

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 10-091445- -00021-0000

Fecha: 2013-12-04 16:31:25 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 48

Señor Director
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
Superintendencia de Industria y Comercio
E. S. D.

Trámite : 011
Evento : 378
Actuación : 523

Referencia : Expediente No. **10.091.445**
Asunto : Solicitud de patente para: **PREPARACIÓN ESTABLE QUE CONTIENE ANTICUERPOS, QUE COMPRENDE ARGININA Y METIONINA**
Solicitante : **CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA AND F. HOFFMANN-LA ROCHE AG**
Fecha de solicitud : 27 de julio de 2010.

1. Yo, Luz Clemencia DE PÁEZ, en mi condición de apoderada de la sociedad solicitante de la patente de la referencia, me refiero al oficio No. **13256** notificado por fijación en lista el 30 de julio de 2013.

2. Mediante memorial del 21 de octubre de 2013 se solicitó oportunamente plazo para responder la acción oficial.

3. Mediante oficio No. **13256** se puso en conocimiento del solicitante el informe que contiene las observaciones hechas por su Despacho sobre la presente solicitud de patente. Las observaciones realizadas en el oficio se refieren a que la reivindicación 14 no es patentable por ser relativa a un uso, a la claridad del pliego reivindicatorio, a la novedad de las reivindicaciones 1-4 y 16 en vista de los documentos D3: US2005175611 y D2: US2007122402, y al nivel inventivo de las reivindicaciones 10 y 17 en vista de los documentos D1: US2003180287 y D2: US2007122402.

"EXCELENCIA LEGAL EN UN MUNDO SIN FRONTERAS"

BOGOTÁ - Edificio Siski - Carrera 4 No. 72 - 35 - Tel. (57-1) 347 3611 - Fax (57-1) 211 8650 - Fax in U.S.A: (1-305) 675 7743 - COLOMBIA
MEDELLÍN - San Fernando Plaza - Carrera 43 A No. 1 - 50 - Torre Protección, Oficina 652 - Tel: (57-4) 604 4794 Ext. 6729 / 6731 - Fax: (57-4) 604 4731- COLOMBIA

www.cavelier.com
cavelier@cavelier.com

4. Respuesta a las objeciones

De este modo y con el objeto de atender las objeciones arriba mencionadas, se desea presentar las siguientes modificaciones, aclaraciones y argumentos:

4.1 Modificación de una solicitud en trámite

De acuerdo con el artículo 34 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, donde se establece que la modificación de una solicitud es posible en cualquier momento del trámite mientras no implique una ampliación de la solicitud inicial, me permito presentar un nuevo pliego reivindicatorio conformado por 16 reivindicaciones, junto con un nuevo capítulo descriptivo.

4.1.1 Se han introducido las siguientes modificaciones al capítulo reivindicatorio:

- Se eliminaron las reivindicaciones 4 y 14.
- Se modificaron las reivindicaciones 1, 10, 11 y 16-18.
- Se reenumeraron las demás reivindicaciones.

Se modificaron las reivindicaciones originales 1 y 16 para definir el anticuerpo como un “anticuerpo completo” en una cantidad de 50 a 300 mg/ml, las concentraciones de los dos aminoácidos se limitaron a “100 a 300 mM de arginina” y “10 a 50 mM de metionina” (soporte en la descripción de la presente solicitud en la pág. 7, líneas 13 a 20 y pág 16, líneas 18 a pág. 17, línea 4). De esta manera la presente invención de la nueva reivindicación 1 está claramente definida por sus elementos y proporciones. La reivindicación original 16, nueva reivindicación 14, que se refiere a un método está ahora definida por la etapa de “adicionar” y por las condiciones específicas de esta etapa que son las cantidades de los componentes, por lo que ahora la reivindicación está definida por sus características esenciales y es completamente clara para una persona versada en la materia.

Teniendo en cuenta que el anticuerpo está ahora definido como un anticuerpo completo, la estructura del anticuerpo en las formulaciones y los métodos reivindicados son específicos y distinguidos del estado de la técnica citado. Adicionalmente, un rango de concentración del anticuerpo es restringido a 50 a 300 mg/ml para maximizar las diferencias entre la presente invención y el arte previo citado, porque un efecto ventajoso de la presente invención es especialmente notable en una formulación líquida que contiene el anticuerpo a tan altas concentraciones. Un rango de concentración de los aminoácidos (Arg y Met) también se especifica, los cuales son adecuados con las formulaciones divulgadas en los ejemplos que proporcionan efectos sinérgicos de una combinación de arginina (Arg) y metionina (Met), como se discutirá más adelante. Adicionalmente, el "INSTRUCTIVO EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTES DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD" de su Despacho, establece que "Cada una de las reivindicaciones debe contener la solución técnica que se desea proteger, y la persona del oficio normalmente versada en la materia debe poder llevarla a cabo directamente, o por generalización del contenido divulgado en la descripción" y de conformidad con lo señalado en el artículo 51 de la Decisión 486 la descripción de una solicitud sirve para interpretar las reivindicaciones: *"El alcance de la protección conferida por la patente estará determinado por el tenor de las reivindicaciones. La descripción y los dibujos, o en su caso, el material biológico depositado, servirán para interpretarlas"*. Teniendo en cuenta lo anterior, se observa que la presente solicitud como se reclama actualmente si podría ser llevada a cabo por una persona versada en la materia junto con el apoyo de la descripción, por lo que se puede establecer que la nueva reivindicación 1 si está sustentada en la descripción, de modo que, la objeción formulada a este respecto se debe tener por superada.

Con respecto a la objeción de la reivindicación original 12, nueva reivindicación dependiente 11, en donde el Examinador objeta dicha reivindicación porque no está sustentada en la descripción, respetuosamente manifestamos nuestro desacuerdo. Se debe tener en cuenta que como lo establece el "INSTRUCTIVO EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTES DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD" de su Despacho: "El examinador debe tener en cuenta que la dependencia está dada porque todas las características esenciales de la reivindicación independiente están presentes en

la reivindicación dependiente. Las características esenciales son el conjunto de elementos que soluciona el problema técnico. En consecuencia, una reivindicación dependiente es la que contiene todas las características de la reivindicación de la cual depende y además: i) hace referencia a ésta; y ii) adiciona una o más características que limitan el objeto a proteger". En este caso la nueva reivindicación dependiente 11 agrega una característica que limita el objeto a proteger, sin embargo, ya incluye todas las características esenciales de la invención, es decir de la reivindicación independiente, y por ende incluye el mismo efecto y la misma solución.

Finalmente, se eliminó la reivindicación original 14 por lo que se ve superada la objeción formulada a dicha reivindicación.

Teniendo en cuenta las modificaciones realizadas al capítulo reivindicatorio y las anteriores aclaraciones, todas las objeciones formuladas por el Examinador en cuanto a la claridad y concisión del pliego reivindicatorio se ven superadas. En consecuencia, teniendo en cuenta que se han superado las objeciones formuladas por su Despacho, respetuosamente se solicita aceptar este nuevo pliego reivindicatorio y considerar en el próximo análisis de patentabilidad.

4.1.2 Se ha corregido el nuevo capítulo descriptivo para cambiar el término "pico(s) Pre" por "Pre pico(s)", por un claro error tipográfico y con el fin de favorecer la claridad de éste. Así, un técnico versado en la materia entenderá la descripción de forma inequívoca y podrá reproducir la invención adecuadamente.

4.2 Argumentos a favor de la novedad y el nivel inventivo de la presente solicitud

De acuerdo con el artículo 16, de la Dec. 486 de la Comunidad Andina, el cual se refiere a la novedad de la invención se establece que:

Artículo 16: Una invención se considerará nueva cuando no esté comprendida en el estado de la técnica.

“El estado de la técnica comprenderá todo lo que haya sido accesible al público por una descripción escrita u oral, utilización, comercialización o cualquier otro medio antes de la fecha de presentación de la solicitud de patente, o en su caso, de la prioridad reconocida.”

El método mediante el cual se evalúa la novedad de una invención, es a través de la comparación uno a uno de sus características esenciales. De este modo, para que una invención se objete por novedad, es porque sus características esenciales son **exactamente iguales** a las de un documento del estado de la técnica. Por lo tanto **en caso que llegue a existir al menos una diferencia entre dicha comparación**, se afirma que la invención **SI** cumple con el requisito de novedad.

También el artículo 18 de la Decisión 486 señala lo siguiente:

Artículo 18.- Se considerará que una invención tiene nivel inventivo, si para una persona del oficio normalmente versada en la materia técnica correspondiente, esa invención no hubiese resultado obvia ni se hubiese derivado de manera evidente del estado de la técnica.

Consecuentemente, una invención se considerará inventiva si la misma no hubiese resultado obvia a partir del arte previo, para una persona del oficio normalmente versada en la materia. Esto a su vez implica que el Examinador a cargo de esta evaluación debe colocarse en el momento exacto en el que el inventor buscaba resolver el problema técnico contemplado en la solicitud y para el cual poseía la literatura y el conocimiento disponibles en dicho momento.

Siguiendo entonces los lineamientos de la Jurisprudencia aplicable al análisis del nivel inventivo de una solicitud de patente, se considera que una anterioridad o una combinación de dos anterioridades puede afectar dicho requerimiento de patentabilidad, si una persona medianamente versada en la materia encuentra enseñanzas o sugerencias claras que, a partir de un conocimiento medio en dicho campo, le permitan llegar de manera obvia a la invención reivindicada. Adicionalmente se considera que una mejora sustancial, un efecto inesperado o una ventaja con respecto al arte previo es un indicio de nivel inventivo, por cuanto aporta un salto tecnológico en la regla técnica.

La presente invención si tiene novedad y nivel inventivo

La presente solicitud se refiere al desarrollo de formulaciones líquidas que contienen una alta concentración de anticuerpo que es un anticuerpo completo y opcionalmente es humanizado o un anticuerpo humano que es adecuado para la administración subcutánea a un paciente humano. Por el contrario, ninguno de los documentos del estado de la técnica se dirige o refiere a como estabilizar un anticuerpo completo en altas concentraciones como se reivindica actualmente.

La presente invención se distingue del estado de la técnica en que estos documentos no divulgan ni sugieren la presente invención como se reclama actualmente, particularmente con respecto a las altas concentraciones del anticuerpo completo formulado con la combinación de arginina y metionina como estabilizadores y con las concentraciones específicas que se reclaman en el nuevo pliego reivindicatorio. Adicionalmente los datos en la descripción de la presente solicitud soportan el hallazgo de un resultado superior inesperado asociado con la combinación de arginina y metionina.

Ninguno de los documentos del estado de la técnica de hecho combina arginina y metionina ni evalúan la habilidad si la combinación se utiliza para estabilizar un anticuerpo.

En la presente solicitud, ejemplos específicos demuestran que la combinación de arginina (100 a 300 mM) y metionina (10 a 50 mM) es efectiva en la estabilización de una formulación líquida que comprende un anticuerpo completo a una alta concentración (50 a 300 mg/ml). Adicionalmente, los resultados de los ejemplos muestran que un efecto sinérgico se obtiene por la combinación de arginina y metionina.

La página 15, líneas 8 a 14 de la descripción de la presente solicitud establece:

“Además, en soluciones en las que una alta concentración de anticuerpo se disolvió en una solución reguladora que contiene arginina y metionina, el efecto inhibitor contra la dimerización se observó en una concentración total de arginina y metionina, la

cual es menor que la concentración de la arginina sola necesaria para lograr el mismo efecto inhibitor. A partir de estos resultados, se encontró que el efecto sinérgico se obtiene por la adición de arginina y metionina en combinación.”

El efecto sinérgico se demuestra por los resultados de los ejemplos. Solicitamos al Examinador referirse a los valores obtenidos para las muestras A7-A9 en la Tabla 1, Figuras 2 y 3, y muestras A25-27 en la Tabla 3, Figura 7, Tabla 4, Figura 8, para comparar la combinación de Arg y Met con la de Arg sola, al igual que la discusión de los resultados del Ejemplo 1 en la página 24 y la del Ejemplo 3 en las páginas 34 y 35.

Página 24, de la descripción de la presente solicitud dice:

“Por otro lado, la cantidad de dímero en las muestras (Muestra Nos. A7 a A9) a la cual se agregaron arginina (100 mM) y metionina después de la aceleración a 40°C por 3 meses y a 25°C por 6 meses, respectivamente, fue menor a la que se agregó en las muestras (Muestra Nos. A3 y A4) que contienen 150 mM de arginina, cuya concentración fue aproximadamente la misma que la concentración total de los estabilizadores; y la cantidad de dímero fue aproximadamente la misma que en la muestra (Muestra No. A6) que tiene una concentración de arginina de 300 mM. Se considera que estos resultados indican que un efecto sinérgico en la inhibición de la dimerización se obtiene al combinar arginina y metionina.”

Página 34, de la descripción de la presente solicitud dice:

“Por otro lado, la cantidad de dímero en las muestras (Muestra Nos. A25 a A27) a la cual se agregaron arginina (100 mM) y metionina después de la prueba de aceleración de luz fue menor a la que se agregó en la muestra (Muestra No. A22) que contiene 150 mM de arginina, cuya concentración fue aproximadamente la misma que la concentración total de los estabilizadores; y la cantidad de dímero fue menor que en las muestras (Muestras No. A23 y A24) que tiene concentraciones de arginina de 200mM y 300 mM, respectivamente. Se considera que estos resultados indican que un efecto sinérgico en la inhibición de la dimerización se obtiene al combinar arginina y metionina.”

Página 35, de la descripción de la presente solicitud dice:

“Por otro lado, la cantidad de dímero después de la prueba de aceleración de luz en las muestras (Muestra Nos. A25 a A27) a las cuales se agregaron arginina (100 mM) fue menor a la que se agregó en la muestra (Muestra No. A22) que contiene 150 mM de arginina, cuya concentración fue aproximadamente la misma que la concentración total de los estabilizadores; y fue menor que en las muestras (Muestras No. A23 y A24) que tiene concentraciones de arginina de 200mM y 300 mM, respectivamente. Se considera que estos resultados indican un efecto sinérgico en la inhibición de la formación del Pre pico por la combinación de arginina y metionina.”

El efecto técnico inesperado de la presente invención como se demostró anteriormente es un indicio del nivel inventivo de la presente solicitud. Esto se ve soportado por el “INSTRUCTIVO EXAMEN DE SOLICITUDES DE PATENTES DE INVENCION Y MODELO DE UTILIDAD” de su Despacho, el cual establece que “Si las características técnicas combinadas producen un efecto técnico nuevo, es decir, si el efecto técnico que produce la combinación es mayor que la suma de los efectos técnicos de las características individuales, la invención tiene nivel inventivo. Es irrelevante si cada característica individual es total o parcialmente conocido”. De esta manera, se puede concluir que la presente solicitud si tiene novedad y nivel inventivo.

4.3 Conclusiones

De acuerdo a todos los argumentos presentados, la presente solicitud cumple a cabalidad con los requerimientos exigidos en la Decisión 486 y las objeciones formuladas por el Examinador se ven superadas. Con respecto al nivel inventivo, consideramos que el Examinador está excluyendo el hecho de que el inventor en el momento de solucionar el problema técnico de la solicitud tuvo que emplear habilidad inventiva, pues la presente invención no resulta de la mera extrapolación de las enseñanzas del arte previo, como se afirma, adicionalmente teniendo en cuenta que el arte previo no divulga lo que el

Examinador reclama. Se está desconociendo el mérito investigativo empleado y que está aportando una ventaja al arte previo.

5. Puesto que se ha dado respuesta a todas las objeciones formuladas por el Examinador, se solicita atentamente proceder al otorgamiento de la solicitud de patente. En este sentido, respetuosamente recordamos al Examinador que la patente no podrá ser negada con base en objeciones diferentes a las expuestas en la acción oficial No. 13256, toda vez que al no haber sido trasladadas a mi representada, dicha decisión violaría tanto el tenor literal del artículo 45 de la Decisión 486 como el derecho constitucional al debido proceso. En este evento, y con base en el inciso 2 del artículo 45, respetuosamente solicitamos al Examinador expedir una nueva acción oficial que permita a mi representada contra argumentar las mismas o modificar la solicitud con el fin de cumplir los requisitos de patentabilidad.

Respetuosamente manifiesto que a pesar de eliminar materia del pliego reivindicatorio originalmente presentado, mi representada no renuncia a la protección que pueda obtener sobre dicha materia y se reserva el derecho de presentar una solicitud divisional que la contenga durante el trámite de la presente solicitud, beneficiándose de la fecha de prioridad inicialmente reivindicada.

6. Anexos

- Nuevo pliego reivindicatorio conformado por 16 reivindicaciones.
- Nuevo capítulo descriptivo.

Señor Director,


LUZ CLEMENCIA DE PÁEZ

C.C. 35.456.344 de Usaquén

T.P.A. No. 23.555

COLO-17753-0841-001-6
COLO-17753-0264-001-4
COLO-17753-0264-002-2
FBJ\FBJ\ID-256245\WPC17753
No. M-2013-256245\FBJ

Q3L

- 1 -

**PREPARACION DE SOLUCION QUE CONTIENE ANICUERPOS EN UNA ALTA
CONCENTRACION**

CAMPO TECNICO

La presente invención se refiere a una formulación que contiene un anticuerpo y particularmente, a una formulación líquida estable que contiene una alta concentración de un anticuerpo.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

En años recientes, se han desarrollado y utilizado en la práctica varias formulaciones de anticuerpos. Varias formulaciones de anticuerpos se utilizan en inyecciones intravenosas. Sin embargo, debido a las necesidades de una clínica, hay una creciente demanda para el desarrollo de una formulación que contiene anticuerpos que puede administrarse como una inyección subcutánea autoinyectable.

Al diseñar una formulación que contiene anticuerpos para la inyección subcutánea, ya que una dosis de un anticuerpo por administración es grande (aproximadamente 100 mg a 200 mg) y una cantidad de una solución de inyección generalmente está limitada a una inyección subcutánea, es necesario aumentar una concentración de un anticuerpo en un líquido que se va a administrar. En vista de esto, en varios casos, se utilizan formulaciones de alta concentración, las cuales se preparan por medio de la técnica de concentración por liofilización, en la que una

formulación liofilizada se reconstituye en agua que tiene un volumen menor a aquel antes de la liofilización. No obstante, hay una fuerte demanda por una formulación líquida que no requiere reconstitución y la cual es fácil de manejar. Aunque no se prefiere un aumento en una viscosidad de una formulación debido a la adición de un agente crioprotector tal como un azúcar en el procedimiento de producción de la formulación liofilizada para las formulaciones para inyección subcutánea, se supone que este problema podría evitarse si la formulación fuera una formulación líquida.

Las soluciones que contienen una alta concentración de un anticuerpo tienden a formar soluciones que tienen una alta viscosidad debido a las propiedades macromoleculares de las proteínas y debido a las interacciones intermoleculares de las proteínas. Además, en los casos donde se almacena una proteína en una forma de una solución que tiene una alta concentración, sucede una degradación problemática que incluye una generación de agregados insolubles y/o solubles y es necesario evitar tal degradación. Especialmente, en las formulaciones de anticuerpos, es probable que se formen asociaciones y es probable que se generen agregados insolubles en un estado líquido. En los casos en los que se almacena una formulación líquida por largo tiempo, existe un problema en que se pierde una bioactividad de moléculas de anticuerpo debido a la desamidación de residuos de aminoácidos tal como residuos de aspargina.

Se propusieron varias ideas para proveer una formulación estabilizada en la que la pérdida de un componente activo es pequeña aún después de que se almacena la formulación por largo tiempo. Tales formulaciones se producen al disolver un componente activo y varios aditivos de una solución reguladora. Sin embargo, para las formulaciones líquidas que contienen una alta concentración de

- 3 -

un anticuerpo, aún no existe una tecnología que sea suficiente para prevenir la dimerización y desamidación.

Existe una necesidad de proveer una formulación que contiene una alta concentración de anticuerpos en la que se inhibe la dimerización y desamidación durante un almacenamiento a largo plazo y el cual es tanto estable como adecuado para el uso en la administración subcutánea.

BREVE DESCRIPCION DE LA INVENCION

Problema que se resolverá por medio de la invención

Un objetivo de la presente invención es proveer una formulación líquida que contiene una alta concentración de anticuerpos en la que se inhibe la dimerización y desamidación durante un almacenamiento a largo plazo y la cual es estable y adecuada para uso en la administración subcutánea.

Medios para resolver los problemas

Los presentes inventores dirigieron un estudio intensivo con una visión para lograr el objetivo anterior, y como un resultado, descubrieron que puede proveerse una formulación líquida estable que contiene una alta concentración de anticuerpos al agregar un aminoácido, arginina o una sal de la misma, como un estabilizador para así completar la presente invención.

Es decir, la presente invención proporciona lo siguiente:

(1) Una formulación líquida estable que contiene anticuerpos que se caracteriza por comprender arginina y metionina.

- 4 -

(2) La formulación de (1) comprende adicionalmente un agente regulador de histidina.

(3) La formulación de (1) ó (2) comprende adicionalmente un agente tensoactivo.

(4) La formulación de (1) a (3) que contiene el anticuerpo en una cantidad de al menos 50 mg/ml.

(5) La formulación de (1) a (3) que contiene el anticuerpo en una cantidad de al menos 100 mg/ml.

(6) La formulación de (1) a (3) que contiene el anticuerpo en una cantidad de al menos 120 mg/ml.

(7) La formulación de (1) a (6) en donde el anticuerpo es un anticuerpo anti-IL-6 de receptor.

(8) Una formulación líquida estable que contiene un anticuerpo anti-IL-6 de receptor que se caracteriza por comprender arginina o metionina.

(9) La formulación de (1) a (8) en donde el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o anticuerpo humano.

(10) La formulación de (1) a (9) comprende adicionalmente triptofano.

(11) La formulación de (1) a (10) contiene el pH en una escala de 4 a 8.

(12) La formulación de (1) a (11) en donde la arginina está presente en una cantidad de 50 a 1500mM.

(13) La formulación de (1) a (12) tiene una viscosidad de 2 a 15 mPa·s.

(14) La formulación de (1) a (13), la cual es estable a 22-28°C por al menos 6 meses.

(15) La formulación de (1) a (13) se caracteriza porque se inhibe la

14

- 5 -

dimerización de las moléculas de anticuerpo.

(16) La formulación de (1) a (13) se caracteriza porque se inhibe la desamidación de las moléculas de anticuerpo.

(17) La formulación de (1) a (13) la cual es para la administración subcutánea.

(18) La formulación de (1) a (13) la cual no se sujetó a la liofilización durante la preparación de la formulación.

(19) Un método para inhibir la desamidación de moléculas de un anticuerpo en una formulación líquida que contiene el anticuerpo, que comprende agregar arginina a la formulación líquida.

(20) Un método para inhibir la dimerización de moléculas de un anticuerpo en una formulación líquida que contiene el anticuerpo, que comprende agregar arginina y metionina a la formulación líquida.

Ventajas de la invención

Por medio de la presente invención, se provee una formulación líquida que contiene una alta concentración de un anticuerpo con el cual no es necesaria la reformulación por concentración por liofilización y por lo tanto, no requiere reconstitución. La formulación líquida que contiene anticuerpos de acuerdo con la presente invención puede almacenarse en un estado líquido por un largo tiempo. Ya que la formulación líquida que contiene anticuerpos de acuerdo con la presente invención puede producirse por medio de un procedimiento que no incluye el paso de liofilización, no es necesaria la adición de una azúcar o similar como un agente crioprotector.

—
—
—

BREVE DESCRIPCION DE LOS DIBUJOS

La figura 1 muestra un cromatograma común del ejemplo 1.

La figura 2 muestra los resultados de la evaluación de la cromatografía de permeación de gel (SEC) en el ejemplo 1.

La figura 3 muestra los resultados de la evaluación de la cromatografía de permeación de gel (SEC) en el ejemplo 1.

La figura 4 muestra un cromatograma común del ejemplo 2.

La figura 5 muestra los resultados de la evaluación de la cromatografía de intercambio de iones (IEC) en el ejemplo 2.

La figura 6 muestra los resultados de la evaluación de la cromatografía de intercambio de iones (IEC) en el ejemplo 2.

La figura 7 muestra los resultados de la evaluación de la cromatografía de permeación de gel (SEC) en el ejemplo 3.

La figura 8 muestra los resultados de la evaluación de la cromatografía de intercambio de iones (IEC) en el ejemplo 3.

DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención ahora se describirá detalladamente.

En la presente invención, "formulación líquida que contiene anticuerpos" significa una formulación líquida que contiene un anticuerpo como un componente activo, el cual se prepara de tal manera que pueda administrarse a un



- 7 -

animal tal como el humano y el cual se produce preferiblemente por medio de un procedimiento que no incluye un paso de liofilización.

La formulación líquida que contiene anticuerpos de acuerdo con la presente invención es una formulación farmacéutica líquida que contiene anticuerpos en una alta concentración, la cual preferiblemente tiene una concentración de anticuerpos de menos de 50 mg/mL, más preferiblemente no menos de 100 mg/mL, incluso más preferiblemente menos de 120 mg/mL e incluso más preferiblemente menos de 150 mg/mL. Debe observarse que no se ha desarrollado una formulación líquida que contiene anticuerpos en una concentración de 120 mg/mL o más alta o preferiblemente 150 mg/mL o más alta, para uso comercial. A saber, la presente invención permite por primera vez utilizar una formulación líquida que contiene anticuerpos en esta alta concentración.

Además, considerando el procedimiento de elaboración, la concentración más alta de un anticuerpo en la formulación líquida de acuerdo con la presente invención puede ser generalmente 300 mg/mL, preferiblemente 250 mg/mL y más preferiblemente 200 mg/mL. Por lo tanto, la formulación líquida que contiene anticuerpos de acuerdo con la presente invención preferiblemente tiene una concentración de anticuerpos de 50 a 300 mg/mL, más preferiblemente de 100 a 300 mg/mL, incluso más preferiblemente de 120 a 250 mg/mL, e incluso más preferiblemente de 150 a 200 mg/mL.

El anticuerpo que se va a utilizar en la presente invención no está restringido mientras se una a un antígeno deseado. El anticuerpo puede ser un anticuerpo policlonal o un anticuerpo monoclonal, aunque se prefiere un anticuerpo monoclonal ya que un anticuerpo que tiene propiedades uniformes puede

producirse de manera estable.

Un anticuerpo monoclonal que pueda utilizarse en la presente invención no sólo incluye anticuerpos monoclonales originados de un animal tal como un humano, ratón, rata, hámster, conejo, oveja, camello o mono, sino que también incluye anticuerpos recombinantes monoclonales modificados tal como anticuerpo quimérico, anticuerpo humanizado y anticuerpo biespecífico. La clase de inmunoglobulina del anticuerpo no está restringida y puede ser cualquiera de las clases que incluyen IgG tales como IgG1, IgG2, IgG3 y IgG4, IgA, IgD, IgE y IgM. Entre estas clases, se prefieren IgG e IgM.

El anticuerpo que puede utilizarse en la presente invención no sólo incluye anticuerpos completos, sino que también fragmentos de anticuerpo tal como Fv, Fab y F(ab)₂; y anticuerpos de peso molecular bajo tal como Fv de una cadena (scFv, sc(Fv)₂, diacuerpos tales como el dímero scFv) que tiene una o más especificidades, preparado al unir las regiones variables de una anticuerpo a través de un aglutinante tal como un aglutinante de péptido.

Los anticuerpos antes mencionados que pueden utilizarse en la presente invención pueden prepararse por medio de métodos que los expertos en la técnica conocen bien.

Un hibridoma que produce un anticuerpo monoclonal puede prepararse de la siguiente manera, básicamente utilizando una técnica conocida. Es decir, el hibridoma puede prepararse al vacunar un animal con un antígeno deseado o células que expresan el antígeno deseado como un antígeno sensibilizador por medio de un método estándar; fusionando los inmunocitos obtenidos con las células madre conocidas por un medio de fusión celular y haciendo pruebas de una célula

productora de anticuerpos monoclonales (hibridoma) por un método de prueba estándar. La preparación de un hibridoma puede llevarse a cabo, por ejemplo, por el método de acuerdo con el método de Milstein et al (Kohler, G. y Milstein, C., *Methods Enzymol.* (1981) 73: 3-46). En los casos en donde la inmunogenicidad del antígeno es baja, el antígeno puede estar unido a una macromolécula antigénica tal como albúmina y el conjugado resultante puede utilizarse como un inmunógeno.

Pueden emplearse los anticuerpos recombinantes, los cuales se preparan por la técnica de recombinación genética en la que un gen antígeno se clona a partir de un hibridoma, incorporando el gen en un vector adecuado, introduciendo el vector en una hospedera y haciendo que la hospedera produzca el anticuerpo (ver, por ejemplo, Carl, A. K. Borrebaeck, James, W. Larrick, *THERAPEUTIC MONOCLONAL ANTIBODIES*, publicado en el Reino Unido por MACMILLAN PUBLISHERS LTD, 1990). Más específicamente, un ADNc que codifica la región variable (región V) en el anticuerpo está sintetizado a partir de ARNm de un hibridoma que utiliza una transcriptasa inversa. Si se obtiene un ADN que codifica la región V del anticuerpo deseado, entonces se liga el ADN a un ADN que codifica la región constante (región C) de un anticuerpo deseado y el ADN ligado resultante se introduce en un vector de expresión. Alternativamente, un ADN que codifica la región V del anticuerpo puede incorporarse en un vector de expresión que contiene el ADN que codifica la región C del anticuerpo. El ADN se incorpora en el vector de expresión de tal manera que el ADN se expresa bajo el control de una región que controla la expresión tal como un potenciador o promotor. Después las células hospederas se transforman con el vector de expresión resultante y el anticuerpo puede expresarse por medio de las células hospederas.

En la presente invención, pueden utilizarse los anticuerpos recombinantes artificialmente modificados para el propósito de reducir la heteroantigenicidad al humano, tal como los anticuerpos quiméricos y anticuerpos humanizados. Estos anticuerpos modificados se pueden producir por métodos conocidos. Un anticuerpo quimérico es un anticuerpo que comprende regiones variables en la cadena pesada y la cadena ligera en un anticuerpo de un animal diferente al humano, tal como ratón y las regiones constantes en la cadena pesada y la cadena ligera en un anticuerpo de humano y pueden obtenerse al ligar un ADN que codifica la región variable en el anticuerpo de ratón con un ADN que codifica la región constante en el anticuerpo humano, incorporando el ADN obtenido en un vector de expresión, introduciendo el vector de expresión en una hospedera y haciendo que la hospedera produzca el anticuerpo.

El anticuerpo humanizado también es llamado anticuerpo humano reconfigurado y se obtiene al transplantar la CDR (región determinante complementaria, por sus siglas en inglés) de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón a la región determinante complementaria de un anticuerpo humano. También se conoce una técnica de recombinación genética estándar para preparar el anticuerpo humanizado. Específicamente, un ADN diseñado de tal manera que las CDR del anticuerpo de ratón y la región estructural (FR) del anticuerpo humano se ligan se sintetiza por el método de PCR a partir de muchos oligonucleótidos preparados para tener regiones traslapadas en sus terminales. El ADN obtenido está ligado a un ADN que codifica la región constante de un anticuerpo humano y el ADN resultante se introduce en un vector de expresión. El vector de expresión se introduce en una hospedera y la hospedera está hecha para producir el anticuerpo humanizado (ver

EP 239400 A y WO 96/02576). Mientras se forma el FR del anticuerpo humano que se va a ligar a través de la CDR, una de las regiones determinantes complementarias, se selecciona un buen sitio de unión de antígeno. Tal como se requiere, un aminoácido en la región determinante complementaria puede sustituirse para que la región determinante de complementariedad del anticuerpo humano reconfigurado forma un sitio adecuado de unión de antígeno (Sato, K. et al., Cancer Res. (1993) 53, 851-856).

Se conocen los métodos para obtener un anticuerpo humano. Por ejemplo, puede obtenerse un anticuerpo humano deseado que tiene una actividad de unión a un antígeno deseado, sensibilizando *in vitro* los linfocitos humanos con el antígeno deseado o con las células que expresan el antígeno deseado; fusionando los linfocitos sensibilizados con las células de mieloma humano, por ejemplo, células U266; y obteniendo el anticuerpo de las células (ver JP 1-59878 B). También se puede obtener un anticuerpo humano deseado al inmunizar un animal transgénico que tiene todos los repertorios de genes de anticuerpo humano con el antígeno (ver WO 93/12227, WO 92/03918, WO 94/02602, WO 94/25585, WO 96/34096 y WO 96/33735). Además, también se conoce una técnica con la cual puede obtenerse un anticuerpo humano al cribar utilizando una genoteca de anticuerpo humano. Por ejemplo, se expresa una región variable de un cuerpo humano en la forma de un anticuerpo de una cadena (scFv) en la superficie de un fago al utilizar un método de muestra de fago y el fago que se une al antígeno puede seleccionarse. Al analizar el gen del fago seleccionado, se puede determinar la secuencia de ADN que codifica la región variable del anticuerpo humano que se une al antígeno. Si se determina la secuencia de ADN del scFv que se une al

antígeno, se construye un vector de expresión adecuado que contiene la secuencia y puede obtenerse el anticuerpo humano. Estos métodos ya se conocen, y se pueden usar como referencia WO 92/01047, WO 92/20791, WO 93/06213, WO 93/11236, WO 93/19172, WO 95/01438 y WO 95/15388.

En los casos en los que el gen de anticuerpo se aísla una vez y el gen se introduce en una hospedera adecuada para preparar el anticuerpo, pueden utilizarse las combinaciones adecuadas de la hospedera y el vector de expresión. En los casos en donde las células eucarióticas se utilizan como la hospedera, pueden utilizarse células animales, células vegetales y células fúngicas. Las células animales conocidas incluyen (1) células de mamífero, por ejemplo, CHO, COS, mieloma, BHK (riñón de hámster bebé), HeLa y Vero; (2) células de anfibio, por ejemplo, *Xenopus oocito* y (3) células de insecto, por ejemplo, sf9, sf21 y Tn5. Las células vegetales conocidas incluyen células originadas de plantas que pertenecen al género *Nicotiana*, por ejemplo, *Nicotiana tabacum*, y las células pueden estar sujetas a cultivos callosos. Las células fúngicas incluyen las células originadas de almidones, por ejemplo, aquellas que pertenecen al género *Saccharomyces* tal como *Saccharomyces cerevisiae*; y las bacterias filamentosas, por ejemplo, aquellas que pertenecen al género *Aspergillus* tal como *Aspergillus niger*. En los casos donde se utilizan las células procarióticas hay sistemas de producción que utilizan células bacterianas. Las células bacterianas conocidas incluyen células *E. coli* y células *Bacillus subtilis*. El anticuerpo se obtiene al introducir un gen de anticuerpo deseado en estas células por transformación y cultivando las células transformadas *in vitro*.

Los anticuerpos en la forma de fragmentos de anticuerpo, anticuerpos

de peso molecular bajo y anticuerpos modificados también pueden utilizarse como el anticuerpo en la presente invención. Los ejemplos de los fragmentos de anticuerpo y los anticuerpos de peso molecular bajo incluyen Fab, F(ab')₂, Fv, y Fv de una cadena (scFv, sc(Fv)₂ y similares). con una o más especificidades, preparados al ligar los Fv en la cadena H y la cadena L a través de un aglutinante adecuado (Huston, J. S. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. E.U.A. (1988) 85, 5879-5883). Específicamente, un anticuerpo se trata con papaína o pepsina para generar fragmentos de anticuerpo o se construye un gen que codifica estos fragmentos de anticuerpo y su gen se expresa en células hospederas adecuadas después de introducir el gen en un vector de expresión (ver, por ejemplo, Co, M.S. et al., T. Immunol. (1994) 152, 2968-2976 ; Better, M. and Horwitz, A. H., Methods Enzymol. (1989) 178, 476-496; Pluckthun, A. and Skerra, A., Methods Enzymol. (1989) 178, 497-515; Lamoyi, E., Methods Enzymol. (1986) 121, 652-663; Rousseaux, J. et al., Methods Enzymol. (1986) 121, 663-669; Bird, R. E. and Walker, B. W., Trends Biotechnol. (1991) 9, 132-137.

Los anticuerpos unidos a varias moléculas tal como polietilenglicol (PEG) también pueden utilizarse como anticuerpos modificados. El término "anticuerpo" utilizado en la presente invención también incluye estos anticuerpos modificados. Estos anticuerpos modificados se pueden obtener modificando químicamente un anticuerpo obtenido. Los métodos para llevar a cabo las modificaciones se establecen en la técnica.

Los ejemplos del anticuerpo contenido en la formulación de acuerdo con la presente invención incluyen, pero no están limitados a, anticuerpos del factor anti-tejido, anticuerpos anti-IL-6 de receptor, anticuerpos anti-IL-6, anticuerpos

monoclonales del antígeno HM1.24, anticuerpos de péptido relacionado con la hormona anti-paratiroidea (anticuerpos anti-PTHrP), anticuerpos anti-glipican-3, anticuerpos anti-gangliosido GM3, anticuerpos antagonistas anti-TPO de receptor, anticuerpos de sustitución de factor VIII-, anticuerpos anti-CD3, anticuerpos anti-CD20, anticuerpos anti-GPIIb/IIIa, anticuerpos anti-TNF, anticuerpos anti-CD25, anticuerpos anti-EGFR, anticuerpos anti-Her2/neu, anticuerpos anti-RSV, anticuerpos anti-CD33, anticuerpos anti-CD52, anticuerpos anti-IgE, anticuerpos anti-CD11a, anticuerpos anti-VEGF, anticuerpos anti-VLA4, anticuerpos anti-AXL, y así sucesivamente.

Los ejemplos preferidos de los anticuerpos humanos reconfigurados utilizados en la presente invención incluyen anticuerpos humanizados anti-interleucina (IL-6) de receptor (hPM-1 o MRA) (ver WO 92-19759), anticuerpos humanizados monoclonales de antígeno anti-HM1.24 (ver WO 98-14580), anticuerpos humanizados de péptido relacionado con la hormona anti-paratiroidea (anticuerpos anti-PTHrP) (ver WO 98-13388), anticuerpos humanizados del factor anti-tejido (ver WO 99-51743) y anticuerpos anti-glipican-3 IgG1κ humanizado (ver PCT/JP05/013103). Los anticuerpos humanizados especialmente preferidos en la presente invención son anticuerpos humanizados anti-IL-6 de receptor.

Igual que los anticuerpos humanos, se prefieren los anticuerpos anti-gangliosido GM3 recombinante IgM humano (ver WO 05-05636) y similares.

Al igual que los anticuerpos de peso molecular bajo, se prefieren los diacuerpos antagonistas anti-TPO de receptor (ver WO 02-33072), diacuerpos agonistas anti-CD47 (ver WO 01-66737) y similares.

Para evaluar la estabilidad de almacenamiento de la formulación

líquida que contiene una alta concentración de anticuerpos, los presentes inventores estudiaron los efectos de varios aditivos al realizar pruebas de aceleración térmica y pruebas de aceleración de luz. Como un resultado, se encontró que en las soluciones en las que una alta concentración de anticuerpo se disolvió en una solución reguladora que contiene arginina de aminoácidos, la cantidad del dímero generado fue menor en soluciones a las que no se agregó arginina. A partir de estos resultados, se encontró que la arginina es efectiva como un estabilizador para inhibir la dimerización. Además, en soluciones en las que una alta concentración de anticuerpo se disolvió en una solución reguladora que contiene arginina y metionina, el efecto inhibidor contra la dimerización se observó en una concentración total de arginina y metionina, la cual es menor que la concentración de la arginina sola necesaria para lograr el mismo efecto inhibidor. A partir de estos resultados, se encontró que el efecto sinérgico se obtiene por la adición de arginina y metionina en combinación. Además, se encontró que la desamidación de las moléculas de anticuerpo se inhibe por la adición de arginina. Estos resultados se ejemplifican como resultados de prueba obtenidos para una muestra que contiene un anticuerpo humanizado anti-IL-6 de receptor en una concentración de 180mg/ml.

De esta manera, al agregar arginina como un estabilizador, puede proveerse una formulación estable de anticuerpo en el cual la dimerización del anticuerpo se reduce y se previene la desamidación del anticuerpo. Por lo tanto, un primer aspecto de la presente invención se caracteriza por la adición de arginina a una solución, con lo cual la dimerización o desamidación de las moléculas de anticuerpo se inhibe en la formulación líquida resultante que contiene anticuerpos. Por consiguiente, una modalidad como una formulación líquida estable que contiene

anticuerpos se caracteriza porque contiene un anticuerpo y arginina en una solución reguladora. Además, como se describió anteriormente, una formulación líquida que contiene anticuerpos de la presente invención puede contener adicionalmente metionina en la solución con un efecto sinérgico obtenido por el uso de arginina y metionina en combinación. Por lo tanto, un segundo aspecto de la presente invención se caracteriza por la adición de arginina y metionina a una solución, con lo cual la dimerización, en particular, de las moléculas de anticuerpo se inhibe en la formulación líquida resultante que contiene anticuerpos. Por consiguiente, una modalidad como una formulación líquida estable que contiene anticuerpos se caracteriza porque contiene un anticuerpo, arginina y metionina y arginina en una solución reguladora.

De igual manera que la arginina utilizada en la presente invención, puede utilizarse cualquier compuesto de arginina *per se*, derivados de la misma y sales de la misma. Se prefieren L-arginina y sales de la misma.

De igual manera que la metionina utilizada en la presente invención, puede utilizarse cualquier compuesto de metionina *per se*, derivados de la misma y sales de la misma. Se prefieren L-metionina y sales de la misma.

En los casos donde la formulación líquida que contiene anticuerpos de acuerdo con la presente invención contiene arginina y no contiene metionina, la concentración de arginina es preferiblemente 50 a 1500mM, más preferiblemente 100 a 1000 mM, incluso más preferiblemente 200 a 700 mM. En los casos donde la formulación líquida que contiene anticuerpos de acuerdo con la presente invención contiene arginina y metionina, la concentración total de arginina y metionina es preferiblemente 50 a 1200 mM, por ejemplo, preferiblemente, la concentración de

arginina es 40 a 1000 mM y la concentración de metionina es 10 a 200 mM, más preferiblemente, la concentración de arginina es 50 a 700 mM y la concentración de metionina es 10 a 100 mM e incluso más preferiblemente, la concentración de arginina es 100 a 300 mm y la concentración de metionina es 10 a 50 mM.

La solución reguladora se prepara usando un agente regulador que es una sustancia para mantener un pH de la solución. En una formulación líquida que contiene anticuerpos de acuerdo con la presente invención, un pH de la formulación es preferiblemente 4 a 8, más preferiblemente 5.0 a 7.5, incluso más preferiblemente 5.5 a 7.2 e incluso más preferiblemente 6.0 a 6.5. Un agente regulador que puede utilizarse en la presente invención es uno que pueda ajustar el pH en esta escala y que sea farmacéuticamente aceptable. Los expertos en la técnica conocen tal un agente regulador y los ejemplos del mismo incluyen sales orgánicas tales como sales de ácido fosfórico (sodio o potasio) y carbonato de hidrógeno sódico; sales ácidas orgánicas tales como sales de ácido cítrico (sodio o potasio), acetato de sodio y succinato de sodio y ácidos tales como ácido fosfórico, ácido carbónico, ácido cítrico, ácido succínico, ácido málico y ácido glucónico. Además, también pueden utilizarse reguladores Tris, reguladores de Good tales como MES, MOPS y HEPES, histidina (por ejemplo, sal histidina de ácido clorhídrico). En la formulación líquida que contiene alta concentración de anticuerpos de acuerdo con la presente invención, la solución reguladora es preferiblemente un regulador de histidina o regulador de glicina y se prefiere especialmente un regulador de histidina. La concentración de la solución reguladora generalmente es 1 a 500 mM, preferiblemente 5 a 100 mM, incluso más preferiblemente 10 a 20 mM. En los casos donde se utiliza un regulador de histidina,

la solución reguladora contiene histidina en una concentración de preferiblemente 5 a 25 mM, más preferiblemente 10 a 20 mM.

Para la formulación líquida "estable" que contiene alta concentración de anticuerpos de acuerdo con la presente invención, no se observa un cambio importante cuando se almacena a una temperatura de refrigeración (2 a 8°C) por al menos 12 meses, preferiblemente por 2 años, y más preferiblemente por 3 años; o cuando se almacene a temperatura ambiente (22 a 28°C) por al menos 3 meses, preferiblemente 6 meses, y más preferiblemente 1 año. Por ejemplo, la cantidad total de dímeros y productos de degradación en la formulación cuando se almacena a 5°C por 2 años es 5.0% o menor, preferiblemente 2% o menor y más preferiblemente 1.5% o menor; o la cantidad total de dímeros y los productos de degradación en la formulación cuando se almacena a 25°C por 6 meses es 5.0% o menor, preferiblemente 2% o menor y más preferiblemente 1.5% o menor.

La formulación de acuerdo con la presente invención puede contener adicionalmente un agente tensoactivo.

Los ejemplos comunes del agente tensoactivo incluyen agentes tensoactivos no iónicos, por ejemplo, ésteres de ácidos grasos de sorbitán tales como monocaprilato de sorbitán, monolaurato de sorbitán y monopalmitato de sorbitán; ésteres de ácidos grasos de glicerina tales como monocaprilato de glicerol, monomiristato de glicerol y monoestearato de glicerol; ésteres de ácidos grasos de poliglicerol tales como monoestearato de decaglicerilo, diestearato de decaglicerilo y monolinoleato de decaglicerilo; ésteres de ácidos grasos de polioxietilen sorbitán tales como monolaurato de polioxietilen sorbitán, monooleato de polioxietilen sorbitán, monestearato de polioxietilen sorbitán, monopalmitato de polioxietilen

sorbitán, triolato de polioxietilen sorbitán y triestearato de polioxietilen sorbitán; ésteres de ácidos grasos de polioxietilen sorbitol tales como tetraestearato de polioxietilen sorbitol y tetra oleato de polioxietilen sorbitol; ésteres de ácidos grasos de polioxietilen glicerina tales como monoestearato de polioxietilen glicerilo; ésteres de ácidos grasos de polietilen glicol tales como diestearato de polietilen glicol; alquil éteres de polioxietileno tales como lauril éter de polioxietileno; alquil éteres de polioxietilen polioxipropileno tales como éter de polioxietilen polioxipropilen glicol , éter de polioxietilen polioxipropilen propilo y éter de polioxietilen polioxipropilen cetilo; alquil fenil éteres de polioxietileno tales como nonifenil éter de polioxietileno; aceites de ricino endurecidos con polioxietileno tales como aceite de ricino de polioxietileno y aceite de ricino endurecido con polioxietileno (aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno); derivados de cera de abeja de polioxietileno tales como cera de abeja de polioxietileno de sorbitol; derivados de lanolina de polioxietileno tales como lanolino de polioxietileno; agentes tensoactivos que tienen un HLB de 6 a 18 tales como amidas de ácidos grasos de polioxietileno, por ejemplo, octadecanamida de polioxietileno; agentes tensoactivos aniónicos, por ejemplo, sales de alquil sulfato que tienen un grupo alquilo de C_{10} - C_{18} tal como cetil sulfato de sodio, lauril sulfato de sodio y oleil sulfato de sodio; sales alquil éter de polioxietilen sulfato en el que el número promedio de moles de las unidades de óxido de etileno agregadas es 2 a 4 y el número de átomos de carbono del grupo alquilo es 10 a 18, tales como lauril sulfato de polioxietileno de sodio; sales de alquil sulfosuccinato que tienen un grupo alquilo de C_8 - C_{18} , tales como lauril sulfosuccinato de sodio; agentes tensoactivos naturales como lecitina y glicerofosfolípidos; esfingofosfolípidos tal como esfingomielina; y ésteres de sacarosa de ácidos grasos de C_{12} - C_{18} . Estos

agentes tensoactivos pueden agregarse a la formulación de la presente invención individualmente o pueden agregarse dos o más de estos agentes tensoactivos en combinación.

Los agentes tensoactivos preferidos son ésteres de ácidos grasos de polioxietileno de sorbitán y alquil éteres de polioxietileno polioxipropileno y se prefieren especialmente los polisorbatos 20, 21, 40, 60, 65, 80, 81 y 85, y agentes tensoactivos de tipo Plurónico y se prefieren más los polisorbatos 20 y 80, y Plurónico F-68 (Poloxamer 188).

La cantidad del agente tensoactivo que se va agregar a la formulación de anticuerpo de acuerdo con la presente invención generalmente es 0.0001 a 10% (p/v), preferiblemente 0.001 a 5%, más preferiblemente 0.005 a 3%.

En otro aspecto de la presente invención, la formulación de acuerdo con la presente invención preferiblemente está compuesta sustancialmente por los siguientes componentes:

- A) anticuerpo anti-IL-6 de receptor;
- B) arginina y/o metionina y otro(s) aminoácido(s) adicional(es) (por ejemplo, triptofano) como un(os) componente(s) adicional(es) opcional(es),
- C) agente(s) regulador(es); y
- D) agente(s) tensoactivo(s).

El término "sustancialmente compuesto de" en la presente significa que un componente diferente a los componentes generalmente agregado a las formulaciones no está contenido, los componentes generalmente agregados a las formulaciones son componentes aditivos opcionales descritos a continuación, tales como agentes de suspensión, agentes solubilizantes, agentes isotónicos,

conservadores, inhibidores de absorción, diluyentes, vehículos, ajustadores de pH, agentes relajantes, agentes reductores que contienen azufre y antioxidantes.

El antes descrito inciso "B) arginina y/o metionina y los otros aminoácidos adicionales (por ejemplo, triptofano) como un componente adicional opcional" significa que incluye los casos donde la formulación contiene (b-1) arginina; (b-2) arginina y metionina y (b-3) metionina; respectivamente, como un aditivo de aminoácidos y además incluye los casos donde la formulación contiene adicionalmente otros aminoácidos. Un ejemplo preferido de otros aminoácidos es triptofano. Igual que el triptofano, pueden utilizarse cualquiera de los compuestos de triptofano *per se*, derivados de los mismos y sales de los mismos. Se prefieren L-triptofano y sales del mismo.

Como se requiera, puede agregarse a la formulación de acuerdo con la presente invención un agente de suspensión, agente solubilizante, agente isotónico, conservador, inhibidor de absorción, diluyente, vehículo, ajustador de pH, agente relajante, agente reductor que contiene azufre, antioxidante y similares.

Los ejemplos del agente de suspensión incluyen metilcelulosa, polisorbato 80, hidroxietilcelulosa, goma arábica, tragacanto en polvo, carboximetilcelulosa de sodio y monolaurato de polioxietilen sorbitán.

Los ejemplos del agente solubilizante incluyen aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno, polisorbato 80, nicotinamida, monolaurato de polioxietilen sorbitán, macrogol y etil éster de ácido graso de aceite de ricino.

Los ejemplos del agente isotónico incluyen cloruro de sodio, cloruro de potasio y cloruro de calcio.

Los ejemplos de los conservadores incluyen metil *p*-hidroxibenzoato,

etil *p*-hidroxibenzoato, ácido sórbico, fenol, cresol y clorocresol.

Los ejemplos del inhibidor de absorción incluyen albúmina de suero humano, lecitina, dextrano, copolímero de óxido de etilenóxido-propileno, hidroxipropilcelulosa, metilcelulosa, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno y polietilenglicol.

Los ejemplos del agente reductor que contiene azufre incluyen los compuestos que tienen un grupo sulfhidrilo, tales como N-acetilcisteína, N-acetil homocisteína, ácido tióctico, tioglicol, tioetanolamina, tioglicerol, tiosorbitol, ácido tioglicólico y sales de los mismos, tiosulfato de sodio, glutatona y tioalcanos de C₁-C₇.

Los ejemplos de los antioxidantes incluyen ácido eritórico, dibutilhidroxi tolueno, hidroxianisol, α -tocoferol butilado, acetato de tocoferol, ácido L--ascórbico y sales de los mismos, palmitato de L-ascórbico, estearato de L-ascórbico, hidrógeno sulfito de sodio, sulfito de sodio, triamil galato, propil galato, y agentes quelantes tales como etilendiamintetraacetato disódico (EDTA), pirofosfato de sodio y metafosfato de sodio.

La formulación líquida que contiene anticuerpos de acuerdo con la presente invención generalmente se administra a través de una vía paraenteral, por ejemplo, por inyección (inyecciones subcutáneas, intravenosas y similares), administración percutánea, transmucosal, transnasal o pulmonar, pero también puede administrarse oralmente. En la inyección subcutánea, la dosis de anticuerpo por administración es grande (aproximadamente 100 a 200 mg) mientras la cantidad de la solución de inyección está limitada para que la formulación de acuerdo con la presente invención se ajuste específicamente para la inyección subcutánea.

La relación de presión osmótica de la formulación líquida que contiene anticuerpos de acuerdo con la presente invención es preferiblemente alrededor de 0.5 a 4, más preferiblemente alrededor de 0.7 a 2 y incluso más preferiblemente alrededor de 1.

La viscosidad de la formulación líquida que contiene anticuerpos de acuerdo con la presente invención es preferiblemente alrededor de 2 a 15 mPa·s, más preferiblemente alrededor de 4 a 10 mPa·s. Debe observar que la viscosidad aquí descrita se mide por medio de un método de viscosímetro de rotación que utiliza un viscosímetro tipo cono-placa de acuerdo con Viscosity Determination/General Tests, the Japanese Pharmacopoeia, 15a edición.

Como se puede observar a partir de los resultados de los ejemplos descritos a continuación, de acuerdo con la presente invención, puede obtenerse una formulación líquida estable, en la que la dimerización y desamidación del anticuerpo durante el almacenamiento a largo plazo son pequeñas, al agregar a la formulación arginina sola o arginina y metionina o metionina sola.

Como otro aspecto de la presente invención, se provee un método para inhibir la desamidación en las formulaciones líquidas que contienen anticuerpos, el método comprende agregar arginina o una sal de la misma a la formulación.

Como otro aspecto de la presente invención, se provee un método para inhibir la dimerización del anticuerpo en las formulaciones líquidas que contienen anticuerpos, el método comprende agregar arginina y metionina a la formulación.

En los dos métodos antes descritos, el anticuerpo es preferiblemente

- 24 -

un anticuerpo anti-IL-6 de receptor, el cual es un anticuerpo humanizado o anticuerpo humano.

Ahora, se describirá la presente invención más detalladamente a manera de los ejemplos que se dan a continuación. Sin embargo, el alcance de la presente invención no está restringido a la misma.

EJEMPLOS

Muestra de anticuerpos

El anticuerpo humanizado anti-IL-6 de receptor fue un anticuerpo humanizado preparado de acuerdo con el método descrito en el ejemplo de referencia 2 en JP 8-99902 A que utiliza el promotor del factor I de elongación humano α descrito en el ejemplo 10 en WO 92/19759. Este anticuerpo ocasionalmente se mencionará como "MRA" en los cuadros en los ejemplos.

EJEMPLO 1

Efectos estabilizadores por la combinación de arginina y metionina

Las formulaciones líquidas que contienen el anticuerpo humanizado anti-IL-6 de receptor se evaluaron para una influencia en la estabilización de las formulaciones obtenidas por medio del uso de una combinación de arginina y metionina.

En este estudio, para evaluar los efectos por medio de la combinación de arginina y metionina, se prepararon las muestras de evaluación enumeradas A1

a A9. Las prescripciones para las muestras de evaluación fueron de la siguiente manera:

CUADRO 1-1

Prescripciones

Muestra No.	Anticuerpo mg/mL	Arg mM	Met mM	Polisorbato 80 mg/mL	Regulador de histidina mM	pH
A1	180	-	-	0.5	20.	6.0
A2	180	50	-	0.5	20	6.0
A3	180	100	-	0.5	20	6.0
A4	180	150	-	0.5	20	6.0
A5	180	200	-	0.5	20	6.0
A6	180	300	-	0.5	20	6.0
A7	180	100	10	0.5	20.	6.0
A8	180	100	30	0.5	20	6.0
A9	180	100	50	0.5	20	6.0

Para evaluar la estabilidad de las formulaciones líquidas, cada muestra se sujetó a una prueba de aceleración por calor (almacenada a 40°C por 3 meses y a 25°C por 6 meses, respectivamente). La pureza del anticuerpo antes y después de la prueba de aceleración por calor se evaluó por medio de la cromatografía de permeación de gel (SEC) Las condiciones analíticas fueron las siguientes:

Cromatografía de permeación de gel

La muestra se utilizó como la solución que se va a medir como fue.

Un microlitro de la solución que se va a medir se sujetó a la cromatografía líquida y las áreas pico del dímero, monómero y los productos de degradación de peso molecular bajo (LMW) se midieron por medio de un método

analítico automático y se determinaron las cantidades del mismo (%).

CUADRO 1-2

Condiciones analíticas

Columna: TSKgel G3000SWx1 7.8 mm I. D. x 30 cm (TOSOH)

Fase móvil: regulador de fosfato, pH 7.0 (50 mmoles/L regulador de fosfato, pH 7.0, que contiene 300 mmoles/L de cloruro de sodio y 0.05% de azida sódica)

Cantidad de la muestra inyectada: aproximadamente 180 µg en términos del anticuerpo humanizado anti-IL-6 de receptor

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Longitud de onda de detección: 280 nm

Fórmula 1

Ecuación de cálculo

Área total de todos los picos = Área pico del área del monómero + Área pico del dímero + Área pico de los productos de degradación de peso molecular bajo (LMW)

Cantidad de dímero (%) = (Área pico del dímero / Área total de todos los picos) x 100

Cantidad de los productos de degradación de peso molecular bajo (LMW) (%) = (Área pico de los productos de degradación de peso molecular bajo / Área total de todos los picos) x 100

En la figura 1 se muestra una cromatografía común.

Los resultados de la evaluación obtenidos por medio de la cromatografía de permeación de gel (SEC) se muestran en el cuadro 1 y las figuras 2 y 3. Como se muestra, la cantidad de dímero en las muestras (Muestras Nos. A2 a A6) a las cuales se agregó arginina, después de la aceleración a 40°C por 3 meses y a 25°C por 6 meses, respectivamente, fue menor que en la muestra (Muestra No. A1) a la cual no se agregó; y por consiguiente, se confirmó el efecto inhibidor de arginina contra la dimerización. También se confirmó que la cantidad de dímero se redujo proporcionalmente a la cantidad de la arginina agregada. Por otro lado, la cantidad de dímero en las muestras (Muestra Nos. A7 a A9) a la cual se agregaron arginina (100 mM) y metionina después de la aceleración a 40°C por 3 meses y a 25°C por 6 meses, respectivamente, fue menor a la que se agregó en las muestras (Muestra Nos. A3 y A4) que contienen 150 mM de arginina, cuya concentración fue aproximadamente la misma que la concentración total de los estabilizadores; y la cantidad de dímero fue aproximadamente la misma que en la muestra (Muestra No. A6) que tiene una concentración de arginina de 300 mM. Se considera que estos resultados indican que un efecto sinérgico en la inhibición de la dimerización se obtiene al combinar arginina y metionina.

No se observó la influencia de la arginina y metionina en la cantidad de los productos de degradación de peso molecular bajo.

CUADRO 1-3

CUADRO 1

	40°C-3meses		25°C-6meses	
	Dímero (%)	LMW (%)	Dímero (%)	LMW (%)
A1	2.70	1.25	1.88	0.48
A2	2.19	1.24	1.41	0.47
A3	2.00	1.34	1.33	0.49
A4	1.85	1.38	1.19	0.49
A5	1.62	1.37	1.09	0.49
A6	1.53	1.46	0.99	0.50
A7	1.58	1.29	1.11	0.45
A8	1.52	1.21	1.07	0.47
A9	1.48	1.32	1.03	0.47

EJEMPLO 2

Efecto inhibidor por la arginina contra la desamidación

Las formulaciones que contienen el anticuerpo humanizado anti-IL-6 de receptor se evaluaron para la influencia en la desamidación por arginina.

En este estudio, se prepararon las muestras de evaluación enumeradas A10 a a15 y enumeradas A16 a A18, que contienen diferentes cantidades de arginina y metionina, respectivamente. Las prescripciones para las muestras de evaluación fueron de la siguiente manera:



CUADRO 2-1

Prescripciones

Muestra No.	Anticuerpo mg/mL	Arg mM	Met mM	Polisorbato 80 mg/mL	Regulador de histidina mM	pH
A10	180	-	-	0.5.	20	6.0
A11	180	50	-	0.5	20	6.0
A12	180	100	-	0.5	20	6.0
A13	180	150	-	0.5	20	6.0
A14	180	200	-	0.5	20	6.0
A15	180	300	-	0.5	20	6.0
A16	180	-	10	0.5	20	6.0
A17	180	-	30	0.5	20	6.0
A18	180	-	50	0.5	20	6.0

Para evaluar la estabilidad de las formulaciones líquidas, cada muestra se sujetó a una prueba de aceleración por calor (almacenada a 40°C por 3 meses y a 25°C por 6 meses, respectivamente). Las purezas del anticuerpo antes y después de la prueba de aceleración por calor se evaluaron por medio de la cromatografía de intercambio de iones (IEC). Las condiciones analíticas fueron las siguientes:

Cromatografía de intercambio de iones

A cada muestra, se agregó agua purificada para ajustar la cantidad del anticuerpo humanizado anti-IL-6 de receptor a aproximadamente 1 mg en 1 mL de la muestra y la muestra resultante se utilizó como la muestra que se va a medir.

Treinta microlitros de la solución de muestra se sujetaron a la

- 30 -

cromatografía líquida y las áreas pico de los picos de MRA Pre, MRA Principal, MRA Secundario-1, MRA Secundario-2, MRA R-1, 1Q(H)-MRA, 2Q(H)-MRA y otras sustancias relacionadas (Otras) se midieron por medio de un método analítico automático y las cantidades de las mismas (%) se determinaron por medio de un método de porcentaje de área.

MRA Pre indica el total de los picos de las sustancias cada una eluída después de un tiempo de retención más corto que el del componente principal y se incluyó una pluralidad de productos de degradación, principalmente productos de desamidación del anticuerpo humanizado anti-IL-6 de receptor. Cuando la cantidad de producción de este Pre pico fue pequeño, se indicó la inhibición de desamidación del anticuerpo.

CUADRO 2-2

Condiciones analíticas

Columna: ProPac WCX-10 4 x 250 mm (DIONEX)

Fase móvil: Solución A: 25 mmoles/L MES solución reguladora, pH 6.1

Fase móvil: Solución B: 25 mmoles/L MES solución reguladora, pH 6.1

(con 250 mmoles/L de cloruro de sodio)

Cantidad de la muestra inyectada: aproximadamente 30 μ g en términos del anticuerpo humanizado anti-IL-6 de receptor

Velocidad de flujo: 0.5 mL/min

Longitud de onda de detección: 280 nm



Fórmula 2

Ecuación de cálculo

Área total de todos los picos = Gran total del Área total de picos MRA Pre + Área pico de MRA Principal + Área pico de MAR Secundario-1 + Área pico de MAR Secundario-2 + Área pico de MAR Secundario-3 + Área pico de MAR R-1 + Área total de los picos 1Q(H)-MRA + Área total de los picos 2Q(H)-MRA + Área pico de otros

Cantidad de MRA Pre (%) = $\left(\frac{\text{Área total de los picos MRA Pre}}{\text{Área total de todos los picos}} \right) \times 100$

En la figura 4 se muestra una cromatografía común. Pre MRA indica el total de los picos de las sustancias que aparecen antes de aquellas del componente principal.

Los resultados de la evaluación de la cromatografía de intercambio de iones se muestran en el cuadro 2 y las figuras 5 y 6. Como se muestra, la cantidad de Pre picos en las muestras (Muestras Nos. A11 a A15) a las cuales se agregó arginina, después de la aceleración a 40°C por 3 meses y a 25°C por 6 meses, respectivamente, fue menor a aquel en la muestra (Muestra No. A10) a la cual no se agregó arginina; y por consiguiente, se confirmó el efecto inhibidor de arginina contra la generación de Pre picos. También se confirmó que la cantidad de Pre picos se redujo proporcionalmente a la cantidad de la arginina agregada. Por otro lado, la cantidad de Pre picos en las muestras (Muestras Nos. A16 a A18) a las cuales se agregó metionina, después de la aceleración a 40°C por 3 meses y a 25°C por 6 meses, respectivamente, fue similar a aquel en la muestra (Muestra No. A10) a la

cual no se agregó arginina; y por consiguiente, se confirmó que no se observó la influencia de la adición de metionina.

CUADRO 2-3

CUADRO 2

	Pico Pre (%)	
	40°C-3meses	25°C-6meses
A10	56.2	32.3
A11	51.3	30.3
A12	50.7	29.3
A13	49.0	28.7
A14	47.8	28.5
A15	47.0	27.9
A16	55.7	31.2
A17	55.0	31.2
A18	55.3	31.4

EJEMPLO 3

Efectos estabilizadores por la combinación de arginina y metionina

Como en el ejemplo 1, las formulaciones líquidas que contienen el anticuerpo humanizado anti-IL-6 de receptor se evaluaron para una influencia en la estabilización de las formulaciones obtenidas por medio del uso de una combinación de arginina y metionina.

En este estudio, para evaluar los efectos de la combinación de arginina y metionina, se prepararon las muestras de evaluación enumeradas A19 a A27. Las prescripciones para las muestras de evaluación fueron de la siguiente

manera:

CUADRO 3-1
Prescripciones

Muestra No.	Anticuerpo mg/mL	Arg mM	Met mM	Polisorbato 80 mg/mL	Regulador de histidina mM	pH
A19	180	-	-	0.5	20	6.0
A20	180	50	-	0.5	20	6.0
A21	180	100	-	0.5	20	6.0
A22	180	150	-	0.5	20	6.0
A23	180	200	-	0.5	20	6.0
A24	180	300	-	0.5	20	6.0
A25	180	100	10	0.5	20	6.0
A26	180	100	30	0.5	20	6.0
A27	180	100	50	0.5	20	6.0

Para evaluar la estabilidad de las formulaciones líquidas, cada muestra se sujetó a una prueba de aceleración de luz (iluminancia total 1,200,000 lux y energía total de radiación ultravioleta cercana. 200 W·h/m²). Las purezas del anticuerpo antes y después de la prueba de aceleración de luz se evaluaron por medio de la cromatografía de permeación de gel (SEC) y cromatografía de intercambio de iones (IEC) como en los ejemplos 1 y 2.

Los resultados de la evaluación por cromatografía de permeación de gel (SEC) se muestran en el cuadro 3 y la figura 7. Como se muestra, la cantidad de dímero en las muestras (Muestras Nos. A20 a A24) a las cuales se agregó arginina, después de la prueba de aceleración de luz fue menor que aquel en la muestra (Muestra No. A19) a la cual no se agregó; y por consiguiente, se confirmó el efecto

inhibidor de arginina contra la dimerización. También se confirmó que la cantidad de dímero se redujo proporcionalmente a la cantidad de la arginina agregada. Por otro lado, la cantidad de dímero en las muestras (Muestra Nos. A25 a A27) a la cual se agregaron arginina (100 mM) y metionina después de la prueba de aceleración de luz fue menor a la que se agregó en la muestra (Muestra No. A22) que contiene 150 mM de arginina, cuya concentración fue aproximadamente la misma que la concentración total de los estabilizadores; y la cantidad de dímero fue menor que en las muestras (Muestras No. A23 y A24) que tiene concentraciones de arginina de 200mM y 300 mM, respectivamente. Se considera que estos resultados indican que un efecto sinérgico en la inhibición de la dimerización se obtiene al combinar arginina y metionina.

No se observó la influencia de la arginina y metionina en la cantidad de los productos de degradación de peso molecular bajo.

CUADRO 3-2

CUADRO 3

	1,200,000lux + 200 W · h/m ²	
	Dímero (%)	LMW (%)
A19	6.95	0.22
A20	6.75	0.24
A21	5.78	0.21
A22	5.08	0.19
A23	4.73	0.18
A24	4.13	0.18
A25	5.27	0.19

44

A26	4.05	0.17
A27	3.84	0.16

Después, los resultados de la evaluación por cromatografía de intercambio de iones (IEC) se muestran en el cuadro 4 y la figura 8.

Como se muestra, la cantidad de Pre picos en las muestras (Muestras Nos. A20 a A24) a las cuales se agregó arginina, después de la prueba de aceleración de luz fue menor que aquel en la muestra (Muestra No. A19) a la cual no se agregó; y por consiguiente, se confirmó el efecto inhibidor de arginina contra la formación del Pre picos. Además, se confirmó que mientras la cantidad de arginina aumenta, la cantidad de producción del Pre pico disminuye proporcionalmente. Por otro lado, la cantidad de dímero después de la prueba de aceleración de luz en las muestras (Muestra Nos. A25 a A27) a las cuales se agregaron arginina (100 mM) fue menor a la que se agregó en la muestra (Muestra No. A22) que contiene 150 mM de arginina, cuya concentración fue aproximadamente la misma que la concentración total de los estabilizadores; y fue menor que en las muestras (Muestras No. A23 y A24) que tiene concentraciones de arginina de 200mM y 300 mM, respectivamente. Se considera que estos resultados indican un efecto sinérgico en la inhibición de la formación del Pre pico por la combinación de arginina y metionina.



45

CUADRO 4

	Pico Pre (%)
	1,200,000lux + 200 W · h/m ²
A19	39.2
A20	38.6
A21	36.7
A22	35.7
A23	34.9
A24	34.9
A25	36.8
A26	35.0
A27	33.8



REIVINDICACIONES MODIFICADAS

1.- Una formulación líquida estable que contiene anticuerpos en una cantidad de 50 a 300 mg/ml, que comprende de 100 a 300 mM de arginina y de 10 a 50 mM de metionina, en donde el anticuerpo es un anticuerpo completo.

2.- La formulación de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada porque además comprende un agente regulador de histidina.

3.- La formulación de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada porque además comprende un agente tensoactivo.

4.- La formulación de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque contiene al anticuerpo en una cantidad de al menos 100 mg/ml.

5.- La formulación de conformidad con la reivindicación 3, caracterizada porque contiene al anticuerpo en una cantidad de al menos 120 mg/ml.

6.- La formulación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 5, caracterizada porque el anticuerpo es un anticuerpo receptor anti-IL-6.

7.- La formulación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 4 a 6, caracterizada porque tiene un pH en el rango de 4 a 8.

8.- La formulación de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque el anticuerpo es un anticuerpo humanizado o anticuerpo humano.

9.- La formulación de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque el anticuerpo es un anticuerpo receptor anti-IL-6 humanizado, la cantidad de agente tensoactivo es de 0.0001 a 10% (peso/volumen), y la concentración del agente regulador de histidina es de 1 a 500 mM.

10.- La formulación de conformidad con la reivindicación 7, caracterizada porque el anticuerpo es un anticuerpo receptor anti-IL-6 humanizado MRA, la cantidad de polisorbato 80 como el agente tensoactivo es de 0.005 a 3% (peso/volumen), la concentración del agente regulador de histidina es de 5 a 100 mM, y la concentración del anticuerpo es de 100 a 300 mg/ml.

11.- La formulación de conformidad con la reivindicación 9 o 10, caracterizada porque además comprende triptófano.

12.- La formulación de conformidad con la reivindicación 9 o 10, caracterizada porque tiene una viscosidad de 2 a 15 mPa·s.

13.- La formulación de conformidad con la reivindicación 9 o 10, caracterizada porque no estuvo sujeta a liofilización durante la preparación de la formulación.

14.- Un método para inhibir la dimerización de moléculas de un anticuerpo en una formulación líquida que contiene el anticuerpo en una cantidad de 50 a 300 mg/ml, que comprende agregar 100 a 300 mM arginina y 10 a 50 mM metionina a la formulación líquida, en donde el anticuerpo es un anticuerpo completo.

15.- El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizada porque el anticuerpo es un anticuerpo receptor anti-IL-6 humanizado, y la formulación comprende 1 a 500 mM de un agente regulador de histidina, y 0.0001 a 10% (peso/volumen) de un agente tensoactivo, y tiene un pH de 4 a 8.

16.- El método de conformidad con la reivindicación 14, caracterizado porque el anticuerpo es un anticuerpo receptor anti-IL-6 humanizado MRA, y la formulación comprende de 100 a 300 mg/ml del anticuerpo, de 5 a 100 mM de un agente regulador de histidina, y de 0.005 a 3% (peso/volumen) de polisorbato 80, y tiene un pH de 4 a 8.