) pueden ser realizados en cualquier medio que apoye el crecimiento de *E. coli* y la expresión de la proteína recombinante. El medio puede ser cualquier medio definido químicamente tal como se describe p. ej. en Durany O, et al. (2004). “Estudios acerca de la expresión de la fuculosa-1-fosfato aldolasa recombinante en *Escherichia coli*”. Process Biochem 39, 1677-1684.

El cultivo de las células hospedadoras de *E. coli* puede tener lugar en cualquier recipiente adecuado, como un matraz de agitación o un fermentador, dependiendo de la escala de producción requerida. Se dispone de varios fermentadores de escala grande con una capacidad de más de 1.000 litros hasta aproximadamente 100.000 litros. Preferiblemente, se usan fermentadores de 1.000 a 50.000 litros, más preferiblemente de 1.000 a 25.000, 20.000, 15.000, 12.000 o 10.000 litros. También pueden ser utilizados fermentadores de escala más pequeña con una capacidad entre 0,5 y 1.000 litros.

La fermentación de *E. coli* puede ser realizada en cualquier sistema adecuado, por ejemplo modo continuo, por lotes o de alimentación discontinua, dependiendo de la proteína y los rendimientos requeridos. Puede usarse el modo de lotes con adiciones *shot* de nutrientes o inductores cuando se requiera. Alternativamente, puede utilizarse un cultivo

de lote alimentado y los cultivos desarrollados en pre-inducción en modo de lotes a la máxima velocidad específica de crecimiento que puede mantenerse usando los nutrientes inicialmente presentes en el fermentador y uno o más regímenes de alimentación de nutrientes usados para controlar la velocidad de crecimiento hasta que la fermentación es completa. El modo *fed-batch* puede también ser usado de pre-inducción para controlar el metabolismo de las células hospedadoras de *E. coli* y para permitir alcanzar densidades celulares más altas.

Si se desea, las células hospedadoras pueden ser sometidas a la recolección del medio de fermentación, por ejemplo, las células hospedadoras pueden ser recogidas de la muestra por centrifugación, filtración o concentración. En este caso, el proceso comprende típicamente una etapa de centrifugación y recuperación celular antes de extraer la proteína.

Para procesos de fermentación de *E. coli* en los que la proteína de interés, tal como un fragmento de anticuerpo, se encuentra en el espacio periplásmico de la célula hospedadora, se necesita liberar la proteína de la célula hospedadora. La liberación puede lograrse por cualquier método adecuado tal como lisis de células por tratamiento mecánico o presión, tratamiento de congelación-descongelación, choque osmótico, agentes de extracción o tratamiento térmico. Tales métodos de extracción para la liberación de proteínas son bien conocidos en la técnica. Por lo tanto, en una realización particular, el proceso de producción comprende una etapa adicional de extracción de proteínas antes de la purificación de las proteínas.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos" que se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos monoclonales o policlonales. El término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se utiliza en el presente documento incluye, pero sin limitarse a ellos, anticuerpos recombinantes que se generan mediante tecnologías recombinantes como se sabe por la técnica. Los términos "anticuerpo" o "anticuerpos" incluyen anticuerpos de cualquier especie, en particular de especies de mamíferos, incluyendo anticuerpos que tienen dos cadenas pesadas esencialmente completas y dos cadenas ligeras esencialmente completas, anticuerpos humanos de cualquier isotipo, incluyendo IgA_1, IgA_2, IgD, IgG_1, IgG_{2a}, IgG_{2b}, IgG_3, IgG_4 IgE e IgM y sus variantes modificadas, anticuerpos de primates no humanos, por ejemplo de chimpancés, babuinos, rhesus o monos cynomolgus, anticuerpos de roedores, por ejemplo de ratón, rata o conejo; anticuerpos de cabra o de caballo, y anticuerpos de camélidos (por ejemplo, a partir de camellos o llamas tales como Nanobodies™) y derivados de los mismos, o de especies de aves, tales como anticuerpos de pollo, o de especies de peces tales como anticuerpos de tiburón. El término "anticuerpo" o "anticuerpos" también se refiere a anticuerpos "quiméricos" en los que una primera porción de al menos una secuencia de anticuerpo pesada y/o ligera es de una primera especie y una segunda porción de la secuencia de anticuerpos de cadena pesada y/o ligera es de una segunda especie. Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable derivadas de un primate no humano (por ejemplo el mono Old World o mono del viejo mundo), tal como babuino, rhesus o mono cynomolgus) y secuencias humanas de región constante. Anticuerpos "humanizados" son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia derivada de anticuerpos no humanos. Para la mayor parte, los anticuerpos humanizados son anticuerpos humanos (anticuerpo receptor) en el que los residuos de una región hipervariable del receptor se reemplazan por residuos de una región hipervariable [o región determinante de la complementariedad (CDR)] de una especie no humana (anticuerpo donante) tal como ratón, rata, conejo, pollo o primate no humano, que tiene la especificidad, afinidad, y actividad deseadas. En la mayoría de los casos, residuos del anticuerpo humano (receptor) fuera de la CDR; es decir, en la región marco (FR), se reemplazan adicionalmente por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se realizan para refinar aún más el comportamiento del anticuerpo. La humanización reduce la inmunogenicidad de los anticuerpos no humanos en seres humanos, facilitando la aplicación de anticuerpos para el tratamiento de enfermedades humanas. Los anticuerpos humanizados y varias tecnologías diferentes para generarlos son bien conocidos en la técnica. El término "anticuerpo" o "anticuerpos" también se refiere a anticuerpos humanos que pueden ser generados como una alternativa a la humanización. Por ejemplo, es posible producir animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son capaces, tras la inmunización, de producir un repertorio completo de anticuerpos humanos en ausencia de producción de anticuerpos murinos endógenos. Por ejemplo, se ha descrito que la supresión homocigótica del gen de la región de ensamblaje de la cadena pesada del anticuerpo (Heavy-chain Joining: JH) en ratones quiméricos y de línea germinal mutantes tiene como resultado una completa inhibición de la producción de anticuerpo endógeno. La transferencia de la matriz del gen de la inmunoglobulina de la línea germinal humana en tales ratones mutantes en la línea germinal tendrá como resultado la producción de anticuerpos humanos con especificidad contra un determinado antígeno en la inmunización del animal transgénico que lleva los genes de la inmunoglobulina de la línea germinal humana con dicho antígeno. Las tecnologías para producir tales animales transgénicos y tecnologías para aislar y producir los anticuerpos humanos de tales animales transgénicos se conocen en la técnica. Alternativamente, en el animal transgénico, por ejemplo ratón, sólo los genes de la inmunoglobulina que codifican las regiones variables del anticuerpo de ratón se sustituyen con las correspondientes secuencias de genes de inmunoglobulina variables humanas. Los genes de inmunoglobulina de la línea germinal de ratón que codifican las regiones constantes del anticuerpo permanecen sin cambios. De este modo, las funciones efectoras del anticuerpo en el sistema inmunitario del ratón transgénico y en consecuencia el desarrollo de las células B, son esencialmente sin cambios, lo que puede conducir a una mejor respuesta del anticuerpo ante un reto antigénico *in vivo*. Una vez que los genes que codifican un determinado anticuerpo de interés han sido aislados a partir de tales animales transgénicos, los genes que codifican las regiones constantes pueden ser reemplazados con genes humanos de la región constante con el fin de obtener un anticuerpo totalmente humano. Otros métodos para obtener anticuerpos humanos de

fragmentos de anticuerpo *in vitro* se basan en tecnologías de presentación tales como la presentación de fagos o la tecnología de presentación de ribosomas, en donde se utilizan bibliotecas de ADN recombinante que están ya sea generados artificialmente al menos en parte o a partir de repertorios de donantes, de genes de dominio variable (V) de inmunoglobulina. Las tecnologías de presentación de fagos y ribosomas para generar anticuerpos humanos son bien conocidas en la técnica. Los anticuerpos humanos pueden también ser generados a partir de células B humanas aisladas que son inmunizadas *ex vivo* con un antígeno de interés y posteriormente fusionadas para generar hibridomas que pueden entonces ser cribados para obtener el anticuerpo humano óptimo. El término "anticuerpo" o "anticuerpos" como se usa en el presente documento, también se refiere a un anticuerpo aglicosilado.

El término "anticuerpo" o "anticuerpos", como se usa en el presente documento, no solo se refiere a anticuerpos no truncados de cualquier especie, incluso de seres humanos (por ejemplo, IgG) y otras especies de mamíferos, sino que también se refiere a un fragmento de anticuerpo. Un fragmento de un anticuerpo comprende al menos un dominio de inmunoglobulina de cadena pesada o ligera como se conoce en la técnica y se une a uno o más antígenos. Entre los ejemplos de fragmentos de anticuerpo de acuerdo con la invención se incluyen Fab, Fab', $F(ab')_2$ y Fv, y fragmentos scFv; así como diacuerpos, triacuerpos, tetracuerpos, minicuerpos, anticuerpos de dominio (dAbs), tales como los fragmentos sdAbs, VHH y VNAR, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos biespecífico, triespecífico, tetraespecífico o multiespecífico formados a partir de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, incluyendo, pero sin limitarse a ellos, los constructos Fab-Fv o Fab-Fv-Fv. Los fragmentos de anticuerpos como se definieron anteriormente son conocidos en la técnica.

El término "neutraliza", como se usa en el presente documento, se refiere a un anticuerpo que inhibe o reduce sustancialmente el efecto biológico de la molécula a la que se une específicamente. Por lo tanto, la expresión "el anticuerpo neutraliza al CSF1R" se refiere a un anticuerpo que se une específicamente a CSF1R e inhibe o reduce sustancialmente el efecto biológico resultante de la unión de este receptor a al menos uno de sus ligandos biológicos. Un tipo particular de anticuerpo que neutraliza a CSF1R bloquea o reduce sustancialmente la unión de la al menos uno de los ligandos biológicos con CSF1R.

La expresión "receptor del factor 1 estimulante de colonias " o "CSF1R", como se usa en el presente documento, se refiere a una proteína quinasa de tirosina que actúa como receptor de la superficie celular para CSF1 e interleucina 34 (IL34) y desempeña un papel esencial en la regulación de la supervivencia, la proliferación y la diferenciación de células precursoras hematopoyéticas, especialmente fagocitos mononucleares, tales como macrófagos y monocitos. Promueve la liberación de quimiocinas proinflamatorias en respuesta a IL34 y CSF1, y de este modo juega un importante papel en la inmunidad innata y en procesos inflamatorias. El CSF1R también juega un papel importante en la regulación de la proliferación y diferenciación de osteoclastos, la regulación de la resorción ósea, y es necesario para el desarrollo normal de los huesos y los dientes. CSF1R es necesario para la fertilidad normal masculina y femenina, y para el desarrollo normal de los conductos galactóforos y las estructuras acinares en la glándula mamaria durante el embarazo. También promueve la reorganización de la actina del citoesqueleto, regula la formación de frunces en la membrana, adhesión de células y migración de células, y promueve la invasión de células del cáncer.

CSF1 es una citocina que controla la producción, la diferenciación y la función de los macrófagos, y el CSF1R media la mayoría, si no todos, de los efectos biológicos de esta citocina.

El término "Ab969.g2" como se usa en el presente documento significa un anticuerpo que se une específicamente a CSF1-R y comprende (a) una cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 como se define en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente, y (b) una cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 como se define en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente. Este anticuerpo Ab969.g2 ha sido descrito previamente en el documento PCT/EP2014/068050.

La expresión "se une específicamente a CSF1R", "unión específica a CSF1R", y los equivalentes que se usan en este documento cuando se refieren a un anticuerpo, significa que el anticuerpo se unirá a CSF1R con afinidad y especificidad suficientes para lograr un efecto biológicamente significativo. El anticuerpo seleccionado tendrá normalmente una afinidad de unión para CSF1R, por ejemplo, el anticuerpo puede unirse a CSF1R con un valor de Kd de 100 nM y 1 pM. Las afinidades de un anticuerpo pueden ser determinadas por un ensayo de bases de resonancia superficial de plasmón, tales como, p. ej., el ensayo BIAcore, ensayo de inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y ensayos de competencia (por ejemplo, RIA). Dentro del significado de la presente invención, también puede unirse a otra molécula un anticuerpo que se une específicamente a CSF1R tal como, a título de ejemplo no limitante, en el caso de un anticuerpo biespecífico.

Ejemplos.

Ejemplo 1.

Se prepararon diferentes formulaciones farmacéuticas de anticuerpo Ab969.g2 en una concentración de 50 mg/mL. Se cribaron varios estabilizantes incluyendo sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol, glicina, cloruro sódico, prolina y alanina con el fin de investigar su efecto sobre la estabilidad de la proteína bajo almacenamiento.

Normalmente se ensaya un estabilizante por formulación, pero durante el esfuerzo de selección de la formulación, 21 de las 110 formulaciones probadas incluyeron combinaciones de dos estabilizantes (por ejemplo, glicina y cloruro

sódico en 7 formulaciones, sacarosa y cloruro sódico en 7 formulaciones, sacarosa y glicina en 7 formulaciones). Las 110 formulaciones fueron sometidas a almacenamientos de 3 meses a 5 °C, 25 °C y 35 °C con el fin de evaluar las propiedades de estabilidad de la formulación.

Todas las formulaciones fueron analizadas recién preparadas y después de 1 mes, 2 meses y 3 meses de almacenamiento a 5°C, 25 °C o 35 °C y usando múltiples métodos analíticos (observación visual, pH, concentración, dispersión dinámica de la luz, cromatografía de exclusión por tamaño, variantes de carga, cromatografía de fase inversa). Al cabo de los 3 meses de estudio, pareció que la analítica crítica capaz de discriminar entre las 110 formulaciones eran la observación visual (si había tenido lugar precipitación visual) y el aumento de los niveles de agregados o de especies de alto peso molecular (HMWS), mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC). Sólo eran solubles 13 formulaciones de las 110 ensayadas (sin precipitado visible) en todos los tiempos en temperaturas de almacenamiento críticas de 5 °C y 25 °C. Entre esas 13 formulaciones solubles, las que contienen estabilizantes de 125 mM de glicina y 125 mM de sacarosa en tampón de citrato mostraron el incremento más bajo de HMWS, medido mediante SEC.

El efecto sinérgico de sacarosa y glicina combinadas en la formulación puede entenderse cuando se comparan los datos analíticos críticos obtenidos para las formulaciones estabilizantes individuales (bien sea 250 mM glicina o 250 mM sacarosa) con los obtenidos para la formulación del estabilizante combinado.

La formulación basada en glicina mostró precipitación después de 2 meses de almacenamiento a 25 °C y por ello se suspendió (véase la Tabla 1), mientras que las formulaciones de sacarosa o sacarosa + glicina permanecieron en disolución después de un almacenamiento de 3 meses en todas las condiciones, lo que demuestra que la sacarosa usada como estabilizante único o combinado reduce el riesgo de precipitación visual.

Tabla 1: Apariencia visual después de 2 meses de almacenamiento.

	Sacarosa 250 mM	Glicina 250 mM	Sacarosa 125 mM + Glicina 125 mM
5 °C	disolución	disolución	disolución
25 °C	disolución	precipitado	disolución
35 °C	disolución	disolución	disolución

Otra importante consideración aparte de la precipitación cuando se busca una formulación adecuada es la formación de especies de alto peso molecular (HMWS) debido a la degradación y la agregación del anticuerpo que no son visibles a simple vista. La presencia de HMWS en las formulaciones se determina usando cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Típicamente un nivel de hasta el 5% HMWS en las condiciones consideradas de almacenamiento a largo plazo del producto farmacológico, se considera que cumple con las consideraciones de liberación y estabilidad, y es por lo tanto aceptable.

El aumento de HMWS determinado mediante SEC después de 2 meses o 3 meses se proporciona respectivamente en las tablas 2 y 3 que siguen, que muestra que la glicina usada como estabilizante simple o combinado reduce la velocidad de aumento de HMWS por SEC.

Tabla 2: Aumento de HMWS determinado por SEC después de 2 meses de almacenamiento.

	Sacarosa 250 mM	Glicina 250 mM	Sacarosa 125 mM + Glicina 125 mM
25 °C	+ 1,17%	+ 0,88%	+ 0,88%
35 °C	+ 2,89%	+ 2,43%	+ 2,42%

Tabla 3: Aumento de HMWS determinado por SEC después de 3 meses de almacenamiento.

	Sacarosa 250 mM	Glicina 250 mM	Sacarosa 125 mM + Glicina 125 mM
5 °C	+ 0,27%	No determinado	+ 0,2%
25 °C	+ 1,44%	No determinado	+ 1,05%
35 °C	+ 4,16%	No determinado	+ 3,48%

Como puede observarse a partir de los anteriores resultados, la formulación que comprende una combinación de sacarosa y glicina muestra el aumento de HMWS más bajo, proporcionando aproximadamente una vida útil de almacenamiento un 35% más larga sobre la formulación que comprende solamente sacarosa. Combinada con la

ausencia de precipitación visible a lo largo del tiempo para todas las condiciones de almacenamiento probadas, esta combinación de estabilizantes se ha encontrado sorprendentemente beneficiosa para su uso en formulaciones líquidas de proteínas, más en particular para formulaciones líquidas de anticuerpos.

Listado de secuencias

<110> UCB Biopharma SPRL

<120> Formulación farmacéutica

<130> B0090-PCT

<150> 15154301.4
<151> 09-02-2015

<160> 14

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencias CA019_969 Ab CDR-L1

<400> 1
Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asp Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 2
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencias CA019_969 Ab CDRL2

<400> 2
Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp
1 5

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencias CA019_969 Ab CDR-L3

<400> 3
Leu Gln Asp Ser Glu Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencias CA019_969 Ab CDR-H1

<400> 4
Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly
1 5 10

<210> 5
<211> 16
<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencias CA019_969 Ab CDR-H2

<400> 5
Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser Leu Lys Asn
1 5 10 15

<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> secuencias CA019_969 Ab CDR-H3

<400> 6
Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr Phe Asp Phe
1 5 10 15

<210> 7
<211> 107
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región 969 gL7 V

<400> 7
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asp Asn
20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80

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

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

<210> 8
<211> 127
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región 969 gL7 V con secuencia de señal subrayada y en itálica

<400> 8

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser
100 105 110

Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 9
<211> 214
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cadena ligera 969 gL7 (V + constante)

<400> 9

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp Ile Tyr Asp Asn
20 25 30

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

Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 10
<211> 234
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cadena ligera 969 gL7 (V + constante) con secuencia de señal subrayada y en itálica

<400> 10

Met Ser Val Pro Thr Gln Val Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Leu Ala Ser Glu Asp
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
50 55 60

Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ser Leu Gln Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Leu Gln Asp Ser
100 105 110

Glu Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
115 120 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
130 135 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
165 170 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
195 200 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
210 215 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

<210> 11
<211> 125
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región 969 gH2 V

<400> 11

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

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

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

Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
115 120 125

<210> 12
<211> 144
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> región 969 gH2 V con secuencia de señal subrayada y en itálica

<400> 12
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
20 25 30

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Thr Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro
115 120 125

Tyr Arg Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
130 135 140

<210> 13
<211> 453
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cadena pesada 969 gH2 (V + constante-hu IgG4P)

<400> 13
Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

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

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

Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

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

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro Tyr Arg Tyr
100 105 110

Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
115 120 125

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

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

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

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

Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr
195 200 205

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

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
225 230 235 240

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu
405 410 415

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

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

Leu Ser Leu Gly Lys
450

<210> 14
<211> 472
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> cadena pesada 969 gH2 (V + constante-hu IgG4P) con secuencia de señal subrayada y en itálica

<400> 14
Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys
20 25 30

Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu
35 40 45

Thr Thr Tyr Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys
50 55 60

Ala Leu Glu Trp Leu Ala Asn Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr
65 70 75 80

Asn Pro Ser Leu Lys Asn Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys
85 90 95

Asn Gln Val Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala
100 105 110

Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Ile Gly Pro Ile Lys Tyr Pro Thr Ala Pro
115 120 125

Tyr Arg Tyr Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser
130 135 140

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
145 150 155 160

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
165 170 175

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

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
195 200 205

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
210 215 220

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
225 230 235 240

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
245 250 255

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
260 265 270

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
275 280 285

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
290 295 300

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
305 310 315 320

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
325 330 335

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
340 345 350

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

355 360 365

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
370 375 380

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
385 390 395 400

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
405 410 415

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
420 425 430

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
435 440 445

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
450 455 460

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
465 470

REIVINDICACIONES

1. Una formulación líquida farmacéutica que comprende un anticuerpo como ingrediente activo, y glicina y sacarosa, en la que el anticuerpo se une específicamente al receptor del factor-1 estimulante de colonias (CSF1R) y en la que el anticuerpo comprende:

a) una cadena ligera que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 como se define en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3, respectivamente; y

b) una cadena pesada que comprende CDR1, CDR2 y CDR3 como se define en SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 y SEQ ID NO: 6, respectivamente.

2. Una formulación líquida farmacéutica según la reivindicación 1, que comprende glicina a una concentración de 20 mM a 200 mM.

3. Una formulación líquida farmacéutica según las reivindicaciones 1 o 2, que comprende sacarosa en una concentración de 20 mM a 200 mM.

4. Una formulación líquida farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende al menos 50 mg/mL de anticuerpo.

5. Una formulación líquida farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende un agente tensioactivo.

6. Una formulación líquida farmacéutica según la reivindicación 5, que comprende de 0,01% a 10% de Polisorbato 80.

7. Una formulación líquida farmacéutica según la reivindicación 1, en la que el anticuerpo se une específicamente al CSF1R humano.

8. Una formulación líquida farmacéutica según la reivindicación 7, en la que el anticuerpo neutraliza al CSF1R.

9. Una formulación líquida farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el anticuerpo es un anticuerpo humano o humanizado.

10. Una formulación líquida farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en la que el anticuerpo comprende una cadena ligera variable como se define en la SEQ ID NO: 7 y una cadena pesada variable como se define en la SEQ ID NO: 11.

11. Una formulación líquida farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones precedentes que comprende:

- 40-60 mM de tampón de citrato a pH 5;
- 100-150 mM de glicina;
- 100-150 mM de sacarosa; y
- 0,02-0,1% de polisorbato 80.