

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE ANTICUERPO ANTI-TRBV9 Y USO DE LA MISMA

Campo de la invención

La presente invención se refiere al campo de la farmacia y la medicina, específicamente a composiciones farmacéuticas de anticuerpo anti-TRBV9 que pueden utilizarse para tratar una enfermedad o trastorno mediado por linfocitos T que portan un segmento TRBV9 dentro del receptor de células T.

Antecedentes de la invención

Las enfermedades autoinmunes están causadas por linfocitos T autorreactivos (Haroon N et al., Arthritis Rheum. 2013 Oct; 65(10):2645-54., Duarte J. et al., PloS One 2010 May 10; 5(5):e10558; Konig M. et al., Front Immunol 2016 Jan 25; 7:11). El papel principal en la aparición de clones de linfocitos T autorreactivos lo desempeña la interacción del receptor de células T que reconoce el antígeno (TCR) con proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH, HLA), que presentan en su superficie los péptidos procesados de proteínas intracelulares o los de proteínas de organismos patógenos. Varias enfermedades autoinmunes están asociadas a la presencia de una determinada variante del gen HLA en los seres humanos. Por consiguiente, el alelo HLA-B27 se asocia con la espondilitis anquilosante, la artritis reactiva y la enfermedad de Crohn. El riesgo de desarrollar enfermedades autoinmunes en los portadores de ciertas variantes alélicas del HLA puede explicarse por el hecho de que estos alelos presentan preferentemente ciertos péptidos que son autoantígenos, una respuesta inmunitaria contra los cuales desencadena el desarrollo de una enfermedad autoinmune. Uno de los posibles mecanismos subyacentes a una reacción autoinmune es la presentación, por parte de las moléculas del complejo de histocompatibilidad, de los péptidos de proteínas de origen bacteriano o vírico, que son homólogos a los péptidos propios del organismo, hecho que puede dar lugar a una respuesta inmunitaria contra los antígenos propios como consecuencia de la reactividad cruzada.

La técnica anterior establece que una secuencia de receptores de células T (TCR) es un marcador que permite identificar un clon de linfocitos T implicado en la patogénesis de una enfermedad autoinmune. Las subunidades de los receptores de células T pertenecen estructuralmente a la superfamilia de las inmunoglobulinas y están formadas por varios segmentos génicos. Las regiones variables del TCR forman el centro de unión al antígeno del TCR. Esto significa que son clon-específicos, es decir, que son diferentes en aquellos linfocitos T que reaccionan a antígenos diferentes.

Los linfocitos T (células T) se estimulan cuando los antígenos se unen a sus receptores (TCR). El TCR, una estructura definitoria de las células T, es un heterodímero transmembrana formado por una cadena alfa y beta o una cadena delta y gamma unidas por un enlace disulfuro. Dentro de estas cadenas hay regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que determinan el antígeno al que se unirá el TCR. El desarrollo del TCR se produce a través de un proceso de recombinación génica específico de los linfocitos, que ensambla una secuencia final a partir de un gran número de segmentos potenciales. Esta recombinación genética de segmentos del gen TCR en células T somáticas se produce durante las primeras fases de desarrollo en el timo. El locus del gen TCR α contiene segmentos génicos variables (V) y de unión (J) (V β y J β), mientras que el locus TCR β contiene un segmento génico D además de los segmentos V α y J α . Por consiguiente, la cadena α se genera a partir de la recombinación VJ y la cadena β participa en la recombinación VDJ.

El locus del gen de la cadena α del TCR consta de 46 segmentos variables (TRAV), 8 segmentos de unión (TRAJ) y la región constante. El locus del gen de la cadena β del TCR consta de 48 segmentos variables (TRBV) seguidos de dos segmentos de diversidad (TRBD), 12 segmentos de unión (TRBJ) y dos regiones constantes. (Bio-Rad. Mini-review | An overview of T cell receptors [Recurso electrónico] // Bio-Rad. URL: <https://www.bio-rad-antibodies.com/t-cell-receptor-minireview.html> (acceso: 24.04.2020)).

Hasta la fecha, se ha acumulado una cantidad significativa de datos que demuestran que el desarrollo de enfermedades asociadas al HLA-B27 se debe a la expansión de clones de linfocitos T antígeno-específicos.

La variante consensuada de los TCR autoinmunes se ha descrito en la espondilitis anquilosante (espondiloartritis axial radiográfica); se ha demostrado que está presente en el líquido sinovial y la sangre periférica de pacientes con espondilitis anquilosante y está ausente con la misma profundidad de análisis en donantes sanos, independientemente del estado alélico HLA*B27 (Faham M. et al., Arthritis Rheumatol. 2017; 69(4):774-784; Komech E et al. 12th EJI-EFIS Tatra Immunology Conference; 2016 Sep 3-7; Strbske Pleso, Slovakia. Abstract book p. 39). Dichos TCR pertenecen a la familia TRBV9 (según la nomenclatura IMGT).

Se ha demostrado que los receptores de células T que portan cadenas beta de la familia TRBV9 también están implicados en el desarrollo de una enfermedad autoinmune como la celiaquía (Petersen J et al., J Immunol. 2015; 194(12): 6112-22). También se encuentran en la superficie de las células T sujetas a malignización en linfomas de células T y leucemias de células T, incluido el linfoma de células

T causado por el virus de Epstein-Barr (VEB) (Toyabe S et al., Clin Exp Immunol. 2003; 134(1): 92-97).

Teniendo en cuenta lo anterior, la proteína TRBV9 puede servir como diana para un anticuerpo monoclonal citotóxico que inducirá el agotamiento de los linfocitos T TRBV9+ (linfocitos T TRBV9-positivos), incluidos los clones de linfocitos T autorreactivos patogénicos.

Los anticuerpos monoclonales anti-TRBV9 son conocidos en el estado de la técnica: WO2019/132738, WO2020/139171, WO2020/091635, WO2020/139175. La técnica anterior también proporciona una composición farmacéutica de anticuerpo anti-TRBV9 que comprende un tampón citrato (WO2020/139171). Sin embargo, los autores de la invención han descubierto que el anticuerpo anti-TRBV9 en una solución tampón de citrato tiende a agregarse, por lo que la composición de anticuerpo anti-TRBV9 que comprende una solución amortiguadora de citrato no será estable.

En relación con lo anterior, existe la necesidad de desarrollar composiciones farmacéuticas estables de anticuerpo anti-TRBV9 que puedan utilizarse como medicamento para tratar una enfermedad o trastorno mediado por el receptor de células T humanas portador de TRBV9.

Descripción detallada de la invención

Definiciones

A menos que se definan de otro modo en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en relación con la presente invención tendrán el mismo significado que suelen entender los expertos en la técnica.

Además, salvo que el contexto exija lo contrario, los términos en singular incluirán los términos en plural, y los términos en plural incluirán los términos en singular.

Tal como se utiliza en la presente descripción y en las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto dicte lo contrario, las palabras "tener", "incluir" y "comprender" o sus variaciones, como "tiene", "incluye", o "comprende", se entenderá que implican la inclusión de un número entero o grupo de números enteros indicado, pero no la exclusión de ningún otro número entero o grupo de números enteros.

El término "anticuerpo" o "inmunoglobulina" (Ig) incluye anticuerpos de longitud completa o cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno") o cadenas individuales de los mismos. El término "anticuerpo" en el ámbito de la presente invención se utiliza en el sentido más amplio y puede incluir, sin limitación, anticuerpos monoclonales (incluidos anticuerpos monoclonales de longitud completa), anticuerpos

policlonales, anticuerpos humanizados, totalmente humanos y anticuerpos quiméricos.

Un anticuerpo de longitud completa se refiere a una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro. Cada cadena pesada comprende una región variable de la cadena pesada (abreviada como VH en la presente descripción) y una región constante de la cadena pesada. La región constante es idéntica en todos los anticuerpos del mismo isotipo, pero difiere en los anticuerpos de diferentes isotipos. Las cadenas pesadas γ , α y δ tienen una región constante compuesta por tres dominios constantes CH1, CH2 y CH3 (en línea), y una región bisagra para añadir flexibilidad (Woof J., Burton D., Nat Rev Immunol 4, 2004, pp.89-99). En los mamíferos, se conocen sólo dos tipos de cadenas ligeras denotadas por lambda (λ) y kappa (κ). Cada cadena ligera está formada por una región variable de la cadena ligera (abreviada en la presente descripción como VL) y una región constante de la cadena ligera. La longitud aproximada de una cadena ligera es de 211 a 217 aminoácidos. Preferentemente, la cadena ligera es una cadena ligera lambda (λ), y el dominio constante CL es preferentemente C lambda (λ).

Las regiones VL y VH pueden subdividirse a su vez en regiones de hipervariabilidad denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), situadas entre regiones más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDRs y cuatro FRs, dispuestos desde el amino terminal al carboxilo terminal en el siguiente orden FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, incluyendo varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (C1q) del sistema clásico del complemento.

El término "porción de unión a antígeno" del anticuerpo o "fragmento de unión a antígeno", tal como se utiliza en la presente descripción, se refiere a uno o más fragmentos de anticuerpo que conservan la capacidad de unirse específicamente a un antígeno. Se ha demostrado que la función de unión al antígeno del anticuerpo puede ser realizada por fragmentos de un anticuerpo completo. Tal y como se utiliza en la presente invención, el término "fragmento de unión a antígeno" significa un fragmento Fab, es decir, un fragmento monovalente, compuesto por los dominios VL, VH, CL y CH1, que está unido al monómero del fragmento Fc.

El término "variable" se refiere al hecho de que ciertas porciones de los dominios variables difieren mucho en la secuencia

entre los anticuerpos. El dominio V funciona de mediador en la unión al antígeno y determina la especificidad de cada anticuerpo particular para su antígeno concreto. Sin embargo, la variabilidad no se distribuye uniformemente a lo largo de los 110 aminoácidos de los dominios variables. En cambio, las regiones V consisten en fragmentos invariables denominados regiones marco (FR) de 15-30 aminoácidos, separados por regiones más cortas de extrema variabilidad denominadas "regiones hipervariables" o CDR. Los dominios variables de las cadenas pesadas y ligeras nativas comprenden cada uno cuatro FR, que adoptan en gran medida una configuración de lámina beta, conectadas por tres regiones hipervariables, que forman bucles que conectan, y en algunos casos forman parte, de la estructura de lámina beta. Las regiones hipervariables de cada cadena se mantienen unidas en estrecha proximidad por los FR y, con las regiones hipervariables de la otra cadena, contribuyen a la formación del sitio de unión al antígeno de los anticuerpos (véase Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*. 5ª Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Los dominios constantes no intervienen directamente en la unión del anticuerpo al antígeno, sino que presentan diversas funciones efectoras, como la participación del anticuerpo en la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC).

El término "región hipervariable" según la presente descripción se refiere a los residuos de aminoácidos del anticuerpo que son responsables de la unión al antígeno. La región hipervariable comprende típicamente residuos de aminoácidos de una "región determinante de la complementariedad" o "CDR" y/o aquellos residuos de un "bucle hipervariable".

"Esquema de numeración de Kabat" o "numeración según Kabat" se refiere en la presente invención a un sistema de numeración de residuos de aminoácidos que son más variables (es decir, hipervariables) que otros residuos de aminoácidos en regiones variables de cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos (Kabat et al. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 190:382-93 (1971); Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242 (1991)).

El anticuerpo de la presente invención "que se une" a un antígeno diana se refiere a un anticuerpo que se une al antígeno con suficiente afinidad como para que el anticuerpo pueda utilizarse como agente diagnóstico y/o terapéutico dirigido a una proteína o célula o tejido que exprese el antígeno, y que reaccione ligeramente de forma cruzada con otras proteínas. Según los métodos analíticos: clasificación celular activada por fluorescencia (FACS), radioinmunoanálisis (RIA) o ELISA, en tales realizaciones, el grado

de unión del anticuerpo a una proteína no diana es inferior al 10% de la unión del anticuerpo a una proteína diana específica. Con respecto a la unión del anticuerpo a una molécula diana, el término "unión específica" o las frases "se une específicamente a" o "es específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular significa una unión que es significativamente (medible) diferente de una interacción no específica.

La unión específica puede medirse, por ejemplo, determinando la unión de una molécula en comparación con la unión de una molécula de control. Por ejemplo, la unión específica puede determinarse por competencia con otra molécula similar a la diana, por ejemplo, un exceso de diana no marcada. En este caso, la unión específica se indica si la unión de la diana marcada a una sonda es inhibida competitivamente por el exceso de diana no marcada. Como se utiliza en la presente descripción, el término "unión específica" o las frases "se une específicamente a" o "es específico para" un polipéptido particular o un epítipo en un polipéptido diana particular puede describirse mediante el ejemplo de una molécula que tiene una KD (constante de afinidad) para la diana de al menos unos 200 nM, o al menos unos 150 nM, o al menos unos 100 nM, o al menos unos 60 nM o al menos unos 50 nM, o al menos unos 40 nM, o al menos unos 30 nM, o al menos unos 20 nM, o al menos unos 10 nM, o al menos unos 8 nM, o al menos unos 6 nM, o al menos unos 4 nM, o al menos unos 2 nM, o al menos unos 1 nM, o mayor. En una realización, el término "unión específica" se refiere a la unión en la que una molécula se une a un polipéptido o epítipo particular en un polipéptido particular sin unirse sustancialmente a cualquier otro polipéptido o epítipo en un polipéptido.

El término "anticuerpo monoclonal" o "mAb" se refiere a un anticuerpo que se sintetiza y aísla como una población clonal individual de células.

El término "anticuerpo recombinante" se refiere a un anticuerpo que se expresa en una célula o línea celular que comprende secuencia(s) de nucleótidos que codifican anticuerpos, en la que dicha(s) secuencia(s) de nucleótidos no está(n) asociada(s) a la célula en la naturaleza.

El término "aislado" aplicado para describir diversos anticuerpos según la presente invención se refiere a un anticuerpo que ha sido identificado y aislado y/o regenerado a partir de una célula o cultivo celular, en el que se expresa el anticuerpo. Las impurezas (componentes contaminantes) del entorno natural son materiales que suelen interferir con los usos diagnósticos o terapéuticos del polipéptido, y pueden incluir enzimas, hormonas y

otros solutos proteicos o no proteicos. El polipéptido aislado suele prepararse mediante al menos una etapa de purificación.

Los términos "anticuerpo anti-TRBV9", "anticuerpo contra TRBV9", "anticuerpo que se une específicamente a la cadena beta de la familia TRBV9" y "anticuerpo contra la cadena beta de la familia TRBV9" son intercambiables en el ámbito de la presente invención y se refieren a un anticuerpo que se une específicamente al epítipo de la cadena beta de la familia TRBV9 del receptor de células T humanas.

El término "composición farmacéutica" se refiere a una composición y/o formulación que comprende el anticuerpo anti-TRBV9 en una cantidad terapéuticamente eficaz y excipientes o sustancias auxiliares (portadores, diluyentes, cargas, disolventes, etc.), cuya elección y proporciones dependen del tipo y vía de administración y dosificación.

El término "excipiente" o "sustancia auxiliar" se utiliza aquí para describir cualquier ingrediente distinto del compuesto o compuestos de la presente invención. Son sustancias de naturaleza inorgánica u orgánica que se utilizan en la producción/fabricación farmacéutica para dar a los medicamentos las propiedades fisicoquímicas necesarias.

El término "composición acuosa", tal como se utiliza aquí, se refiere a una composición a base de agua, el agua en la composición puede ser: agua, agua para inyecciones, solución salina fisiológica (solución acuosa de cloruro de sodio al 0,9%-1,0%).

El término "liofilizado" utilizado aquí se refiere a una formulación que ha sido sometida a un proceso conocido en la técnica como liofilización, que incluye la congelación de la formulación seguida de la eliminación del hielo del contenido congelado.

Una composición farmacéutica es "estable" si el agente activo conserva la estabilidad física y/o la estabilidad química y/o la actividad biológica del mismo durante la vida útil especificada a una temperatura de almacenamiento, por ejemplo, de entre 2 y 8 °C. Además, el agente activo puede conservar tanto la estabilidad física como la química, así como la actividad biológica. El periodo de almacenamiento se ajusta en función de los resultados de la prueba de estabilidad en condiciones de envejecimiento acelerado o natural.

El término "almacenamiento a largo plazo" o "estabilidad a largo plazo" deben entenderse en el sentido de que una composición farmacéutica puede almacenarse durante tres meses o más, durante seis meses o más, durante un año o más, y la composición puede tener una vida útil estable mínima de al menos dos años también.

El término "agente tampón" se refiere a un componente ácido o básico (típicamente un ácido débil o una base débil) del tampón o solución tampón. Un agente tampón ayuda a mantener el valor del pH

de una solución dada en un valor predeterminado o cerca de él, y los agentes tampón se eligen generalmente para complementar el valor predeterminado. Un agente tampón puede ser un compuesto único que da lugar a un efecto tampón deseado, especialmente cuando dicho agente tampón se mezcla con (y es convenientemente capaz de intercambiar protones con) una cantidad adecuada (dependiendo del valor predeterminado deseado) del correspondiente "conjugado ácido/base" del mismo.

El término "tampón" o "solución tampón" o "sistema tampón" se refiere a una solución acuosa que comprende una mezcla de un ácido (típicamente un ácido débil, como por ejemplo ácido acético, ácido cítrico) y una base conjugada del mismo (como por ejemplo una sal de acetato o citrato, por ejemplo acetato de sodio, citrato de sodio, así como hidratos de dichas sales, por ejemplo, acetato de sodio trihidratado) o alternativamente una mezcla de una base (típicamente una base débil, p. ej. histidina) y un ácido conjugado de la misma (p. ej. clorhidrato de histidina o clorhidrato de histidina monohidratado o clorhidrato de L-histidina (h/c) monohidratado (m/h) o L-histidina h/c m/h o histidina h/c m/h). El valor del pH de una "solución tampón" sólo cambia ligeramente al añadirle una pequeña cantidad de base fuerte o de ácido fuerte, así como al diluirla o concentrarla, debido al "efecto tampón" impartido por un "agente tampón".

Las soluciones tampón pueden ser, por ejemplo, acetato, fosfato, citrato, histidina, succinato y otras soluciones tampón. Generalmente, la composición farmacéutica tiene preferentemente un pH en el rango de 4,0 a 8,0.

"Estabilizador" se refiere a un excipiente o una mezcla de dos o más excipientes que proporcionan la estabilidad física y/o química del agente activo.

Los términos "agente osmótico" o "agente regulador de la tonicidad", así como "osmolito", tal y como se utilizan en el presente documento, se refieren a un excipiente que puede proporcionar la presión osmótica necesaria de una solución líquida de anticuerpos. En algunas realizaciones, el agente regulador de la tonicidad puede aumentar la presión osmótica de una formulación líquida de anticuerpos hasta una presión isotónica, de manera que dicha formulación líquida de anticuerpos sea fisiológicamente compatible con las células del tejido del organismo de un sujeto. En otra realización, el agente regulador de la tonicidad puede contribuir a aumentar la estabilidad de los anticuerpos. La formulación "isotónica" es una formulación que tiene una presión osmótica equivalente a la de la sangre humana. Las formulaciones isotónicas suelen tener una presión osmótica de aproximadamente 239 a 376 mOsm/kg.

Tal como se utiliza aquí, el término "solubilizador" se refiere a un tensioactivo no iónico farmacéuticamente aceptable. Pueden utilizarse tanto un solubilizador como combinaciones de solubilizadores. Algunos ejemplos de solubilizadores son, sin limitación, el polisorbato 20 o el polisorbato 80, el poloxámero 184 o el poloxámero 188, o PLURONIC®.

Normalmente, los aminoácidos son L-aminoácidos. Por ejemplo, si se utiliza histidina y clorhidrato de histidina monohidratado, suele ser L-histidina y clorhidrato de L-histidina monohidratado. Por ejemplo, si se utiliza prolina, suele ser L-prolina. También pueden utilizarse equivalentes de aminoácidos, por ejemplo, sales de prolina farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, clorhidrato de prolina).

El término "medicamento" o "formulación" se refiere a una sustancia (o una mezcla de sustancias en forma de composición farmacéutica) en forma de comprimidos, cápsulas, soluciones, ungüentos y otras formas listas destinadas a la restauración, mejora o modificación de las funciones fisiológicas en humanos y animales, y para el tratamiento y profilaxis de enfermedades, para el diagnóstico, anestesia, anticoncepción, cosmetología y otros.

El término "uso" se aplica a la posibilidad de utilizar la composición farmacéutica de anticuerpo anti-TRBV9 según la presente invención para tratar, aliviar el curso de la enfermedad o trastornos, acelerar la remisión, reducir la tasa de recurrencia de las enfermedades o trastornos.

El término "enfermedad o trastorno mediado por linfocitos T portadores de un segmento TRBV9 dentro del receptor de células T" se refiere a cualquier enfermedad o trastorno que esté directa o indirectamente asociado con linfocitos T portadores de un segmento TRBV9 dentro del receptor de células T, incluyendo etiología, desarrollo, progresión, persistencia o patología de una enfermedad o trastorno.

"Tratar", "tratamiento" y "terapia" se refieren a un método para aliviar o eliminar un trastorno biológico y/o al menos uno de los síntomas que lo acompañan. Tal y como se utiliza aquí, "aliviar" una enfermedad, trastorno o afección significa reducir la gravedad y/o la frecuencia de aparición de los síntomas de la enfermedad, el trastorno o la afección. Además, las referencias al "tratamiento" incluyen referencias al tratamiento curativo, paliativo y profiláctico.

El término "administración parenteral" se refiere a los regímenes de administración, típicamente realizados por inyección (infusión), e incluye, en particular, la inyección o infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratraqueal, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica,

intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal.

Abreviaturas

anti-TRBV9 (anti-TRBV9) - anticuerpo monoclonal contra TRBV9
CE - control de entrada
CD - congelación-descongelación
 k_D - parámetro de interacción de difusión
SH - agitar
Etiqueta - temperatura de agregación
Tonset - temperatura de inicio de la fusión
 T_m - punto de fusión
T - temperatura
TS - estrés térmico
C - concentración de proteínas
Osm - osmolalidad
TS50 96H - estrés térmico a 50°C durante 96 horas
 Δ TS50 96H - cambio en el parámetro de calidad tras un estrés térmico a 50°C durante 120 horas.
TS50 120H - estrés térmico a 50°C durante 96 horas
 Δ TS50 120H - cambio en el parámetro de calidad tras un estrés térmico a 50°C durante 120 horas.
Ácido 3,0 24H hidrólisis ácida a pH 3,0 y envejecimiento durante 1 o 24 horas
 Δ Ácido 3,0 24H - cambio en el parámetro de calidad tras estrés por hidrólisis ácida a pH 3,0 y envejecimiento durante 1 o 24 horas.
Básico 9,0 1H - hidrólisis básica a pH 9,0 y envejecimiento durante 1 hora
 Δ Básico 9,0 1H - cambio en el parámetro de calidad tras estrés por hidrólisis alcalina a pH 9,0 y envejecimiento durante 1 hora.
SH800 96H - agitación durante 96 horas a 800 rpm
 Δ SH800 96H - cambio en el parámetro de calidad tras agitación durante 96 horas a 800 rpm.
SH800 120H - agitación durante 120 horas a 800 rpm
 Δ SH800 120H - cambio en el parámetro de calidad tras agitar durante 120 horas a 800 rpm.
3 ciclos cong-desc - tres ciclos de congelación-descongelación
 Δ 3 ciclos cong-desc - cambio en el parámetro de calidad tras tres ciclos de congelación-descongelación.
CD 5C - cinco ciclos de congelación-descongelación
 Δ CD 5C - cambio en el parámetro de calidad tras cinco ciclos de congelación-descongelación.
IE HPLC - cromatografía líquida de alto rendimiento con intercambio iónico
SW - software
SE HPLC - líquido de alto rendimiento por exclusión de tamaño

n/d - no determinado
abs - cambio absoluto del parámetro de calidad
C con - concentración después de concentrar
DSF - fluorimetría diferencial de barrido
DLS - dispersión dinámica de la luz
PAB - perfil ácido-base
Oxid 0,1% - oxidación mediante una solución de peróxido de hidrógeno al 0,1
 Δ Oxid 0,1% - cambio en el parámetro de calidad tras la oxidación con una solución de peróxido de hidrógeno al 0,1%.
Tensioactivo - agente tensioactivo
AS37 - almacenamiento acelerado a 37°C
2W - 2 semanas
4W - 4 semanas
 Δ AS37 - cambio en el parámetro de calidad tras el almacenamiento acelerado a 37°C.
Max - valor máximo
Min - valor mínimo
pH - índice de hidrógeno
Cfin./Cin. - relación entre las concentraciones antes y después de la concentración
N - viscosidad
EC - electroforesis capilar
Red. - condiciones reductoras
No red. - Condiciones no reductoras

La presente invención da a conocer composiciones farmacéuticas estables de anticuerpo anti-TRBV9, que pueden utilizarse como medicamento para tratar enfermedades o trastornos mediados por linfocitos T portadores de un segmento TRBV9 dentro del receptor de células T.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende al menos un anticuerpo anti-TRBV9 en una cantidad terapéuticamente eficaz en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables. En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende anticuerpo anti-TRBV9 en combinación con uno o más excipientes farmacéuticamente aceptables.

Durante la selección de la formulación, tuvimos en cuenta la finalidad, la vía de administración y la tolerabilidad del medicamento (por ejemplo, la reducción de las molestias durante la administración), así como la estabilidad y la conservación de la actividad de la molécula proteica dentro de la formulación.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica que comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;

- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agua para inyección.

El anticuerpo anti-TRBV9 puede ser un anticuerpo que se une específicamente a la cadena beta de la familia TRBV9. El anticuerpo anti-TRBV9 puede ser un anticuerpo de longitud completa o un fragmento de unión a antígeno del mismo que se une específicamente a la cadena beta de la familia TRBV9. El anticuerpo anti-TRBV9 puede ser de diferentes especificidades (por ejemplo, anticuerpo monoespecífico, biespecífico), diferentes valencias (por ejemplo, anticuerpo monovalente, bivalente, trivalente), diferentes formatos (por ejemplo, anticuerpo clásico, scFv, scFv-Fc, Minibody), diferentes orígenes (por ejemplo, anticuerpo murino, humano, camello, quimérico).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 se refiere a un anticuerpo monoclonal aislado.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 se refiere a un anticuerpo monoespecífico.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 es un anticuerpo recombinante.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 comprende:

- 1) un dominio variable de cadena pesada que comprende:
 - (a) HCDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
 - (b) HCDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y
 - (c) HCDR3 con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6;
- 2) un dominio variable de cadena ligera que comprende:
 - (a) LCDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7,
 - (b) LCDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, y
 - (c) LCDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

Los anticuerpos según la invención pueden ser de cualquier clase (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG e IgM) o subclase (isotipo) (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 es un anticuerpo IgG de longitud completa.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 es de isotipo humano IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (candidato 42 o anticuerpo 42).

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 15 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 23 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (candidato 43 o anticuerpo 43).

La concentración de anticuerpo anti-TRBV9 contenida en las composiciones farmacéuticas de la presente invención puede variar dependiendo de las propiedades deseadas de las composiciones, así como de las condiciones, métodos y fines particulares de uso de las composiciones farmacéuticas.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente a una concentración de 0,5 - 300,0 mg/ml. En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente a una concentración de 0,5 - 280,0 mg/ml. En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente a una concentración de 0,5 - 250,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente a una concentración de 0,5 - 225,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente en una concentración de 1,5 - 190,0 mg/ml, o 200,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml; o 1,5 - 125,0 mg/ml, o 150,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml; o 1,5 - 125,0 mg/ml, o 180,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml; o 1,5 - 95 mg/ml, o 100 - 125,0 mg/ml, o 150,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml; o 1,5 - 95 mg/ml, o 100 - 125,0 mg/ml, o 180,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml; o 1,5 - 85 mg/ml, o 90,0 - 125,0 mg/ml, o 150,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml; o 1,5 - 95 mg/ml, o 100 - 125,0 mg/ml, o 180,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml; o 1,5 - 75 mg/ml, o 80,0 - 125,0 mg/ml, o 150,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml; o 1,5 - 75 mg/ml, o 80,0 - 125,0 mg/ml, o 180,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml; o 1,5 - 50,0 mg/ml, o 60,0 - 125,0 mg/ml, o 150,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml; o 1,5 - 50,0 mg/ml, o 60,0 - 125,0 mg/ml, o 180,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml; o 1,5 - 30,0 mg/ml, o 40,0 - 125,0 mg/ml, o 150,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml; o 1,5 - 30,0 mg/ml, o 40,0 - 125,0 mg/ml, o 180,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente a una concentración de 1,5 - 50,0 mg/ml, o 60,0 - 150,0 mg/ml, o 180,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente en una concentración de 1,5 - 35,0 mg/ml, o 40,0 - 60,0 mg/ml, o 70,0 - 125,0 mg/ml, o 180,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente en una concentración de 4,0 - 6,0 mg/ml, o 8,0 - 12,0 mg/ml, o 23,0 - 32,0 mg/ml, o 40,0 - 60,0 mg/ml, o 70,0 - 105,0 mg/ml, o 180,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente en una concentración de 4,0 - 6,0 mg/ml, o 8,0 - 12,0 mg/ml, o 23,0 - 32,0 mg/ml, o 50,0 - 105,0 mg/ml, o 180,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente en una concentración de 4,0 - 6,0 mg/ml, o 8,0 - 12,0 mg/ml, o 23,0 - 32,0 mg/ml, o 70,0 - 105,0 mg/ml, o 180,0 - 225,0 mg/ml, o 240,0 - 300,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente en una concentración de 1,5 mg/ml, o 5,0 mg/ml, o 10,0 mg/ml, o 25,0 mg/ml, o 30,0 mg/ml, o 40,0 mg/ml, o 50,0 mg/ml, o 60,0 mg/ml, o 70,0 mg/ml, o 73,0 mg/ml, o 80,0 mg/ml, o 85,0 mg/ml, o 90,0 mg/ml, o 91,4 mg/ml, o 91,8 mg/ml, o 100,0 mg/ml, o 103,0 mg/ml, o 125,0 mg/ml, o 186,0 mg/ml, o 212,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina;
- (iii) agua para inyección.

En algunas realizaciones de la invención, el tampón de histidina es una mezcla de histidina y clorhidrato de histidina monohidratado.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,4 - 14,11 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,4 - 11,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,4 - 10,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,4 - 8,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,4 - 5,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,4 - 3,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,4 - 1,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,4 - 1,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,4 - 0,8 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,45 - 0,8 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,5 - 0,8 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,45 - 0,6 mg/ml, o 0,65 - 0,8 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,5 - 0,6 mg/ml, o 0,65 - 0,8 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la histidina está presente en una concentración de 0,517 mg/ml, o 0,580 mg/ml, o 0,689 mg/ml, o 0,746 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidrato está presente en una concentración de 0,05 - 19,06 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,05 - 15,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,05 a 12,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,05 a 10,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,05 a 8,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,05 a 6,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,05 a 5,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,05 a 4,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,08 a 4,2 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,08 a 4,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,1 a 4,2 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,1 a 4,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,1 a 3,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidratado está presente en una concentración de 0,08 a 1,0 mg/ml o de 2,0 a 4,2 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidrato está presente en una concentración de 0,08 a 0,15 mg/ml, o de 0,2 a 0,4 mg/ml, o de 2,2 a 4,2 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el clorhidrato de histidina monohidrato está presente en una concentración de 0,117 mg/ml, o 0,270 mg/ml, o 0,350 mg/ml, o 3,185 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el tampón de histidina es una mezcla de:

histidina	0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,08 - 4,2 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el tampón de histidina es una mezcla de:

histidina	0,517 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,350 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el tampón de histidina es una mezcla de:

histidina	0,746 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	3,185 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el tampón de histidina es una mezcla de:

histidina	0,580 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,270 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el tampón de histidina es una mezcla de:

histidina	0,689 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,117 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;

(ii) tampón de histidina que es una
mezcla de
histidina 0,517 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
(iii) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;
(ii) tampón de histidina que es una
mezcla de
histidina 0,746 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato 3,185 mg/ml;
(iii) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;
(ii) tampón de histidina que es una
mezcla de
histidina 0,580 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato 0,270 mg/ml;
(iii) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;
(ii) tampón de histidina que es una
mezcla de
histidina 0,689 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato 0,117 mg/ml;
(iii) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente en una concentración de 0,5 - 300,0 mg/ml, o 1,5 - 225,0 mg/ml, o 5,0 - 125,0 mg/ml, o 5,0 - 100,0 mg/ml, 5,0 - 50,0 mg/ml, o 5,0 - 30,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente en una concentración de 1,5 mg/ml, o 5,0 mg/ml, o 10,0 mg/ml, o 25,0 mg/ml, o 30,0 mg/ml, o 40,0 mg/ml, o 50,0 mg/ml, o 60,0 mg/ml, o 70,0 mg/ml, o 73,0 mg/ml, o 80,0 mg/ml, o 85,0 mg/ml, o 90,0 mg/ml, o 91,4 mg/ml, o 91,8 mg/ml, o 100,0 mg/ml, o 103,0 mg/ml, o 125,0 mg/ml, o 186,0 mg/ml, o 212,0 mg/ml, 225,0 mg/ml, 300,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
(ii) tampón de histidina que es una
mezcla de

histidina	0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,08 - 4,2 mg/ml;
(iii) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	5 - 125,0 mg/ml;
(ii) tampón de histidina que es una mezcla de	
histidina	0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,08 - 4,2 mg/ml;
(iii) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	5 - 100,0 mg/ml;
(ii) tampón de histidina que es una mezcla de	
histidina	0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,08 - 4,2 mg/ml;
(iii) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	25 mg/ml;
(ii) tampón de histidina que es una mezcla de	
histidina	0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,08 - 4,2 mg/ml;
(iii) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	25 mg/ml;
(ii) tampón de histidina que es una mezcla de	
histidina	0,517 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,350 mg/ml;
(iii) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;	0,5 - 300,0 mg/ml;
(ii) tampón de histidina que es una mezcla de	
histidina	0,517 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,350 mg/ml;
(iii) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 5 - 125,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 5 - 100,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de acetato;
- (iii) agua para inyección.

En algunas realizaciones de la invención, el tampón de acetato es una mezcla de acetato de sodio y ácido acético.

En algunas realizaciones de la invención, el acetato de sodio está presente en una concentración de 0,014 - 12,88 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el acetato de sodio está presente en una concentración de 0,014 - 8,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el acetato de sodio está presente en una concentración de 0,5 - 3,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el acetato de sodio está presente en una concentración de 0,5 - 2,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el acetato de sodio está presente en una concentración de 0,5 - 0,8 mg/ml, o 1,6 - 3,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el acetato de sodio está presente en una concentración de 0,644 mg/ml, o 2,311 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el acetato de sodio es acetato de sodio trihidratado.

En algunas realizaciones de la invención, se añade ácido acético a pH 3,5 - 6,1.

En algunas realizaciones de la invención, se añade ácido acético a pH 5,4 - 6,1.

En algunas realizaciones de la invención, se añade ácido acético a pH 5,4 - 5,6, o a pH 5,9 - 6,1.

En algunas realizaciones de la invención, se añade ácido acético a pH 5,5 o a pH 6,0.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido acético es ácido acético glacial.

En algunas realizaciones de la invención, el tampón de acetato es una mezcla de:

acetato sódico	0,5 - 3,0 mg/ml y
ácido acético	a pH 5,4 - 6,1.

En algunas realizaciones de la invención, el tampón de acetato es una mezcla de:

acetato sódico	0,5 - 2,5 mg/ml y
ácido acético	a pH 5,4 - 6,1.

En algunas realizaciones de la invención, el tampón de acetato es una mezcla de:

acetato sódico	0,644 mg/ml y
ácido acético	a pH 6,0.

En algunas realizaciones de la invención, el tampón de acetato es una mezcla de:

acetato sódico	2,311 mg/ml y
ácido acético	a pH 5,5.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de acetato que es una mezcla de

acetato sódico	0,644 mg/ml y
ácido acético	a pH 6,0.
(iii) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de acetato que es una mezcla de

acetato sódico	2,311 mg/ml y
ácido acético	a pH 5,5.
(iii) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente en una concentración de 0,5 - 300,0 mg/ml, o 1,5 - 225,0 mg/ml, o 5,0 - 125,0 mg/ml, o 5,0 - 100,0 mg/ml, 5,0 - 50,0 mg/ml, o 5,0 - 30,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el anticuerpo anti-TRBV9 está presente en una concentración de 1,5 mg/ml, o 5,0 mg/ml, o 10,0 mg/ml, o 25,0 mg/ml, o 30,0 mg/ml, o 40,0 mg/ml, o 50,0 mg/ml, o 60,0 mg/ml, o 70,0 mg/ml, o 73,0 mg/ml, o 80,0 mg/ml, o 85,0 mg/ml, o 90,0 mg/ml, o 91,4 mg/ml, o 91,8 mg/ml, o 100,0 mg/ml, o 103,0 mg/ml, o 125,0 mg/ml, o 186,0 mg/ml, o 212,0 mg/ml, 225,0 mg/ml, 300,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de acetato que es una mezcla de acetato sódico 0,5 - 3,0 mg/ml y ácido acético a pH 5,4 - 6,1;
- (iii) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 125,0 mg/ml;
- (ii) tampón de acetato que es una mezcla de acetato sódico 0,5 - 3,0 mg/ml y ácido acético a pH 5,4 - 6,1;
- (iii) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (iv) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 100,0 mg/ml;
- (v) tampón de acetato que es una mezcla de acetato sódico 0,5 - 3,0 mg/ml y ácido acético a pH 5,4 - 6,1;
- (vi) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 25,0 mg/ml;
- (ii) tampón de acetato que es una mezcla de acetato sódico 0,5 - 3,0 mg/ml y ácido acético a pH 5,4 - 6,1;
- (iii) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de acetato que es una mezcla de acetato sódico 0,644 mg/ml y ácido acético a pH 6,0;
- (iii) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de acetato que es una mezcla de

acetato sódico	2,311 mg/ml y
ácido acético	a pH 5,5;
(iii) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	5 - 125,0 mg/ml;
(ii) tampón de acetato que es una mezcla de	
acetato sódico	0,644 mg/ml y
ácido acético	a pH 6,0;
(iii) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(iv) Anticuerpo anti-TRBV9	5 - 100,0 mg/ml;
(v) tampón de acetato que es una mezcla de	
acetato sódico	0,644 mg/ml y
ácido acético	a pH 6,0;
(vi) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	5 - 125,0 mg/ml;
(ii) tampón de acetato que es una mezcla de	
acetato sódico	2,311 mg/ml y
ácido acético	a pH 5,5;
(iii) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(iv) Anticuerpo anti-TRBV9	5 - 100,0 mg/ml;
(v) tampón de acetato que es una mezcla de	
acetato sódico	2,311 mg/ml y
ácido acético	a pH 5,5;
(vi) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	25,0 mg/ml;
(ii) tampón de acetato que es una mezcla de	
acetato sódico	0,644 mg/ml y
ácido acético	a pH 6,0;
(iii) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 25,0 mg/ml;
- (ii) tampón de acetato que es una mezcla de acetato sódico 2,311 mg/ml y ácido acético a pH 5,5;
- (iii) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende además uno o más agentes osmóticos.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico;
- (iv) agua para inyección.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

El agente osmótico puede estar presente en forma enantiomérica (por ejemplo, enantiómero L o D) o racémica; en forma de isómeros, como alfa o beta, incluyendo alfa, alfa; o beta, beta; o beta, alfa; en forma de ácido libre o base libre; en forma de sal; en forma hidratada (por ejemplo, monohidrato o dihidrato), o en forma anhidra. Los agentes osmóticos ejemplares son, entre otros, azúcares (trehalosa, trehalosa dihidratada, sacarosa, glucosa), polioles (manitol, sorbitol), aminoácidos (prolina o L-prolina, arginina o L-arginina, glicina o L-glicina) o sales (cloruro de sodio, cloruro de potasio, cloruro de magnesio).

En algunas realizaciones de la invención, el agente osmótico está presente en una concentración de 0,001 - 200,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el agente osmótico está presente en una concentración de 0,001 - 180,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el agente osmótico está presente en una concentración de 0,001 - 150,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el agente osmótico está presente en una concentración de 0,001 - 130,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el agente osmótico está presente en una concentración de 6,0 - 130,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el agente osmótico es prolina, sorbitol, trehalosa o cloruro sódico.

En algunas realizaciones de la invención, la prolina está presente en una concentración de 0,001 - 60,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la prolina está presente en una concentración de 14,0 - 32,0 mg /ml.

En algunas realizaciones de la invención, la prolina está presente en una concentración de 17,0 - 32,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la prolina está presente en una concentración de 17,0 - 23,0 mg/ml o 25,0 - 29,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la prolina está presente en una concentración de 19,0 mg/ml, o 21,0 mg/ml, o 27,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el sorbitol está presente en una concentración de 0,001 - 100,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el sorbitol está presente en una concentración de 20,0 - 80,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el sorbitol está presente en una concentración de 35,0 - 65,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el sorbitol está presente en una concentración de 40,0 - 60,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el sorbitol está presente en una concentración de 45,0 - 55,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el sorbitol está presente en una concentración de 50,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la trehalosa está presente en una concentración de 0,001 - 200,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la trehalosa está presente en una concentración de 0,001 - 180,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la trehalosa está presente en una concentración de 40,0 - 160,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la trehalosa está presente en una concentración de 60,0 - 140,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la trehalosa está presente en una concentración de 70,0 - 130,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la trehalosa está presente en una concentración de 80,0 - 120,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la trehalosa está presente en una concentración de 90,0 - 110,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la trehalosa está presente en una concentración de 100,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro sódico está presente en una concentración de 0,001 - 18,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro sódico está presente en una concentración de 3,0 - 16,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro sódico está presente en una concentración de 5,0 - 14,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro sódico está presente en una concentración de 7,0 - 12,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro sódico está presente en una concentración de 7,0 - 11,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro sódico está presente en una concentración de 7,5 - 11,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro sódico está presente en una concentración de 7,5 - 10,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro sódico está presente en una concentración de 8,0 - 10,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro sódico está presente en una concentración de 8,5 - 9,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro sódico está presente en una concentración de 9,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende además uno o más estabilizadores.

Los estabilizadores pueden ser aminoácidos, por ejemplo, y sin carácter exhaustivo, arginina, histidina, glicina, lisina, glutamina, prolina; tensioactivos, por ejemplo, y sin carácter exhaustivo, polisorbato 20 (nombre comercial: Tween 20), polisorbato 80 (nombre comercial: Tween 80), polietileno-polipropilenglicol y copolímeros de los mismos (nombres comerciales: Poloxamer, Pluronic, dodecilsulfato de sodio (SDS); antioxidantes, por ejemplo, y sin carácter exhaustivo, metionina, acetilcisteína, ácido ascórbico, monotioglicerol, sales de ácido sulfuroso, etc.; agentes quelantes, por ejemplo, y sin carácter exhaustivo, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA), citrato de sodio, etc.

En algunas realizaciones de la invención, el estabilizador está presente en una concentración de 0,001 - 100,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el estabilizador está presente en una concentración de 0,001 - 50,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el estabilizador está presente en una concentración de 0,001 - 30,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el estabilizador está presente en una concentración de 0,35 - 9,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el estabilizador es un aminoácido o un tensioactivo.

En algunas realizaciones de la invención, el aminoácido está presente en una concentración de 0,001 - 100,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el aminoácido está presente en una concentración de 0,001 - 50,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el aminoácido está presente en una concentración de 0,001 - 30,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el aminoácido está presente en una concentración de 0,35 - 9,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el aminoácido está presente en una concentración de 1,1 - 9,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el aminoácido es glicina o metionina.

En algunas realizaciones de la invención, la glicina está presente en una concentración de 0,001 - 100,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la glicina está presente en una concentración de 0,001 - 80,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la glicina está presente en una concentración de 0,001 - 60,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la glicina está presente en una concentración de 0,001 - 40,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la glicina está presente en una concentración de 0,001 - 20,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la glicina está presente en una concentración de 0,001 - 15,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la glicina está presente en una concentración de 3,0 - 12,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la glicina está presente en una concentración de 5,5 - 9,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la glicina está presente en una concentración de 6,0 - 9,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la glicina está presente en una concentración de 6,5 - 8,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la glicina está presente en una concentración de 7,0 - 8,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la glicina está presente en una concentración de 7,51 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la metionina está presente en una concentración de 0,001 - 5,8 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la metionina está presente en una concentración de 1,1 - 5,8 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la metionina está presente en una concentración de 1,1 - 1,9 mg/ml o 3,2 - 5,8 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la metionina está presente en una concentración de 1,49 mg/ml o 4,48 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el tensioactivo está presente en una concentración de 0,001 - 6,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el tensioactivo está presente en una concentración de 0,001 - 4,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el tensioactivo está presente en una concentración de 0,001 - 3,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el tensioactivo está presente en una concentración de 0,1 - 2,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el tensioactivo está presente en una concentración de 0,35 - 1,3 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el tensioactivo es poloxámero 188 o polisorbato 80 o polipropilenglicol.

En algunas realizaciones de la invención, el poloxámero 188 está presente en una concentración de 0,001 - 6,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el poloxámero 188 está presente en una concentración de 0,001 - 4,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el poloxámero 188 está presente en una concentración de 0,001 - 2,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el poloxámero 188 está presente en una concentración de 0,35 - 1,3 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el poloxámero 188 está presente en una concentración de 0,35 - 0,65 mg/ml o 0,7 - 1,3 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el poloxámero 188 está presente en una concentración de 0,35 - 0,65 mg/ml o 0,8 - 1,2 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el poloxámero 188 está presente en una concentración de 0,5 mg/ml o 1,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el polisorbato 80 está presente en una concentración de 0,001 - 5,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el polisorbato 80 está presente en una concentración de 0,001 - 3,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el polisorbato 80 está presente en una concentración de 0,001 - 2,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el polisorbato 80 está presente en una concentración de 0,7 - 1,3 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el polisorbato 80 está presente en una concentración de 0,8 - 1,2 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el polisorbato 80 está presente a una concentración de 1,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;

(ii) tampón de histidina o tampón de acetato;

(iii) agente osmótico 0,001 - 200,0 mg/ml;

(iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico 0,001 - 130,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico 0,001 - 200,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico 0,001 - 130,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato,
- (iii) agente osmótico;
- (iv) estabilizador;
- (v) agua para inyección.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato,
- (iii) agente osmótico;
- (iv) estabilizador;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato,
- (iii) agente osmótico;
- (iv) estabilizador; 0,001 - 100,0 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato,
- (iii) agente osmótico;
- (iv) estabilizador; 0,35 - 9,5 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato,
- (iii) agente osmótico; 0,001 - 130,0 mg/ml;
- (iv) estabilizador 0,35 - 9,5 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato,
- (iii) agente osmótico 0,001 - 200,0 mg/ml;
- (iv) estabilizador 0,35 - 9,5 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato,
- (iii) agente osmótico 0,001 - 130,0 mg/ml;
- (iv) estabilizador 0,35 - 9,5 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato
- (iii) agente osmótico que es la prolina;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato

- (iii) agente osmótico que es la prolina 14,0 - 32,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato
- (iii) agente osmótico que es la prolina 14,0 - 32,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es la prolina 14,0 - 32,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es la prolina 14,0 - 32,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 5 - 125,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es la prolina 14,0 - 32,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 5 - 100,0 mg/ml;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de
histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;
(iii) agente osmótico que es la prolina 14,0 - 32,0 mg/ml;
(iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;
(ii) tampón de histidina o tampón de acetato
(iii) agente osmótico que es la prolina 27 mg/ml;
(iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;
(ii) tampón de histidina o tampón de acetato
(iii) agente osmótico que es la prolina 27 mg/ml;
(iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;
(ii) tampón de histidina que es una mezcla de
histidina 0,517 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
(iii) agente osmótico que es la prolina 27 mg/ml;
(iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
(ii) tampón de histidina que es una mezcla de
histidina 0,517 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
(iii) agente osmótico que es la prolina 27 mg/ml;
(iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 25 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato
- (iii) agente osmótico que es la prolina 27 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 25 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es la prolina 27 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato
- (iii) agente osmótico que es la prolina 19 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato
- (iii) agente osmótico que es la prolina 19 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 25,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato
- (iii) agente osmótico que es la prolina 19 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,689 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,117 mg/ml;

- (iii) agente osmótico que es la prolina 19 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,689 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,117 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es la prolina 19 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 25,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,689 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,117 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es la prolina 19 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato,
- (iii) agente osmótico que es la prolina;
- (iv) siendo el estabilizador la glicina;
- (v) agua para inyección.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato,
- (iii) agente osmótico que es la prolina
- (iv) El estabilizador es la glicina. 0,001 - 100,0 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato,
- (iii) agente osmótico que es la prolina

- (iv) El estabilizador es la glicina. 5,5 - 9,5 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato,
- (iii) agente osmótico que es la prolina 14,0 - 32,0 mg/ml;
- (iv) El estabilizador es la glicina. 5,5 - 9,5 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato,
- (iii) agente osmótico que es la prolina 14,0 - 32,0 mg/ml;
- (iv) El estabilizador es la glicina. 5,5 - 9,5 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 125,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato,
- (iii) agente osmótico que es la prolina 14,0 - 32,0 mg/ml;
- (iv) El estabilizador es la glicina. 5,5 - 9,5 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 100,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato,
- (iii) agente osmótico que es la prolina 14,0 - 32,0 mg/ml;
- (iv) El estabilizador es la glicina. 5,5 - 9,5 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y

clorhidrato de histidina monohidrato	0,08 - 4,2 mg/ml;
(iii) agente osmótico que es la prolina	14,0 - 32,0 mg/ml;
(iv) El estabilizador es la glicina.	5,5 - 9,5 mg/ml;
(v) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	0,5 - 300,0 mg/ml;
(ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina	0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,08 - 4,2 mg/ml;
(iii) agente osmótico que es la prolina	14,0 - 32,0 mg/ml;
(iv) El estabilizador es la glicina.	5,5 - 9,5 mg/ml;
(v) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	5 - 125,0 mg/ml;
(ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina	0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,08 - 4,2 mg/ml;
(iii) agente osmótico que es la prolina	14,0 - 32,0 mg/ml;
(iv) El estabilizador es la glicina.	5,5 - 9,5 mg/ml;
(v) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	5 - 100,0 mg/ml;
(ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina	0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,08 - 4,2 mg/ml;
(iii) agente osmótico que es la prolina	14,0 - 32,0 mg/ml;
(iv) El estabilizador es la glicina.	5,5 - 9,5 mg/ml;
(v) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	25,0 mg/ml;
(ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina	0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,08 - 4,2 mg/ml;

(iii) agente osmótico que es la prolina 14,0 - 32,0 mg/ml;

(iv) El estabilizador es la glicina. 5,5 - 9,5 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;

(ii) tampón de histidina o tampón de acetato,

(iii) agente osmótico que es la prolina 21 mg/ml;

(iv) El estabilizador es la glicina. 7,51 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;

(ii) tampón de histidina o tampón de acetato,

(iii) agente osmótico que es la prolina 21 mg/ml;

(iv) El estabilizador es la glicina. 7,51 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;

(iii) agente osmótico que es la prolina 21 mg/ml;

(iv) El estabilizador es la glicina. 7,51 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;

(iii) agente osmótico que es la prolina 21 mg/ml;

(iv) El estabilizador es la glicina. 7,51 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9 25 mg/ml;

- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es la prolina 21 mg/ml;
- (iv) El estabilizador es la glicina. 7,51 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico que es la prolina;
- (iv) siendo el estabilizador el poloxámero 188;
- (v) agua para inyección.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico que es la prolina
- (iv) estabilizador poloxámero 188 0,35 - 1,3 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico que es la prolina 14,0 - 32,0 mg/ml;
- (iv) estabilizador poloxámero 188 0,35 - 1,3 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico que es la prolina 14,0 - 32,0 mg/ml;
- (iv) estabilizador poloxámero 188 0,35 - 1,3 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de

histidina	0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,08 - 4,2 mg/ml;
(iii) agente osmótico que es la	
prolina	14,0 - 32,0 mg/ml;
(iv) estabilizador poloxámero 188	0,35 - 1,3 mg/ml;
(v) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	0,5 - 300,0 mg/ml;
(ii) tampón de histidina que es una mezcla de	
histidina	0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,08 - 4,2 mg/ml;
(iii) agente osmótico que es la	
prolina	14,0 - 32,0 mg/ml;
(iv) estabilizador poloxámero 188	0,35 - 1,3 mg/ml;
(v) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	5,0 - 125,0 mg/ml;
(ii) tampón de histidina que es una mezcla de	
histidina	0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,08 - 4,2 mg/ml;
(iii) agente osmótico que es la	
prolina	14,0 - 32,0 mg/ml;
(iv) estabilizador poloxámero 188	0,35 - 1,3 mg/ml;
(v) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	5,0 - 100,0 mg/ml;
(ii) tampón de histidina que es una mezcla de	
histidina	0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato	0,08 - 4,2 mg/ml;
(iii) agente osmótico que es la	
prolina	14,0 - 32,0 mg/ml;
(iv) estabilizador poloxámero 188	0,35 - 1,3 mg/ml;
(v) agua para inyección	a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9	0,5 - 300,0 mg/ml;
(ii) tampón de histidina o tampón de acetato;	

(iii) agente osmótico que es la prolina 9,0 mg/ml;

(iv) estabilizador poloxámero 188 0,5 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;

(iii) agente osmótico que es la prolina 9,0 mg/ml;

(iv) estabilizador poloxámero 188 0,5 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;

(iii) agente osmótico que es la prolina 9,0 mg/ml;

(iv) estabilizador poloxámero 188 0,5 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9 25,0 mg/ml;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;

(iii) agente osmótico que es la prolina 9,0 mg/ml;

(iv) estabilizador poloxámero 188 0,5 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;

(iii) agente osmótico que es la prolina 9,0 mg/ml;

(iv) estabilizador poloxámero 188 1,0 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 25,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es la prolina 9,0 mg/ml;
- (iv) estabilizador poloxámero 188 1,0 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) siendo el agente osmótico el sorbitol;
- (iv) agua para inyección.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico que es el sorbitol 35,0 - 65,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico que es el sorbitol 35,0 - 65,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es el sorbitol 35,0 - 65,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;

- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico que es el sorbitol 50,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es el sorbitol 50,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es el sorbitol 50,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 25,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es el sorbitol 50,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico que es el sorbitol
- (iv) estabilizador que es la metionina 1,1 - 5,8 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;

- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico que es el sorbitol 35,0 - 65,0 mg/ml;
- (iv) estabilizador que es la metionina 1,1 - 5,8 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico que es el sorbitol 35,0 - 65,0 mg/ml;
- (iv) estabilizador que es la metionina 1,1 - 5,8 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es el sorbitol 35,0 - 65,0 mg/ml;
- (iv) estabilizador que es la metionina 1,1 - 5,8 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es el sorbitol 50,0 mg/ml;
- (iv) estabilizador que es la metionina 1,49 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,05 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es el sorbitol 50,0 mg/ml;

(iv) estabilizador que es la metionina 1,49 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9 25,0 mg/ml;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de

histidina 0,517 mg/ml y

clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;

(iii) agente osmótico que es el sorbitol 50,0 mg/ml;

(iv) estabilizador que es la metionina 1,49 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de

histidina 0,517 mg/ml y

clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;

(iii) agente osmótico que es el sorbitol 50,0 mg/ml;

(iv) estabilizador que es la metionina 4,48 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de

histidina 0,517 mg/ml y

clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;

(iii) agente osmótico que es el sorbitol 50,0 mg/ml;

(iv) estabilizador que es la metionina 4,48 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9 25,0 mg/ml;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de

histidina 0,517 mg/ml y

clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;

(iii) agente osmótico que es el sorbitol 50,0 mg/ml;

(iv) estabilizador que es la metionina 4,48 mg/ml;

(v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico que es la trehalosa;
- (iv) agua para inyección.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico que es la trehalosa 0,001 - 200,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico que es la trehalosa 70 - 130,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) agente osmótico que es la trehalosa 70 - 130,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es la trehalosa 70 - 130,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;

- (iii) agente osmótico que es la trehalosa 70 - 130,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 5,0 - 125,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es la trehalosa 70 - 130,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 5,0 - 100,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es la trehalosa 70 - 130,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es la trehalosa 100,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es la trehalosa 100,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 25,0 mg/ml;

- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) agente osmótico que es la trehalosa 100,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) siendo el agente osmótico el cloruro de sodio;
- (iv) agua para inyección.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) siendo el agente osmótico el cloruro de sodio 6,0 - 11,5 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) siendo el agente osmótico el cloruro de sodio 6,0 - 11,5 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;
- (iii) siendo el agente osmótico el cloruro de sodio 6,0 - 11,5 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;

(iii) siendo el agente osmótico el
cloruro de sodio 6,0 - 11,5 mg/ml;

(iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9 5 - 125,0 mg/ml;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de
histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;

(iii) siendo el agente osmótico el
cloruro de sodio 6,0 - 11,5 mg/ml;

(iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9 5 - 100,0 mg/ml;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de
histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;

(iii) siendo el agente osmótico el
cloruro de sodio 6,0 - 11,5 mg/ml;

(iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de
histidina 0,517 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;

(iii) siendo el agente osmótico el
cloruro de sodio 9,0 mg/ml;

(iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

(i) Anticuerpo anti-TRBV9 5,0 - 300,0 mg/ml;

(ii) tampón de histidina que es una mezcla de
histidina 0,517 mg/ml y
clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;

(iii) siendo el agente osmótico el
cloruro de sodio 9,0 mg/ml;

(iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 25,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) siendo el agente osmótico el cloruro de sodio 9,0 mg/ml;
- (iv) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) siendo el agente osmótico el cloruro de sodio;
- (iv) siendo el estabilizador poloxámero 188 o polisorbato 80;
- (v) agua para inyección.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) siendo el agente osmótico el cloruro de sodio 6,0 - 11,5 mg/ml;
- (iv) siendo el estabilizador poloxámero 188 o polisorbato 80 0,35 - 1,3 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9; 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina o tampón de acetato;
- (iii) siendo el agente osmótico el cloruro de sodio 6,0 - 11,5 mg/ml;
- (iv) siendo el estabilizador poloxámero 188 o polisorbato 80 0,35 - 1,3 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;

- (iii) siendo el agente osmótico el cloruro de sodio 6,0 - 11,5 mg/ml;
- (iv) siendo el estabilizador poloxámero 188 o polisorbato 80 0,35 - 1,3 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;
- (iii) siendo el agente osmótico el cloruro de sodio 6,0 - 11,5 mg/ml;
- (iv) siendo el estabilizador poloxámero 188 o polisorbato 80 0,35 - 1,3 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 5,0 - 100,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,4 - 1,0 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,08 - 4,2 mg/ml;
- (iii) siendo el agente osmótico el cloruro de sodio 6,0 - 11,5 mg/ml;
- (iv) siendo el estabilizador poloxámero 188 o polisorbato 80 0,35 - 1,3 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de histidina 0,517 mg/ml y clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) siendo el agente osmótico el cloruro de sodio 9,0 mg/ml;
- (iv) siendo el estabilizador poloxámero 188 o polisorbato 80 1,0 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 0,5 - 300,0 mg/ml;

- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de
 - histidina 0,517 mg/ml y
 - clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) siendo el agente osmótico el cloruro de sodio 9,0 mg/ml;
- (iv) siendo el estabilizador poloxámero 188 o polisorbato 80 1,0 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende:

- (i) Anticuerpo anti-TRBV9 25,0 mg/ml;
- (ii) tampón de histidina que es una mezcla de
 - histidina 0,517 mg/ml y
 - clorhidrato de histidina monohidrato 0,350 mg/ml;
- (iii) siendo el agente osmótico el cloruro de sodio 9,0 mg/ml;
- (iv) siendo el estabilizador poloxámero 188 o polisorbato 80 1,0 mg/ml;
- (v) agua para inyección a 1 ml.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica para tratar una enfermedad o trastorno mediado por linfocitos T que llevan un segmento TRBV9 dentro del receptor de células T, en un sujeto que lo necesita, que comprende anticuerpo anti-TRBV9 y al menos otro compuesto terapéuticamente activo.

En algunas realizaciones, el compuesto terapéuticamente activo es un anticuerpo, un agente quimioterapéutico o un agente antihormonal.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de anticuerpo anti-TRBV9, que se proporciona en forma seca (es decir, polvo o granulado) para su reconstitución en un disolvente adecuado (por ejemplo, agua) antes de la administración. Dicha formulación puede prepararse, por ejemplo, mediante liofilización, es decir, un proceso conocido en la técnica como liofilización, que implica la congelación de un producto seguida de la eliminación del disolvente del material congelado.

En un aspecto, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica de anticuerpo anti-TRBV9 producida por liofilización de cualquiera de las anteriores composiciones farmacéuticas de anticuerpo anti-TRBV9. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden ser

composiciones farmacéuticas acuosas o composiciones farmacéuticas liofilizadas (liofilizados).

Los liofilizados se utilizan para producir otras formas farmacéuticas. Por ejemplo, un liofilizado para producir una solución inyectable, un liofilizado para producir un concentrado para producir una solución inyectable. Los liofilizados se reconstituyen disolviéndolos en un disolvente adecuado, normalmente en agua para inyección. Además, las composiciones liofilizadas se reconstituyen primero en el volumen de disolvente necesario (normalmente en agua) y luego se diluyen en un disolvente adecuado (por ejemplo, una solución de glucosa al 5% o una solución de cloruro sódico al 0,9%).

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención son típicamente adecuadas para la administración parenteral como formulaciones estériles destinadas a la administración en un cuerpo humano a través de la fisura en la piel o las barreras de la mucosa, evitando el tracto gastrointestinal mediante la inyección, infusión e implantación. En particular, se contempla que la administración parenteral incluye, entre otras, las técnicas de inyección o infusión subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravenosa, intraarterial, intratecal, intraventricular, intrauretral, intracraneal, intrasínovial, transdérmica y de infusión renal dialítica. Las realizaciones preferidas incluyen las vías intravenosa y subcutánea. Cualquier método de administración de péptidos o proteínas aceptado en la técnica puede emplearse adecuadamente para la composición de anticuerpo anti-TRBV9 según la presente invención.

En algunas realizaciones de la invención, dicha composición farmacéutica de anticuerpo anti-TRBV9 según la presente invención está destinada a la administración parenteral.

En algunas realizaciones de la invención, dicha composición farmacéutica de anticuerpo anti-TRBV9 según la presente invención está destinada a la administración intramuscular, intravenosa o subcutánea.

En algunas realizaciones de la invención, dicha composición farmacéutica de anticuerpo anti-TRBV9 según la presente invención puede administrarse por vía intravenosa en forma de infusión.

La composición farmacéutica de anticuerpo anti-TRBV9 según la presente invención puede utilizarse tras dilución. Para ello, el volumen necesario de la composición se transfiere de un vial a un recipiente de infusión que contiene una solución estéril de cloruro sódico al 0,9% o una solución estéril de dextrosa al 5%. La solución resultante se agita girando suavemente el recipiente de infusión.

Las composiciones farmacéuticas según la presente invención pueden almacenarse en cualquier recipiente adecuado. Por ejemplo, un

recipiente de vidrio o plástico, un vial, una ampolla, una jeringa, un cartucho o una botella del volumen deseado. Los envases pueden estar provistos de medios adicionales para la administración, como goteros o autoinyectores.

Una composición farmacéutica según la invención puede fabricarse, envasarse o venderse masivamente en forma de una dosis unitaria o de una multitud de dosis unitarias en forma de formulación lista. El término "dosis unitaria", tal como se utiliza aquí, se refiere a una cantidad discreta de una composición farmacéutica que contiene una cantidad predeterminada de un ingrediente activo. La cantidad de un ingrediente activo suele ser igual a la dosis del ingrediente activo a ser administrada en un sujeto, o una porción conveniente de dicha dosis, por ejemplo, la mitad o un tercio de dicha dosis.

En un aspecto, la presente invención se refiere al uso de la composición farmacéutica anterior de anticuerpo anti-TRBV9 para tratar una enfermedad o trastorno mediado por linfocitos T que llevan un segmento TRBV9 dentro del receptor de células T, en un sujeto que lo necesite.

La cantidad terapéuticamente eficaz de composición farmacéutica de anticuerpo anti-TRBV9 según la presente invención depende de la afección del sujeto, la gravedad de la afección, la terapia previa y los antecedentes del paciente y su respuesta al agente terapéutico. La dosis adecuada puede ajustarse por decisión del médico que lo atiende, de modo que pueda administrarse al paciente una sola vez o mediante varias inyecciones.

En algunas realizaciones de la invención, el sujeto de tratamiento, o paciente, es un mamífero, preferentemente un sujeto humano. Dicho sujeto puede ser hombre o mujer, de cualquier edad.

En algunas realizaciones de la invención, la enfermedad o trastorno mediado por linfocitos T que llevan un segmento TRBV9 dentro del receptor de células T se selecciona del grupo que comprende: artropatías, enfermedades inflamatorias intestinales, enfermedades oculares, vasculitis, enfermedades del sistema circulatorio, enfermedades renales, enfermedades del sistema digestivo, trastornos linfoproliferativos.

En algunas realizaciones de la invención, la enfermedad o trastorno mediado por linfocitos T que llevan un segmento TRBV9 dentro del receptor de células T se selecciona del grupo que comprende:

- artropatías, en particular espondiloartritis [espondiloartritis axial radiográfica (espondilitis anquilosante), espondiloartritis axial, espondiloartritis periférica, artritis psoriásica, espondiloartritis asociada a enfermedades inflamatorias

intestinales, artritis reactiva, espondiloartritis periférica indiferenciada) sacroileítis asociada a psoriasis, sacroileítis asociada a enfermedades inflamatorias intestinales, oligoartropatía indiferenciada, espondilitis juvenil/artritis relacionada con entesitis, espondilitis anquilosante juvenil (artritis asociada a entesitis), artritis juvenil, artritis juvenil indiferenciada;

- enfermedades inflamatorias intestinales, en particular colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn;

- enfermedades oculares, en particular uveítis no infecciosas, uveítis anterior;

- vasculitis, en particular la enfermedad de Behcet;

- enfermedades del sistema circulatorio, en particular aortitis, fibrosis de las valvas de la válvula aórtica y/o mitral con regurgitación, alteraciones del ritmo, alteraciones de la conducción, disfunción ventricular izquierda, pericarditis, miocarditis;

- enfermedades renales, en particular la nefropatía IgA;

- enfermedades del aparato digestivo, en particular la celiaquía;

- enfermedades linfoproliferativas, en particular linfoma de células T, leucemia de células T.

En algunas realizaciones de la invención, la enfermedad o trastorno mediado por linfocitos T que llevan un segmento TRBV9 dentro del receptor de células T se selecciona del grupo que comprende: espondiloartritis, sacroileítis asociada a psoriasis, sacroileítis asociada a enfermedades inflamatorias intestinales, oligoartropatía indiferenciada, espondilitis juvenil/artritis relacionada con entesitis, espondilitis anquilosante juvenil (artritis asociada a entesitis), artritis juvenil, artritis juvenil indiferenciada, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, uveítis no infecciosa, uveítis anterior, enfermedad de Behcet, aortitis, fibrosis de las valvas de la válvula aórtica y/o mitral con regurgitación, alteraciones del ritmo, alteraciones de la conducción, disfunción ventricular izquierda, pericarditis, miocarditis, nefropatía IgA, enfermedad celíaca, linfoma de células T, leucemia de células T.

En algunas realizaciones de la invención, la espondiloartritis es espondiloartritis axial radiográfica (espondilitis anquilosante), espondiloartritis axial, espondiloartritis periférica, artritis psoriásica, espondiloartritis asociada a enfermedades inflamatorias intestinales, artritis reactiva, espondiloartritis periférica indiferenciada.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse como un único agente terapéutico o en combinación con otros agentes

terapéuticos según sea necesario. Así, en una realización, los presentes métodos de tratamiento y/o profilaxis se utilizan en combinación con la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de otro agente activo. El otro agente activo puede administrarse antes, durante o después de la administración de las composiciones farmacéuticas según la presente invención. El otro agente activo puede administrarse como parte de la presente composición o, alternativamente, como una formulación separada.

Aplicación de la invención

Los siguientes ejemplos se proporcionan para una mejor comprensión de la invención. Estos ejemplos son sólo para fines ilustrativos y no deben interpretarse de ninguna manera como una restricción del alcance de la invención.

Todas las publicaciones, patentes y solicitudes de patentes citadas en esta especificación se incorporan aquí por remisión. Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle a modo de ilustración y ejemplo para fines de claridad de la comprensión, será fácilmente aparente para aquellos de habilidad ordinaria en la técnica a la luz de las enseñanzas de esta invención que se pueden hacer a la misma ciertos cambios y modificaciones sin apartarse del espíritu o del alcance de las realizaciones anexas.

Métodos

1. Preparación de muestras de anticuerpo monoclonal frente a TRBV9.

Las muestras de anticuerpos a una concentración de 5-50 mg/ml se prepararon en Stirred Cell (Millipore) a presión. Para ello, se colocó la formulación inicial de anticuerpos en una celda, se concentró la proteína bajo una corriente de aire comprimido hasta una concentración deseada bajo agitación continua, tras lo cual se añadió a la celda, de forma escalonada, un volumen al menos 10 veces mayor de una solución acuosa con la formulación objetivo que comprendía agentes tamponadores, agentes osmóticos y, si era necesario, estabilizadores solubles en agua adicionales. Tras la diafiltración, se continuó concentrando hasta una concentración superior a la deseada, se descargó de la célula y se midió la concentración exacta de proteínas mediante espectroscopia UV. A continuación, añadimos a la muestra un concentrado de la correspondiente solución de excipientes y un concentrado de tensioactivo para producir una solución con la concentración de proteína objetivo.

Las muestras de proteínas con una concentración de 20 mg/ml o superior se prepararon en casetes Pellicon (Millipore) en modo de flujo tangencial. Para ello, se colocó la formulación inicial de anticuerpos en un tanque de diafiltración, se concentró la proteína

hasta una concentración deseada, se suministró al sistema un volumen al menos 10 veces mayor de la solución con la formulación objetivo que comprende agentes tamponadores y, si es necesario, estabilizadores solubles en agua adicionales. Tras la diafiltración, se continuó concentrando hasta una concentración superior a la deseada, se descargó del sistema y se midió la concentración exacta de proteínas.

Cuando se obtienen formulaciones que comprenden solubilizadores, por ejemplo, el poloxamer 188, los concentrados tensioactivos se añadieron al anticuerpo tras el diafiltrado y la concentración, con la dilución final del anticuerpo hasta la concentración objetivo con una solución de excipientes.

Durante el llenado aséptico en el recipiente final (por ejemplo, un recipiente de vidrio/plástico estéril, un vial o una jeringa), la solución de anticuerpos se filtró utilizando una membrana de esterilización de 0,22 µm.

2. Determinación de la concentración de proteínas en las muestras de ensayo

La concentración de proteínas se determinó por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 280 nm en placas de espectrofotometría UV. Cada muestra se diluyó con la solución apropiada de excipientes hasta una concentración de aproximadamente 0,5 mg/ml. Se colocaron 150 µl de la muestra diluida en un pocillo de la placa de espectrofotometría UV. La densidad óptica de las soluciones en los pocillos de la placa se midió con un espectrofotómetro de placa a una longitud de onda de 280 nm. Se utilizó una solución apropiada de excipientes como solución de referencia.

La concentración (mg/ml) de proteínas (C) se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$C = \frac{(A(280)_{\text{prot}} - A(280)_{\text{plac}}) * b}{\epsilon * l} ,$$

donde A₂₈₀ es el valor de la densidad óptica a una longitud de onda de 280 nm;

ε es un coeficiente de extinción de la proteína de prueba;

b es el factor de dilución total de una muestra;

l es el grosor de la capa en un pocillo de la placa. cm. donde es de 0,56 cm para una placa estándar de 96 pocillos de 200 µl. Es de 1 cm para una placa de media superficie de 175 µl. Es de 0,42 cm para una placa de tamaño completo de 150 µl.

3. Determinación de la temperatura de agregación de las proteínas mediante dispersión dinámica de la luz.

El punto de agregación de las proteínas de prueba (a una concentración de 1 a 5 mg/ml) se determinó utilizando el DynaPro Plate Reader II. Para ello, se colocaron 35 μ l de la solución en un pocillo de una placa de polímero negra con fondo ópticamente transparente, que se calentó gradualmente en el instrumento mientras se medía constantemente la intensidad de la luz dispersa.

Ajustes de medición:

- Temperatura inicial de medición - 25 °C.
- Intensidad de la luz dispersa a $\theta = 158^\circ$.
- Número de mediciones por réplica - 3.
- Tiempo por medición - 5 s.
- Velocidad de calentamiento - 0,15 °C/min.
- Temperatura final - 80 °C.

La tendencia de la temperatura y el punto de agregación se determinaron con el software Dynamics V7.

4. Determinación del punto de fusión de las proteínas por fluorimetría de barrido diferencial.

Se añadió la tinción fluorescente Sypro Orange a la muestra de proteínas. La muestra se analizó en un amplificador CFX96 C1000 Touch Thermal Cyclor en modo de tiempo real. El calentamiento fue de 25 a 85 °C, el canal de detección fue ROX. Se utilizó el software CFX Manager (Bio-Rad) para procesar los resultados.

5. Determinación del radio hidrodinámico de las partículas en solución mediante dispersión dinámica de la luz.

Para el análisis, se colocaron 35 μ l de muestra en cada concentración en los pocillos de una placa de polímero negra con fondo ópticamente transparente. El análisis se realizó con el instrumento DynaPro Plate Reader II. Cada pocillo se analizó 10 veces. Los datos resultantes se procesaron en el software Dynamics V7.

6. Determinación del parámetro de interacción de difusión (k_D) mediante dispersión de luz dinámica.

Se produjeron varias soluciones de proteínas, desde 30 mg/ml hasta 0,94 mg/ml, mediante dilución escalonada. Se utilizaron soluciones apropiadas de excipientes como disolvente.

Para el análisis, se colocaron 35 μ l de muestra en cada concentración en los pocillos de una placa de polímero negra con fondo ópticamente transparente. El análisis se realizó con el instrumento DynaPro Plate Reader II. Cada pocillo se analizó 10 veces. Los datos resultantes se procesaron en el software Dynamics V7, donde se trazó la dependencia del coeficiente de difusión con la concentración de proteína en la solución y se determinó la inclinación de la línea para la dependencia resultante.

7. Determinación de la estabilidad térmica bajo tensión térmica de 50°C (TS50).

Las muestras de ensayo se dividieron en 2 alícuotas de 150 µl cada una y se colocaron en viales de vidrio separados: 1 vial por composición se almacenó en un frigorífico a 5 ± 3 °C, el resto de viales se colocaron en un termostato y se incubaron a 50 °C durante 96 horas o 120 horas. Al seleccionar los puntos de control o tras el calentamiento, los viales se retiraron del termostato, se mantuvieron a temperatura ambiente durante unos 15 minutos y se transfirieron para su análisis.

8. Determinación de la estabilidad coloidal bajo agitación (SH800).

Las muestras de ensayo se dividieron en 2 alícuotas de 150 µl cada una y se colocaron en viales de vidrio, 1 vial por formulación se almacenó en un frigorífico a 5 ± 3 °C, el resto de viales se colocaron en un agitador térmico y se agitaron a 800 rpm a 5 ± 3 °C durante 96 o 120 horas. Durante la selección de los puntos de control o luego de ser sometidos a estrés, los viales se retiraron del agitador térmico y se transfirieron para su análisis.

9. Determinación de la estabilidad coloidal bajo congelación-descongelación (CD(-20)).

Las muestras de ensayo se dividieron en 2 alícuotas y se colocaron en viales de plástico: 1 vial por formulación se almacenó en un frigorífico a 5 ± 3 °C, el resto de viales se almacenaron en un congelador a menos (20 ± 2) °C hasta su completa congelación. A continuación, se sacaron los viales del congelador y se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que el contenido se descongeló por completo; las soluciones se mezclaron con un vórtex y se volvieron a colocar en el congelador. Esto se repitió el número de veces necesario. Luego de ser sometidos a estrés, los viales se sacaron del congelador, se mantuvieron a temperatura ambiente hasta que el contenido se descongeló por completo; las soluciones se mezclaron con un vórtex y se transfirieron para su análisis.

10. Determinación de la estabilidad bajo hidrólisis ácida (ácido).

Las muestras de ensayo se dividieron en 2 alícuotas y se colocaron en viales de polímero: 1 vial por formulación se almacenó en un frigorífico a 5 ± 3 °C (el control de entrada puede transferirse para su análisis una vez para todos los estudios al inicio del almacenamiento), el pH de los viales restantes se ajustó a $4,0 \pm 0,1$ o $3,0 \pm 0,1$ con solución de ácido clorhídrico mientras se agitaba, después, se transfirieron a un frigorífico a 5 ± 3 °C para su almacenamiento. Después de 1 hora o 24 horas, la hidrólisis se apagó mientras se agitaba añadiendo solución de hidróxido de sodio hasta el valor inicial de pH. A continuación, las soluciones se transfirieron para su análisis.

11. Determinación de la estabilidad bajo hidrólisis básica (Basic)

Las muestras de ensayo se dividieron en dos alícuotas y se colocaron en viales de polímero: un vial por formulación se almacenó en un frigorífico a 5 ± 3 °C (el control de entrada puede transferirse para su análisis una vez para todos los estudios al inicio del almacenamiento), el pH de los viales restantes se ajustó a $9,0 \pm 0,1$ con solución de hidróxido de sodio mientras se agitaba, a continuación, se transfirieron a un frigorífico para su almacenamiento a 5 ± 3 °C. Después de 1 hora o 24 horas, la hidrólisis se apagó mientras se agitaba añadiendo una solución de ácido clorhídrico hasta alcanzar el valor de pH inicial. A continuación, las soluciones se transfirieron para su análisis.

12. Almacenamiento acelerado.

Las muestras de prueba se dividieron en alícuotas separadas (una alícuota para el control de entrada - se permite transferir para el análisis una vez para todos los estudios al comienzo del almacenamiento) y se colocaron en viales de vidrio estériles separados: una parte de los viales para cada formulación se colocó en el refrigerador para su almacenamiento a 5 ± 3 °C (control de entrada), los viales restantes se colocaron en un termostato y se incubaron a 25 ± 2 °C durante 6 meses, seleccionando periódicamente puntos de control según el plan. Al seleccionar los puntos de control y tras el almacenamiento, los viales se retiraron del termostato y se transfirieron para su análisis.

13. Determinación de la pureza de la muestra mediante cromatografía líquida de alto rendimiento por exclusión de tamaño (SE HPLC).

Columna: Tosoh TSK-Gel G3000SWXL 7,8 mm ID $\times$ 30 cm, 5 μ m.

Precolumna: TSK-Gel Guard SW_{XL}, 6,0 mm ID $\times$ 4,0 cm, 7 μ m, 300Å.

Temperatura de la columna: 25°C.

Caudal de la fase móvil: 0,5 ml/min.

Volumen de inyección: 25 μ l.

Concentración de la muestra: 0,5 mg/ml.

Longitud de onda del detector: 214 y 360 nm.

Tiempo de elución: 30 min.

Fase móvil: Hidrogenofosfato disódico anhidro 14,2 mg/ml.

Cloruro sódico 11,688 mg/ml.

El pH de la fase móvil se ajustó a 6,9 con ácido ortofosfórico.

14. Evaluación del perfil de la variante de carga en el capilar en el instrumento Caliper LabChip GX II

El análisis se realizó de acuerdo con las instrucciones del kit de variantes de carga de proteínas HT. Las muestras de ensayo se ajustaron a una concentración de proteínas de 1 mg/ml diluyendo o concentrando en filtros de centrifuga Amicon Ultra 10 kDa (Millipore)

de 0,5 ml (dependiendo de la concentración inicial de las muestras). El contenido de proteínas se siguió por espectrofotometría UV a una longitud de onda de 280 nm.

Se añadieron 2 µl de solución de carboxipeptidasa a cada muestra resultante, y las muestras se incubaron durante 2 horas a una temperatura de 37 ± 2 °C. Tras el tiempo especificado, las muestras se dializaron contra agua en tubos de centrifuga Amicon Ultra y se concentraron a 2 mg/ml.

Se cargó una placa de 96 pocillos con las cantidades, como están especificadas en las instrucciones, de solución tampón de etiquetado, solución de tinción de la mezcla y 25 µl de la muestra de ensayo, se colocó la placa en un lugar oscuro durante 10 minutos, se cargó cada pocillo con 60 µl de agua y se mezcló.

La placa con las soluciones se centrifugó utilizando un rotor de centrifugado de placas y se colocó en el instrumento Caliper LabChip GX II. En el análisis se utilizó un chip especial que se llenó con una solución tampón de corrida con un pH acorde a las instrucciones. Los resultados se procesaron con el software LabChip GX.

15. Determinación del perfil de la variante de carga mediante cromatografía líquida de intercambio iónico (IE HPLC).

Columna: ProPac WCX-10, 4×250 mm, tamaño de partícula: 10 µm

Precolumna: ProPac WCX-10G, 4×50 mm, tamaño de partícula: 10 µm.

Eluyente A: Solución de dihidrogenofosfato sódico 28,8 mM, pH = 6,5

Eluyente B: Solución de 28,8 mM de dihidrogenofosfato sódico, 250 mM de cloruro sódico, pH= 6,5

Caudal: 0,7 ml/min.

Temperatura de la columna: 30 °C

Temperatura del automuestreador: 4 °C

Detector: UV, 280 nm, ancho de banda: 16 nm

Longitud de onda de referencia: 360 nm, ancho de banda de 100 nm

Volumen de la muestra: 40 µl, Modo de lavado con aguja

Tiempo de cromatografía: 60 min.

La muestra de ensayo se diluyó hasta una concentración de 1,0 mg/ml y se trató con carboxipeptidasa B en una proporción de 100:2,8; la solución resultante se agitó y se incubó durante 2 horas a una temperatura de 37 ± 2 °C.

Modo de elución:

N° de artículo	Tiempo, min	Eluyente A, %.	Eluyente B, %.	Modo de elución
1	0 - 3	91	9	Isocrático

2	3 - 44	91 → 70	9 → 30	Gradiente lineal
3	44- 45	70 → 0	30 → 100	Gradiente lineal
4	45 - 51	0	100	Isocrático
5	51 - 52	0 → 91	100 → 9	Gradiente lineal
6	52 - 60	91	9	Isocrático

16. Determinación de la pureza y de las impurezas relacionadas por electroforesis en gel capilar en presencia de dodecil sulfato de sodio (EC red. y no red.).

La muestra se diluyó hasta una concentración de 4,0 mg/ml. Se colocaron 25 µl de la solución resultante en un microtubo de 1,5 ml; se añadieron 70 µl de tampón de muestra SDS-MW, 2 µl de patrón interno con un peso molecular de 10 kDa, 5 µl de solución de yodoacetamida 0,5M (EC no red.) o 5 µl de 2-mercaptoetanol (EC red.). La solución resultante se agitó durante 15 s, se centrifugó durante 5 s a 2800 rpm y se colocó en un termostato de estado sólido a 65°C durante 4 min (CE no rojo.) o a 70°C durante 10 min (CE rojo.). La solución se enfrió a temperatura ambiente.

Se utilizó el método de análisis SDS MW Separation - PA 800 plus.met en el software 32Karat.

Condiciones de la electroforesis en gel capilar:

Capilar: 50 µm × 30,2 cm

Longitud efectiva del capilar: 20,0 cm

Polaridad: inversa, entrada en el lado izquierdo (-), salida en el lado derecho (+)

Temperatura capilar: 25°C

Tiempo de análisis y tensión de separación: 35 min, 15 kV

Longitud de onda de detección: 220 nm.

17. Determinación de la pureza de las muestras en el instrumento Caliper Labchip GXII en condiciones no reductoras.

Preparación de muestras para análisis.

Se utilizaron 700 µl de tampón de muestras HT Protein Express para preparar una solución de reconstitución. Se añadió al tampón un agente alquilante, 24,5 µl de yodoacetamida (IAM) 1M.

Se añadieron 35 µl de tampón de reconstitución al microtubo. Las muestras se diluyeron hasta una concentración de 2 mg/ml. Se añadieron 5 µl de muestra al tubo. Las muestras se desnaturalizaron a 100°C durante 5 minutos. Los tubos se mezclaron con un vórtex, después se añadieron 70 µl de agua y los tubos se mezclaron con un vórtex. Se transfirieron 44 µl de cada muestra a los pocillos de la placa de 96 pocillos.

Las soluciones de trabajo y la preparación del chip se realizaron de acuerdo con el protocolo del fabricante utilizando el kit de reactivos HT Protein Express. El lanzamiento del análisis es un procedimiento estándar. Método de análisis: HT Protein Express 200.

18. Determinación del perfil ácido-base de muestras por electroforesis de zona capilar.

La muestra de ensayo con un volumen de 50-100 µl se colocó en el ultrafiltro de centrífuga del tipo Amicon Ultra (0,5 ml, 10 kDa, UFC501096, Millipore Ltd.), se añadieron 400 µl de agua purificada y se realizó la ultrafiltración utilizando una centrífuga durante 10 min a 10000 rpm a una temperatura de 10 °C. El procedimiento de ultrafiltración se realizó 3 veces, cada vez se añadieron 400-450 µl de agua a cada residuo en los ultrafiltros de la centrífuga. Tras la ultrafiltración, los residuos se transfirieron a un microtubo de 0,5 ml.

El contenido de proteínas en la solución resultante se determinó por espectrofotometría.

Lanzamos el software 32Karat y elegimos el instrumento con detectores UV o PDA. Para el detector UV se seleccionó un filtro con una longitud de onda de 214 nm.

Condiciones de análisis:

Tensión de separación:	30 kV
Polaridad:	normal (entrada por la izquierda (+), salida por la derecha (-))
Temperatura capilar en el cartucho:	25 °C
Temperatura en la bandeja de muestras:	10 °C
Longitud de onda de detección:	214 nm
Velocidad de transferencia de datos:	4 Hz
Tiempo de análisis:	15 minutos

Se preparó el capilar de cuarzo con un diámetro interior de 50 µm y una longitud de 30,2 cm (la longitud efectiva era de 20 cm). El capilar se instaló en un cartucho con una abertura de 200 × 100 µm. Las siguientes soluciones se introdujeron en viales de plástico con un volumen de 1,5 ml:

- 1,5 ml de solución de HCl 0,1M;
- 1,5 ml de tampón de separación;
- 1,5 ml de agua purificada;
- 1,0 ml de agua de drenaje purificada.

Se eligió el método de análisis "CZE Conditioning - PA 800 plus ABP.met" en el software 32Karat.

19. Medición de la viscosidad de las muestras por viscometría

Se tomó una muestra de ensayo en un volumen de 350 - 400 µl con una pipeta para la medición de la viscosidad microVISC Pipettes. La pipeta se colocó en el viscosímetro RheoSence microVISC. La viscosidad se midió utilizando un termostato viscosímetro, en modo automático (AUTO) a 25,0 °C.

20. Medición del pH.

La muestra de ensayo en un volumen de 200-300 µl se transfirió a un microtubo y el pH se midió en el instrumento Mettler Toledo SevenEasy utilizando el electrodo Mettler Toledo InLabUltraMicro.

21. Determinación de la estabilidad bajo oxidación.

Las muestras de ensayo se dividieron en 2 alícuotas de 150 µl cada una y se colocaron en viales de vidrio separados: 1 vial por formulación se almacenó en un refrigerador a 5 ± 3 °C, se añadió peróxido de hidrógeno al resto de las muestras hasta alcanzar una concentración final de peróxido de hidrógeno del 0,1% en las muestras, las muestras se envejecieron durante 4 horas a (5 ± 3) °C. La oxidación se apagó añadiendo una cantidad equivalente de L-metionina.

22. Procesamiento de los resultados.

El cambio absoluto en los indicadores de calidad cuando se somete a tensiones se calculó mediante la fórmula:

$$\Delta = (\text{valor después de la tensión} - \text{valor antes de la tensión})$$

El cambio absoluto en el perfil de la variante de carga se calculó mediante la fórmula:

$$= |\text{contenido de la fracción ácida antes del estrés} - \text{contenido de la fracción ácida después del estrés}|$$

$$\begin{aligned} &+ |\text{contenido de la fracción básica antes del estrés} \\ &- \text{contenido de la fracción básica después del estrés}| \\ &+ |\text{contenido de la fracción dominante antes del estrés} \\ &- \text{contenido de la fracción dominante después del estrés}| \end{aligned}$$

23. Preparación de soluciones de infusión.

Las soluciones se prepararon diluyendo las formulaciones de prueba con una solución de NaCl al 0,9% hasta alcanzar una concentración de proteína de 0,5 mg/ml.

Ejemplos

Los ejemplos siguientes se dan para el anticuerpo anti-TRBV9 que comprende un dominio variable de cadena pesada que comprende:

- (a) HCDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1,
- (b) HCDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2, y
- (c) HCDR3 con una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo formado por SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 5 or SEQ ID NO: 6;

- 1) un dominio variable de cadena ligera que comprende:

- (a) LCDR1 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7,
- (b) LCDR2 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8, y
- (c) LCDR3 con la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 9.

En particular, los ejemplos siguientes se dan para el anticuerpo anti-TRBV9 que comprende un dominio variable de cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 14 y un dominio variable de cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17.

En particular, los ejemplos siguientes se dan para el anticuerpo anti-TRBV9 que comprende una cadena pesada que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25 (candidato 42 o anticuerpo 42).

Ejemplo 1. Selección de la naturaleza del sistema tampón.

Los agentes tamponantes seleccionados para su uso en el presente estudio son excipientes aptos para uso farmacéutico y utilizados en formulaciones de fármacos basados en proteínas terapéuticas. Para la base de la composición farmacéutica, se seleccionaron 4 sistemas tampón típicos adecuados para la administración parenteral: sistemas tampón de acetato, citrato, histidina y fosfato. Para facilitar la comparación de las propiedades estabilizadoras de soluciones tampón de distinta naturaleza, el pH y la concentración de las soluciones se redujeron a 5,5 y 20 mM, respectivamente.

Para evaluar la idoneidad de los sistemas tampón, estudiamos el efecto de la naturaleza de la solución tampón en las estabilidades coloidales y conformacionales de la proteína. Para evaluar el efecto, determinamos la temperatura de agregación, el punto de fusión, el parámetro de interacción de difusión, la capacidad de concentración, el cambio en la pureza y el perfil ácido-base tras el estrés térmico.

La tabla 1 muestra las formulaciones de las soluciones tampón del ensayo.

Tabla 1. Fórmulas de prueba.

Nro.	Designación	Formulación	
1	20 mM Acet pH 5,5	anti-TRBV9	1,5 - * mg/ml
		Acetato de sodio trihidratado	2,311 mg/ml
		Ácido acético glacial	a pH 5,5
		Agua para inyección	a 1 ml
2	20 mM Cit pH 5,5	anti-TRBV9	1,5 - * mg/ml
		Citrato de sodio dihidratado	4,465 mg/ml
		Ácido cítrico anhidro	0,925 mg/ml
		Agua para inyección	a 1 ml
3	20 mM His pH 5,5	anti-TRBV9	1,5 - * mg/ml
		L-histidina	0,746 mg/ml
		Clorhidrato de L-histidina monohidratado	3,185 mg/ml
		Agua para inyección	a 1 ml
4	20 mM PB pH 5,5	anti-TRBV9	1,5 - * mg/ml
		Dihidrógeno fosfato sódico dihidratado	2,97 mg/ml
		Hidrógeno fosfato disódico dihidratado	0,172 mg/ml
		Agua para inyección	a 1 ml

* La concentración máxima de proteínas está limitada por la concentración directa y se especifica en la Tabla 2.

Estudio de los indicadores de predicción de la estabilidad.

El parámetro de interacción de difusión (k_D) refleja el coeficiente de difusión de la muestra en función de la concentración

de moléculas. Si el coeficiente de difusión disminuye con el aumento de la concentración ($k_D < 0$), la polidispersidad de la solución dada aumenta y se forman partículas más grandes en ella. Estas muestras tienen una baja solubilidad y tienden a agregarse, por lo que no se recomienda su uso.

La temperatura de agregación y el punto de fusión permiten evaluar la tendencia a la agregación de la proteína. Las muestras más estables son aquellas en las que la agregación de partículas comienza a una temperatura más alta y en las que se forman partículas más pequeñas al calentarse.

Los resultados del estudio de la temperatura de agregación por el método 3, el punto de fusión por el método 4, el parámetro de interacción de difusión por el método 6 y la viscosidad por el método 19 se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Resultados del estudio de estabilidad y concentración directa de anti-TRBV9 en varias formulaciones.

Nro.	Formulación de prueba, mg/ml		DSF	DLS		Concentración directa							
	Proteína	Designación de la formulación	T _m , °C	Etiqueta, °C	kd	C in, mg/ml	V in, ml	C fin., mg/ml	V fin., ml	Rendimiento (%)	Cfin./Cin.	C η , mg/ml*	η , cP
1	5**	Acet	65,20	63,02	6,03E-03	1	1000	186	130	24,18	186	160	10,30
2	5**	PB	65,30	63,62	-1,00E-03	1	1000	187	100	18,70	187	160	17,15
3	5**	His	63,50	63,03	7,12E-03	1	1000	212	85	18,02	212	160	11,57
4	5**	Cit	64,70	58,96	-8,27E-03	1	1000	165	138	22,77	165	160	16,89

* Concentración de una muestra cuya viscosidad se ha determinado.

** La concentración de proteínas es específica del método y se indica en la descripción del mismo.

Determinación de la estabilidad térmica.

La estabilidad térmica se evaluó por el método 7. Antes y después del estrés térmico, la pureza se determinó por SE HPLC según el método 13, la pureza se determinó por electroforesis en condiciones no reductoras según el método 17, el perfil de variantes de carga se determinó en Labchip según el método 14, el radio hidrodinámico se determinó según el método 5. El cambio absoluto en el perfil de la variante de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Resultados del estudio de estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo estrés térmico.

Nro.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm	SE HPLC				Labchip no red.		Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Proteína	Designación de la formulación		Agregados, %		Monómero, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. TS50 96H
			CE	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE			Δ TS50 96H			
1	5	Acet	5,4	0,760	0,600	98,420	-1,108	93,0	n/a	6,7	63,1	30,3	15,9	-14,4	-1,5	31,8
2	5	PB	5,8	0,753	0,869	98,439	-1,613	93,3	-0,8	6,4	62,2	31,4	15,7	-14,8	-0,9	31,4
3	5	His	5,4	0,688	0,937	98,535	-1,687	92,5	-1,9	6,8	61,7	31,6	26,9	-18,8	-8,1	53,7

Nro.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm	SE HPLC				Labchip no red.		Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Proteína	Designación de la formulación		Agregados, %		Monómero, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. TS50 96H
			CE	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE			Δ TS50 96H			
4	5	Cit	7,5	0,740	1,016	98,477	-1,628	93,1	-6,0	6,4	62,5	31,1	11,9	-13,4	1,5	26,9

* La concentración de proteínas es específica del método y se indica en la descripción del mismo.

Las formulaciones basadas en tampón acetato mostraron excelentes propiedades estabilizadoras en términos de estabilidad conformacional (alto punto de fusión), estabilidad coloidal (alta temperatura de agregación por DLS, $k_D > 0$, alta concentración de proteína tras concentración directa, baja viscosidad de la solución a una concentración de proteína de 160 mg/ml, bajo contenido de agregados tras estrés térmico seguido de SE HPLC), estabilidad química (valores satisfactorios para el cambio en el perfil de isoformas tras estrés térmico).

Las formulaciones a base de tampón de histidina mostraron una excelente estabilidad coloidal: $k_D > 0$, alto valor de concentración resultante bajo concentración directa, baja viscosidad de la solución a una concentración de proteína de 160 mg/ml.

Ejemplo 2. Selección del pH/concentración de la solución tampón

En este estudio, se seleccionaron dos sistemas tampón típicos, el de acetato y el de histidina, que son adecuados para la administración parenteral, como base de la composición farmacéutica. El estudio se realizó con un diseño experimental completo de dos factores con dos niveles y un punto central. Se estudiaron como factores cuantitativos el nivel de pH (de 5,0 a 6,0 para la solución tampón de acetato y de 5,5 a 6,5 para la solución tampón de histidina) y la concentración de agentes tampón (de 5 a 50 mM).

Para evaluar la idoneidad de los sistemas tampón, estudiamos el efecto de la naturaleza de la solución tampón en las estabilidades coloidales y conformacionales de la proteína. Como respuesta, se determinaron la temperatura de agregación, el punto de fusión, el parámetro de interacción de difusión, los cambios en la pureza y el perfil ácido-base tras el estrés térmico, y la capacidad de concentración. Las formulaciones del ensayo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Fórmulas de prueba.

Nro.	pH	Concentración, mM	Designación	Formulación
Solución tampón de acetato				
1	6,0	5	pH máx, C mín	anti-TRBV9 1,5 - 30 mg/ml Acetato sódico 0,644 mg/ml trihidrato Ácido acético a pH 6,0 glaciar Agua para inyección a 1 ml
2	6,0	50	pH máx, C máx	anti-TRBV9 1,5 - 30 mg/ml Acetato sódico 6,443 mg/ml trihidrato Ácido acético a pH 6,0 glaciar Agua para inyección a 1 ml
3	5,0	50	pH mín, C máx	anti-TRBV9 1,5 - 30 mg/ml Acetato sódico 4,355 mg/ml trihidrato

Nro.	pH	Concentración, mM	Designación	Formulación	
				Ácido acético glaciar	a pH 5,0
				Agua para inyección	a 1 ml
4	5,0	5	pH mín, C mín	anti-TRBV9 Acetato sódico trihidrato	1,5 - 30 mg/ml 0,436 mg/ml
				Ácido acético glaciar	a pH 5,0
				Agua para inyección	a 1 ml
5, 5' *	5,5	27,5	C medio, pH medio	anti-TRBV9 Acetato sódico trihidrato	1,5 - 30 mg/ml 2,889 mg/ml
				Ácido acético glaciar	a pH 5,5
				Agua para inyección	a 1 ml
Solución tampón de histidina					
6	6,5	5	pH máx, C mín	anti-TRBV9 L-histidina L-histidina h/c Monohidrato	1,5 - 30 mg/ml 0,58 mg/ml 0,27 mg/ml
				Agua para inyección	a 1 ml
7	6,5	50	pH máx, C máx	anti-TRBV9 L-histidina L-histidina h/c monohidrato	1,5 - 30 mg/ml 5,8 mg/ml 2,7 mg/ml
				Agua para inyección	a 1 ml
8	5,5	50	pH mín, C máx	anti-TRBV9 L-histidina L-histidina h/c monohidrato	1,5 - 30 mg/ml 2,3 mg/ml 7,4 mg/ml
				Agua para inyección	a 1 ml
9	5,5	5	pH mín, C mín	anti-TRBV9 L-histidina L-histidina h/c monohidrato	1,5 - 30 mg/ml 0,23 mg/ml 0,74 mg/ml
				Agua para inyección	a 1 ml
10, 10' *	6,0	27,5	pH medio, C medio	anti-TRBV9 L-histidina L-histidina h/c monohidrato	1,5 - 30 mg/ml 2,25 mg/ml 2,25 mg/ml
				Agua para inyección	a 1 ml

*2 réplicas por formulación

Estudio de los indicadores de predicción de la estabilidad.

Los resultados de la determinación de la temperatura de agregación por el método 3, del punto de fusión por el método 4, del parámetro de interacción de difusión por el método 6 y de la capacidad de concentración por el método 1 se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Resultados del estudio de estabilidad y concentración directa de anti-TRBV9 en varias formulaciones.

Nro.	Formulación de prueba, mg/ml		Tm, °C	Etiqueta, °C	kd	Concentración directa
	Proteína	Designación de la formulación				C fin., mg/ml
1	5*	Acet, 6,0, 5mM	65,4	64,32	3,82E-02	36,8
2	5*	Acet, 6,0, 50mM	65	62,28	-2,45E-03	37,4
3	5*	Acet, 5,0, 50mM	63,3	62,21	7,13E-03	38,18
4	5*	Acet, 5,0, 5mM	65,5	67,15	7,75E-02	40,42
5	5*	Acet, 5,5, 27,5mM	65	63,99	2,92E-03	38,17
5'	5*	Acet, 5,5, 27,5mM	65	n/a	n/a	38,17
6	5*	His, 6,5, 5mM	65,2	66,04	6,12E-02	41,4
7	5*	His, 6,5, 50mM	65,4	63,57	-3,66E-04	37,3
8	5*	His, 5,5, 50mM	62,1	61,7	7,00E-03	32,7
9	5*	His, 5,5, 5mM	64,1	66,73	5,84E-02	34,54
10	5*	His, 6,0, 27,5mM	65,2	62,81	7,37E-03	35,4
10'	5*	His, 6,0, 27,5mM	65,2	n/a	n/a	35,4

* La concentración de proteínas es específica del método y se indica en la descripción del mismo.

Las formulaciones 5' y 10' son formulaciones repetidas 5 y 10, respectivamente.

Determinación de la estabilidad térmica.

La estabilidad térmica se evaluó por el método 7. Antes y después del estrés térmico, la pureza se determinó mediante SE HPLC por el método 13, la pureza se determinó mediante electroforesis en condiciones no reductoras por el método 17, el perfil de variante de carga se determinó en capilar por el método 14, el radio hidrodinámico se determinó por el método 5, el cambio absoluto en el perfil de variante de carga se determinó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Resultados del estudio de estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo estrés térmico.

Nr o.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámi co, nm		SE HPLC				Labchip no red.		Perfil ácido-base Labchip, %.						
	Prot eína	Designación de la formulación			Agregados , %		Monómero, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácid o	Δ abs. TS50 96H
			CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE			Δ TS50 96H			
1	5*	Acet, 6,0, 5mM	4,6	0	0,74	0,67	98,08	-1,46	94,6	-2,3	7,95	66,46	25,6	16,3	-16,8	0,5	33,6
2	5*	Acet, 6,0, 50mM	5,6	0,7	0,76	1,5	98,12	-2,52	94,5	-2,3	8,44	66,65	24,92	13,8	-15,1	1,3	30,3
3	5*	Acet, 5,0, 50mM	5,4	0,5	0,68	2,41	98,15	-3,74	94,1	-1,2	9,3	65,7	25,01	30,5	-24,3	-6,2	61
4	5*	Acet, 5,0, 5mM	3,9	-0,3	0,69	0,08	98,2	-1,07	93,9	-3,4	9,28	66,06	24,68	27,7	-23,0	-4,7	55,3
5	5*	Acet, 5,5, 27,5mM	5,5	0,2	0,74	1,35	98,16	-2,27	91,2	-1,1	8,99	66,62	24,4	20,5	-18,9	-1,6	41,1
5'	5*	Acet, 5,5, 27,5mM	5,5	0,2	0,76	1,33	98,13	-2,22	90,9	-1	8,91	66,88	24,22	20,7	-19,4	-1,3	41,4
6	5*	His, 6,5, 5mM	3,8	-0,3	0,81	0,21	98,21	-0,97	91	-0,1	8,12	66,84	25,04	12,0	-14,4	2,4	28,8
7	5*	His, 6,5, 50mM	5,5	0,4	0,71	0,83	98,13	-1,82	90,8	-0,9	8,08	67,55	24,37	12,9	-15,2	2,4	30,5
8	5*	His, 5,5, 50mM	5,5	0,8	0,65	2,27	98,24	-3,33	89	-0,1	9,19	66,59	24,22	33,8	-25,6	-8,2	67,7
9	5*	His, 5,5, 5mM	4,3	-0,2	0,7	0,05	98,24	-0,85	91	-0,5	8,72	66,58	24,71	29,4	-23,1	-6,3	58,7
10	5*	His, 6,0, 27,5mM	5,5	0	0,72	0,71	98,16	-1,51	90,8	2,1	8,33	66,83	24,86	19,8	-17,9	-2,0	39,6
10'	5*	His, 6,0, 27,5mM	5,5	0,1	0,73	0,69	98,13	-1,43	92,7	0,3	8,31	67,37	24,32	19,3	-18,8	-0,6	38,6

* La concentración de proteínas es específica del método y se indica en la descripción del mismo.

Las formulaciones 5' y 10' son formulaciones repetidas 5 y 10, respectivamente.

Las composiciones farmacéuticas a base de tampón acetato mostraron una excelente estabilidad conformacional y un elevado punto de fusión. Además, estas formulaciones se caracterizan por lo siguiente: alta temperatura de agregación y valor k_D , un ligero aumento de las impurezas (seguido de SE HPLC y LabChip) y ningún cambio en el radio hidrodinámico bajo estrés térmico. Además, estas formulaciones mostraron la capacidad de estabilizar el perfil de la variante de carga.

Las formulaciones basadas en el tampón de histidina demostraron una excelente estabilidad conformacional: la proteína de ensayo en el tampón dado tiene un punto de fusión elevado, estabilidad coloidal: temperatura de agregación y valor k_D elevados, lo que indica su mayor estabilidad y menor tendencia a la agregación bajo concentración y diafiltración. Estas formulaciones mostraron altos valores de concentración bajo concentración directa y, según los resultados del control, hay un ligero cambio en la calidad de la proteína bajo estrés térmico (cuando se sigue por SE HPLC y Labchip en condiciones no reductoras). Además, estas formulaciones demuestran una excelente estabilización del perfil ácido-base.

Ejemplo 3. Selección del agente osmótico.

El presente estudio emplea el sistema tampón de histidina como base de la composición farmacéutica. Se estudiaron los excipientes adecuados para la administración parenteral para ser utilizados como agentes osmóticos. La cantidad de agentes osmóticos que proporciona una osmolaridad cercana a la del medio fisiológico del organismo se calculó mediante la fórmula:

$$C_{osm} = \frac{m}{M} \cdot n \cdot 1000$$

donde C_{osm} es la osmolaridad de la solución, en miliosmol por litro (mOsm/l);

m es el contenido de sustancia en la solución, en g/l;

M es la masa molar de la sustancia, g;

n es el número total de iones producidos a partir de una molécula de soluto como resultado de la disociación ($n = 1$ para sustancias no disociables; $n = 2, 3$ para sustancias que producen el número respectivo de iones al disolverse).

Para evaluar la idoneidad de los sistemas tampón, estudiamos el efecto de la naturaleza de la solución tampón en las estabilidades coloidales y conformacionales de la proteína. Como respuesta, se determinaron la temperatura de agregación, el punto de fusión, el parámetro de interacción de difusión, los cambios de pureza y el perfil ácido-base tras el estrés térmico, la hidrólisis ácida y la agitación; además, se evaluó la capacidad de concentración. Las formulaciones del ensayo se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Fórmulas de prueba.

Nr o.	Designación	Formulación	Osm teórico del agente osmótico, mOsm/l
1	Hist	anti-TRBV9 1,5 - 90* mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml L-histidina h/c monohidrato 0,35 mg/ml Agua para inyección a 1 ml	13
2	Tre	anti-TRBV9 1,5 - 50* mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml L-histidina h/c monohidrato 350 mg/ml Trehalosa dihidratada 100 mg/ml Agua para inyección a 1 ml	264
3	Sorb	anti-TRBV9 1,5 - 90* mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml L-histidina h/c monohidrato 0,35 mg/ml Sorbitol 50 mg/ml Agua para inyección a 1 ml	274
4	Prol	anti-TRBV9 1,5 - 90* mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml L-histidina h/c monohidrato 0,35 mg/ml L-prolina 27 mg/ml Agua para inyección a 1 ml	253
5	NaCl 9,0	anti-TRBV9 1,5 - 90* mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml L-histidina h/c monohidrato 0,35 mg/ml Cloruro de sodio 9,0 mg/ml Agua para inyección a 1 ml	308
6	NaCl 4,5	anti-TRBV9 1,5 - 90* mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml L-histidina h/c monohidrato 0,35 mg/ml Cloruro de sodio 4,5 mg/ml Agua para inyección a 1 ml	154

* La concentración máxima de proteínas está limitada por la concentración directa.

Estudio de los indicadores de predicción de la estabilidad. Los resultados de la determinación de la temperatura de agregación por el método 3, del punto de fusión por el método 4, del parámetro de interacción de difusión por el método 6 y de la capacidad de concentración por el método 1 se muestran en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados del estudio de estabilidad y concentración directa de anti-TRBV9 en varias formulaciones.

Nro.	Formulación de prueba, mg/ml		Tm, °C	Etiqueta, °C	kd	Concentración directa					
	Proteína	Designación de la formulación				C in, mg/ml	V in, ml	C fin., mg/ml	V fin., ml	Rendimiento (%)	Cfin./Cin.
1	5*	Hist	66,3	64,33	3,07E-02	37,2	600	90,7	187	76	2,4
2	5*	Tre	67,8	67,01	5,12E-02	16,9	600	57,6	172	97	3,4
3	5*	Sorb	66,9	64,87	3,87E-02	32,4	600	91,8	170	80	2,8
4	5*	Prol	66,4	64,5	4,09E-02	39,4	600	91,4	170	66	2,3
5	5*	NaCl 9,0	64,4	58,8	-3,86E-03	24,1	600	90,7	129	81	3,8
6	5*	NaCl 4,5	64,6	60,69	-4,73E-03	28,4	600	83,0	145	71	2,9

* La concentración de proteínas es específica del método y se indica en la descripción del mismo.

Determinación de la estabilidad térmica.

La estabilidad térmica se evaluó por el método 7. Antes y después del estrés térmico, determinamos: la pureza por SE HPLC por el método 13, las purezas por electroforesis en condiciones no reductoras por el método 17, el perfil de variantes de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 9.

Tabla 9. Resultados del estudio de estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo estrés térmico.

Nr o.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámi co, nm		SE HPLC				Labchip no red.		Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Prote ína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. TS50 96H
			CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE			Δ TS50 96H			
1	5*	Hist	3,3	0,9	0,92	0,31	98,12	1	93,1	1,9	7,63	61,62	30,75	9,83	-12,17	2,35	24,35
2	5*	Tre	5,6	-0,8	0,79	0,35	98,34	-1,07	93,1	0,3	7,2	62,97	29,83	9,81	-14,64	4,83	29,28
3	5*	Sorb	3,6	0,9	0,83	0,29	98,17	-1,1	91	2,1	8,12	63,99	27,89	9,07	-15,53	6,46	31,06
4	5*	Prol	3,5	3,6	0,76	0,28	98,23	1,02	91,1	2	7,84	64,56	27,60	9,63	-9,47	-0,16	19,26

Nr o.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámi co, nm		SE HPLC				Labchip no red.		Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Prote ína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. TS50 96H
			CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE			Δ TS50 96H			
5	5*	NaCl 9,0	5,7	1,6	0,84	1,71	98,08	-2,37	93,7	-0,7	9,42	65,88	24,70	9,32	-10,67	1,35	21,34
6	5*	NaCl 4,5	5,7	1,6	0,86	1,46	98,05	-2,17	93,8	-0,7	8,66	65,54	25,81	6,65	-8,89	2,23	17,77

* La concentración de proteínas es específica del método y se indica en la descripción del mismo.

Determinación de la estabilidad bajo hidrólisis ácida.

La estabilidad bajo hidrólisis ácida se evaluó por el método 10. Antes y después de la hidrólisis, determinamos: la pureza por SE HPLC por el método 13, la pureza por electroforesis en condiciones no reductoras por el método 17, el perfil de variantes de carga en capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados del estudio de la estabilidad del anti-TRBV9 en diversas formulaciones sometidas a hidrólisis ácida.

Nr o.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Labchip no red.		Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. Ácido 3,0 24H
			CE	Δ Ácido 3,0 24H	CE	Δ Ácido 3,0 24H	CE	Δ Ácido 3,0 24H	CE	Δ Ácido 3,0 24H	CE			Δ Ácido 3,0 24H			
1	5*	5mM His, pH=6,3	3,3	32,2	0,92	0,1	98,12	-0,19	93,1	1,0	7,63	61,62	30,75	-1,13	2,92	-1,78	5,83
2	5*	Tre	5,6	12,8	0,79	1,65	98,34	-1,97	93,1	-0,1	7,2	62,97	29,83	0,22	0,64	-0,86	1,72

Nr o.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Labchip no red.		Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Prote ína	Designa ción de la formula ción			Agregados, %		Monómero, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácid o	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. Ácido 3,0 24H
			CE	Δ Ácido 3,0 24H	CE	Δ Ácido 3,0 24H	CE	Δ Ácido 3,0 24H	CE	Δ Ácido 3,0 24H	CE			Δ Ácido 3,0 24H			
3	5*	Sorb	3,6	16,9	0,83	3,36	98,17	-3,81	91	2,4	8,12	63,99	27,89	0,53	-0,4	-0,13	1,06
4	5*	Prol	3,5	25,2	0,76	1,21	98,23	-1,4	91,1	2,1	7,84	64,56	27,60	1,57	-0,4	-1,16	3,13
5	5*	NaCl 9,0	5,7	238,8	0,84	n/a	98,08	n/a	93,7	n/a	9,42	65,88	24,70	n/a			n/a
6	5*	NaCl 4,5	5,7	4,9	0,86	24,96	98,05	-25,56	93,8	-0,5	8,66	65,54	25,81	18,1 7	- 14,88	-3,31	36,36

* La concentración de proteínas es específica del método y se indica en la descripción del mismo.

Determinación de la estabilidad bajo agitación.

La estabilidad bajo agitación se evaluó por el método 8. Antes y después de la agitación, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, la pureza por electroforesis en condiciones no reductoras por el método 17, el perfil de variantes de carga en capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 11.

Tabla 11. Resultados del estudio de estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo agitación.

Nr o.	Formulación de prueba, mg/ml		DLS		SE HPLC				Labchip no red.		Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Proteína	Designación de la formulación	Media Z, nm		Agregados, %		Monómero, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ
			CE	Δ SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE			Δ SH800 96H			abs. SH800 96H
1	5*	Hist	3,3	0,4	0,92	-0,03	98,12	0,1	93,1	-0,3	7,63	61,62	30,75	0,01	-0,16	0,14	0,31
2	5*	Tre	5,6	12,7	0,79	-0,08	98,34	0,07	93,1	-2,7	7,2	62,97	29,83	-0,40	0,79	-0,38	1,57
3	5*	Sorb	3,6	1,3	0,83	-0,03	98,17	0,02	91	1,3	8,12	63,99	27,89	-0,35	-0,08	0,43	0,86
4	5*	Prol	3,5	0,5	0,76	-0,02	98,23	0,05	91,1	0	7,84	64,56	27,60	-0,21	1,51	-1,30	3,02
5	5*	NaCl 9,0	5,7	-0,3	0,84	0,02	98,08	0,02	93,7	-2	9,42	65,88	24,70	-0,43	-0,56	1,00	1,99
6	5*	NaCl 4,5	5,7	-0,2	0,86	-0,01	98,05	0,07	93,8	0,7	8,66	65,54	25,81	-0,70	1,41	-0,72	2,83

* La concentración de proteínas es específica del método y se indica en la descripción del mismo.

Las formulaciones dadas demostraron un alto punto de fusión, una alta temperatura de agregación, así como un valor k_D aceptable. Las formulaciones dadas mostraron altos valores de concentración cuando se concentraron directamente y, según los resultados del control, hay un ligero cambio en la calidad de la proteína bajo estrés térmico y agitación (control por SE HPLC). Además, las formulaciones dadas demuestran un valor insignificante del cambio absoluto en el perfil ácido-base bajo agitación e hidrólisis ácida.

Ejemplo 4. Selección del agente osmótico con estabilizadores añadidos

El presente estudio emplea el sistema tampón de histidina como base de la composición farmacéutica. Los excipientes adecuados para la administración parenteral, que se enumeran en la Tabla 12, se estudiaron para ser utilizados como estabilizantes.

Para garantizar la osmolalidad fisiológica de las composiciones, se redujo el contenido de agentes osmóticos teniendo en cuenta la contribución de los estabilizantes a la osmolalidad de las soluciones.

Como parte del estudio, evaluamos el efecto de las formulaciones resultantes sobre la estabilidad coloidal y conformacional de la proteína. Como respuesta se determinaron la temperatura de agregación, el punto de fusión, el parámetro de interacción de difusión, los cambios en la pureza y en el perfil ácido-base tras el estrés térmico, la agitación, la hidrólisis ácida y varios ciclos de congelación-descongelación.

Tabla 12. Formulaciones de prueba en solución amortiguadora de histidina 5 mM con pH 6,3.

Nr o.	Designación	Formulación							Teoría general . Osm, mOsm/kg	Efecto estabilizador
		Proteína , mg/ml	Agente osmolítico			Estabilizador				
			Tipo	C, mg/ml	Teor. Osm, mOsm/kg	Tipo	C, mg/ml	Teor. Osm, mOsm/kg		
1	Sorb Arg 100 mM	1,5 - *	D-sorbitol	27	148	Clorhidrato de L- arginina	21,07	174	322	Aumenta la estabilidad térmica y la solubilidad de las proteínas. Contribuye a reducir la viscosidad. Presenta propiedades osmóticas.
2	Sorb Meth 10 mM	1,5 - *	D-sorbitol	50	274	L-metionina	1,49	10	284	Efecto antioxidante.
2'	Sorb Meth 10 mM	1,5 - *	D-sorbitol	50	274	L-metionina	1,49	10	284	Efecto antioxidante.
3	Sorb Meth 30 mM	1,5 - *	D-sorbitol	50	274	L-metionina	4,48	30	304	Efecto antioxidante.
3'	Sorb Meth 30 mM	1,5 - *	D-sorbitol	50	274	L-metionina	4,48	30	304	Efecto antioxidante.
4	Sorb Gly 100 mM	1,5 - *	D-sorbitol	36,1	198	L-glicina	7,51	98	296	Aumenta la estabilidad térmica y la solubilidad de las proteínas. Presenta propiedades osmóticas.
4'	Sorb Gly 100 mM	1,5 - *	D-sorbitol	36,1	198	L-glicina	7,51	98	296	Aumenta la estabilidad térmica y la solubilidad de las proteínas. Presenta propiedades osmóticas.
5	Sorb PS80	1,5 - *	D-sorbitol	50	274	Poloxamer 188	0,50	-	274	Tensioactivo no iónico. Previene la agregación de proteínas en ciclos de

Nr o.	Designación	Formulación							Teoría general . Osm, mOsm/kg	Efecto estabilizador
		Proteína , mg/ml	Agente osmolítico			Estabilizador				
			Tipo	C, mg/ml	Teor. Osm, mOsm/kg	Tipo	C, mg/ml	Teor. Osm, mOsm/kg		
										liofilización, congelación-descongelación. Suprime la formación de agregados en los límites de fase bajo mezclado y agitación.
6	Prol Gly 100 mM	1,5 - *	L-prolina	21	182	L-glicina	7,51	98	280	Aumenta la estabilidad térmica y la solubilidad de las proteínas. Presenta propiedades osmóticas.
6'	Prol Gly 100 mM	1,5 - *	L-prolina	21	182	L-glicina	7,51	98	280	Aumenta la estabilidad térmica y la solubilidad de las proteínas. Presenta propiedades osmóticas.
7	Prol Meth 10 mM	1,5 - *	L-prolina	27	235	L-metionina	1,49	10	245	Efecto antioxidante.
8	Prol 30	1,5 - *	L-prolina	30	260	-	-	-	260	-
9	Prol 27	1,5 - *	L-prolina	27	235	-	-	-	235	-
10	Prol Meth 10 mM	1,5 - *	L-prolina	30	260	L-metionina	1,49	10	270	Efecto antioxidante.
11	Prol Arg 100 mM	1,5 - *	L-prolina	13	113	Clorhidrato de L-arginina	21,07	174	287	Aumenta la estabilidad térmica y la solubilidad de las proteínas. Contribuye a reducir la viscosidad. Presenta propiedades osmóticas.

Nr o.	Designación	Formulación							Teoría general . Osm, mOsm/kg	Efecto estabilizador
		Proteína , mg/ml	Agente osmolítico			Estabilizador				
			Tipo	C, mg/ml	Teor. Osm, mOsm/kg	Tipo	C, mg/ml	Teor. Osm, mOsm/kg		
12	Prol PS80	1,5 - *	L-prolina	30	260	Polisorbato 80	0,55	-	260	Tensioactivo no iónico. Previene la agregación de proteínas en ciclos de liofilización, congelación- descongelación. Suprime la formación de agregados en los límites de fase bajo mezclado y agitación.
13	Prol Koll	1,5 - *	L-prolina	30	260	Poloxamer 188	0,55	-	260	
14	Prol PPG	1,5 - *	L-prolina	30	260	Polipropile nglicol	0,55	-	260	Alcohol diatómico, polímero de propilenglicol. Se utiliza como agente higroscópico, elemento portador y disolvente.

* La concentración máxima de proteínas está limitada por la concentración directa.

Las formulaciones 2', 3', 4' y 6' son repeticiones de las formulaciones 2, 3, 4 y 6, respectivamente.

Estudio de los indicadores de predicción de la estabilidad.

El punto de fusión se determinó por el método 4, el punto de agregación se determinó por el método 3. El parámetro de interacción de difusión se determinó por el método 6. Las muestras se concentraron según el método 1. La viscosidad se midió según el método 19. Los resultados se muestran en la Tabla 13.

Tabla 13. Resultados del estudio de estabilidad y concentración directa de anti-TRBV9, en varias formulaciones.

Nro .	Formulación de prueba, mg/ml		T _m , °C	Etiqueta, °C	kd	Concentración directa							
	Proteína	Designación de la formulación				C in, mg/ml	V in, µl	C fin., mg/ml	V fin., ml	Rendimiento (%)	Cfin./Cin.	C η, mg/ml*	η
1	5**	Sorb Arg 100 mM	64,9	61,04	-3,44E-03	21	2100	58	150	70	2,8	n/a	n/a
2	5**	Sorb Meth 10 mM	67,1	64,82	5,36E-02	31	1430	61	168	56	2	n/a	n/a
2'	5**	Sorb Meth 10 mM	n/a	66	n/a	29	1732	100	400	80	3,4	100	2,33
3	5**	Sorb Meth 30 mM	67	64,44	6,42E-02	33	1400	68	195	68	2,1	n/a	n/a
3'	5**	Sorb Meth 30 mM	n/a	66,3	n/a	29	1719	103	400	83	3,6	103	6,20
4	5**	Sorb Gly 100 mM	67,1	65,8	3.09E-02	27	1500	86	170	90	3,2	n/a	n/a
4'	5**	Sorb Gly 100 mM	n/a	66,54	n/a	26	1959	96	400	75	3,7	96	5,22
5	5**	Sorb PS80	66,8	65,91	2,65E-02	41	1200	80	213	70	2	n/a	n/a
6	5**	Prol Gly 100 mM	n/a	60,55	n/a	34	1478	119	400	95	3,5	119	6,31
6'	5**	Prol Gly 100 mM	n/a	65,8	8,97E-02	19	1200	73	275	111	3,8	73	2,33
7	5**	Prol Meth 10 mM	n/a	57,41	n/a	33	1539	94	350	65	2,8	94	5,56
8	5**	Prol 30	n/a	65,8	1,38E-01	21	2200	76	550	108	3,6	76	2,41
9	5**	Prol 27	n/a	65,4	1,17E-01	29	1200	85	368	111	2,9	85	2,89
10	5**	Prol Meth 10 mM	n/a	65,3	9,47E-02	34	1200	97	395	108	2,9	97	3,64
11	5**	Prol Arg 100 mM	n/a	61,9	-4,65E-03	29	1200	73	430	109	2,5	73	1,90

Las formulaciones 2', 3', 4' y 6' son repeticiones de las formulaciones 2, 3, 4 y 6, respectivamente.

* Concentración de una muestra cuya viscosidad se ha determinado.

** La concentración de proteínas es específica del método y se indica en la descripción del mismo.

Determinación de la estabilidad térmica.

La estabilidad térmica se evaluó por el método 7. Antes y después del estrés térmico, determinamos: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de variantes de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 14.

Tabla 14. Resultados del estudio de estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo estrés térmico.

Nr o.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Prote ína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. TS50 96H
			CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE			Δ TS50 96H			
1	5*	Sorb Arg 100 mM	6,1	-1,9	0,73	1,23	98,2	-1,91	9,49	62,70	27,81	5,54	-8,72	3,18	17,44
2	5*	Sorb Meth 10 mM	4,1	0,1	0,76	0,21	98,18	-0,94	9,64	61,54	28,82	6,29	-7,53	1,24	15,06
2'	5*	Sorb Meth 10 mM	4,3	0	0,85	0,22	97,2	-0,18	11,1 1	65,67	23,22	12,10	- 16,11	4,01	32,22
3	5*	Sorb Meth 30 mM	4,3	0,7	0,74	0,24	98,17	-1	7,47	63,27	29,25	12,46	- 15,12	2,67	30,25
3'	5*	Sorb Meth 30 mM	4,1	0,3	0,89	0,27	97,7	-0,99	10,8 6	65,22	23,92	12,21	- 16,35	4,14	32,7
4	5*	Sorb Gly 100 m	3,7	0,3	0,83	0,16	97,95	-1,02	7,22	64,35	28,43	13,08	- 13,42	0,34	26,84
4'	5*	Sorb Gly 100 mM	4,4	0,1	0,82	0,18	97,8	-0,98	11,0 6	65,71	23,23	11,80	- 15,60	3,80	31,2

Nr o.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Prote ína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. TS50 96H
			CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE			Δ TS50 96H			
5	5*	Sorb PS80	3,8	0,4	0,95	0,27	97,85	-1,08	9,02	63,40	25,57	10,95	- 16,06	7,12	34,13
6	5*	Prol Gly 100 mM	3,9	0,8	0,89	0,32	97,7	-1,21	11,14	64,45	24,41	11,01	- 12,95	1,94	25,9
6'	5*	Prol Gly 100 mM	4,3	0,1	0,67	-0,01	98,04	-0,8	13,56	63,22	23,23	10,61	- 11,65	1,05	23,31
7	5*	Prol Meth 10 mM	4	0	0,89	0,23	97,8	-0,94	11,21	65,57	23,22	11,79	- 13,41	1,62	26,82
8	5*	Prol 30	4,6	0,3	0,71	0,13	98,01	-0,69	11,92	64,99	23,10	12,57	- 13,68	1,10	27,35
9	5*	Prol 27	4,6	0	0,68	0,11	98,09	-0,67	14,90	63,84	21,26	10,85	- 11,73	0,88	23,46
10	5*	Prol Meth 10 mM	4,4	0,4	0,78	-0,16	98,18	-0,89	14,00	63,23	22,77	10,43	- 11,48	1,05	22,96
11	5*	Prol Arg 100 mM	5,8	1	0,67	1,14	98,11	-1,74	14,06	63,70	22,25	9,12	-9,06 0,07	- 0,07	18,25
12	5*	Prol PS80	n/a	n/a	0,66	0,34	97,97	-0,93	13,45	62,23	24,33	11,20	- 11,88	0,68	23,76

Nr o.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Prote ína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. TS50 96H
			CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE			Δ TS50 96H			
13	5*	Prol Koll	n/a	n/a	0,65	0,35	98,1	-1,03	13,67	62,81	23,53	10,82	- 11,52	0,69	23,03
14	5*	Prol PPG	n/a	n/a	0,58	0,14	98,03	-0,78	14,00	62,82	23,19	10,99	- 11,88	0,88	23,75

* La concentración de proteínas es específica del método y se indica en la descripción del mismo.

Las formulaciones 2', 3', 4' y 6' son repeticiones de las formulaciones 2, 3, 4 y 6, respectivamente.

Determinación de la estabilidad bajo hidrólisis ácida.

La estabilidad bajo hidrólisis ácida se evaluó por el método 10. Antes y después de la hidrólisis, determinamos: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de variantes de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Resultados del estudio de la estabilidad del anti-TRBV9 en diversas formulaciones sometidas a hidrólisis ácida.

Nr o.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. Ácido 3,0 24H
			CE	Δ Ácido 3,0 24H	CE	Δ Ácido 3,0 24H	CE	Δ Ácido 3,0 24H	CE			Δ Ácido 3,0 24H			
1	5*	Sorb Arg 100 mM	6,1	8	0,73	1,974	98,2	- 2,098	9,49	62,70	27,81	0,28	-0,85	0,57	1,7
2	5*	Sorb Meth 10 mM	4,1	9,2	0,76	0,007	98,18	- 0,115	9,64	61,54	28,82	-1,07	0,34	0,73	2,14
2'	5*	Sorb Meth 10 mM	4,3	n/a	0,85	n/a	97,2	n/a	11,11	65,67	23,22	n/a	n/a	n/a	n/a
3	5*	Sorb Meth 30 mM	4,3	6,6	0,74	0,105	98,17	- 0,195	7,47	63,27	29,25	1,00	0,91	-1,90	3,81
3'	5*	Sorb Meth 30 mM	4,1	n/a	0,89	n/a	97,7	n/a	10,86	65,22	23,92	n/a	n/a	n/a	n/a
4	5*	Sorb Gly 100 m	3,7	9,3	0,83	0,049	97,95	- 0,091	7,22	64,35	28,43	2,39	0,48	-2,87	5,74
4'	5*	Sorb Gly 100 mM	4,4	n/a	0,82	n/a	97,8	n/a	11,06	65,71	23,23	n/a	n/a	n/a	n/a
5	5*	Sorb PS80	3,8	5,7	0,95	4,135	97,85	- 4,551	9,02	63,40	25,57	0,79	-5,87	7,09	13,7 5
6	5*	Prol Gly 100 mM	3,9	n/a	0,89	n/a	97,7	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
6'	5*	Prol Gly 100 mM	4,3	n/a	0,67	3,67	98,04	-3,88	13,56	63,22	23,23	3,33	-2,74	-0,59	2,48
7	5*	Prol Meth 10 mM	4	n/a	0,89	n/a	97,8	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
8	5*	Prol 30	4,6	43	0,71	3,35	98,01	-3,55	11,92	64,99	23,10	-0,36	-1,33	1,69	4,84
9	5*	Prol 27	4,6	5,8	0,68	4,64	98,09	-4,87	14,90	63,84	21,26	0,89	-0,06	-0,84	2,99

Nr o.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. Ácido 3,0 24H
			CE	Δ Ácido 3,0 24H	CE	Δ Ácido 3,0 24H	CE	Δ Ácido 3,0 24H	CE			Δ Ácido 3,0 24H			
10	5*	Prol Meth 10 mM	4,4	7,2	0,78	12,77	98,18	-13,4	14,00	63,23	22,77	-14,06	-63,70	-22,25	4,08
11	5*	Prol Arg 100 mM	5,8	55,6	0,67	n/a	98,11	n/a	14,06	63,70	22,25	0,51	-1,69	1,17	16,38
12	5*	Prol PS80	n/a	n/a	0,66	3,53	97,97	-3,65	13,45	62,23	24,33	2,00	-2,93	0,91	1,2
13	5*	Prol Koll	n/a	n/a	0,65	5,85	98,1	-6,1	13,67	62,81	23,53	0,62	-1,76	1,14	3,88
14	5*	Prol PPG	n/a	n/a	0,58	4,95	98,03	-5,26	14,00	62,82	23,19	-0,36	-1,33	1,69	3,09

* La concentración de proteínas es específica del método y se indica en la descripción del mismo.

Las formulaciones 2', 3', 4' y 6' son repeticiones de las formulaciones 2, 3, 4 y 6, respectivamente.

Determinación de la estabilidad bajo agitación

La estabilidad bajo agitación se evaluó por el método 8. Antes y después de la agitación, determinamos: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de variantes de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 16.

Tabla 16. Resultados del estudio de estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo agitación.

Nro .	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. SH800 96H
			CE	Δ SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE			Δ SH800 96H			
1	5*	Sorb Arg 100 mM	6,1	-0,2	0,73	-0,04	98,2	0,09	9,49	62,70	27,81	-0,26	0,42	-0,15	0,83

Nro .	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. SH800 96H
			CE	Δ SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE			Δ SH800 96H			
2	5*	Sorb Meth 10 mM	4,1	0,9	0,76	-0,02	98,18	0	9,64	61,54	28,82	-0,68	1,18	-0,5	2,36
2'	5*	Sorb Meth 10 mM	4,3	n/a	0,85	n/a	97,2	n/a	11,11	65,67	23,22	n/a	n/a	n/a	n/a
3	5*	Sorb Meth 30 mM	4,3	0,6	0,74	-0,02	98,17	0,05	7,47	63,27	29,25	-0,13	-0,43	0,57	1,13
3'	5*	Sorb Meth 30 mM	4,1	n/a	0,89	n/a	97,7	n/a	10,86	65,22	23,92	n/a	n/a	n/a	n/a
4	5*	Sorb Gly 100 m	3,7	0,6	0,83	-0,1	97,95	0,19	7,22	64,35	28,43	0,39	-0,91	0,52	1,82
4'	5*	Sorb Gly 100 mM	4,4	n/a	0,82	n/a	97,8	n/a	11,06	65,71	23,23	n/a	n/a	n/a	n/a
5	5*	Sorb PS80	3,8	0,3	0,95	-0,01	97,85	0,05	9,02	63,40	25,57	-0,46	-0,18	2,65	3,29
6	5*	Prol Gly 100 mM	3,9	n/a	0,89	n/a	97,7	n/a	11,14	64,45	24,41	n/a	n/a	n/a	n/a
6'	5*	Prol Gly 100 mM	4,3	2	0,67	-0,04	98,04	0,08	13,56	63,22	23,23	0,44	0,69	-1,14	2,27
7	5*	Prol Meth 10 mM	4	n/a	0,89	n/a	97,8	n/a	11,21	65,57	23,22	n/a	n/a	n/a	n/a
8	5*	Prol 30	4,6	-0,6	0,71	-0,03	98,01	0,05	11,92	64,99	23,10	1,56	-2,04	0,46	4,06
9	5	Prol 27	4,6	0	0,68	-0,04	98,09	0,05	14,90	63,84	21,26	-1,04	-0,83	1,89	3,76
10	5*	Prol Meth 10 mM	4,4	0,1	0,78	-0,07	98,18	-0,12	14,00	63,23	22,77	-0,19	0,25	-0,06	0,5
11	5*	Prol Arg 100 mM	5,8	-0,1	0,67	-0,04	98,11	0,01	14,06	63,70	22,25	-0,52	-0,71	1,22	2,45

Nro .	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. SH800 96H
			CE	Δ SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE			Δ SH800 96H			
12	5*	Prol PS80	n/a	n/a	0,66	0,02	97,97	0,01	13,45	62,23	24,33	0,19	0,05	-0,25	0,49
13	5*	Prol Koll	n/a	n/a	0,65	0,02	98,1	-0,05	13,67	62,81	23,53	-0,19	-0,48	0,66	1,33
14	5*	Prol PPG	n/a	n/a	0,58	0,06	98,03	-0,12	14,00	62,82	23,19	-0,67	-0,39	1,04	2,1

* La concentración de proteínas es específica del método y se indica en la descripción del mismo.

Las formulaciones 2', 3', 4' y 6' son repeticiones de las formulaciones 2, 3, 4 y 6, respectivamente.

Determinación de la estabilidad bajo congelación-descongelación.

La estabilidad bajo congelación-descongelación se determinó únicamente para las formulaciones que contenían prolina. La estabilidad bajo congelación-descongelación se evaluó por el método 9. Antes y después de tres ciclos de congelación-descongelación, determinamos: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de variantes de carga en el capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

Tabla 17. Resultados del estudio de estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo congelación-descongelación.

Nr o.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Perfil de la variante de carga del Labchip, %.						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs. 3 ciclos cong- desc
			CE	Δ 3 ciclos cong- desc	CE	Δ 3 ciclos cong- desc	CE	Δ 3 ciclos cong- desc	CE			Δ 3 ciclos cong- desc			
6'	5*	Prol Gly 100 mM	4,3	-0,3	0,67	0,01	98,04	-0,01	13,56	63,22	23,23	0,15	0,72	-0,87	1,74
8	5*	Prol 30	4,6	-0,4	0,71	0,03	98,01	0,01	11,92	64,99	23,10	1,34	-1,91	0,57	3,82
9	5*	Prol 27	4,6	-0,4	0,68	0,02	98,09	-0,01	14,90	63,84	21,26	-1,23	-0,70	1,93	3,86
10	5*	Prol Meth 10 mM	4,4	1,1	0,78	0,02	98,18	-0,23	14,00	63,23	22,77	-0,17	0,46	-0,29	0,92
11	5*	Prol Arg 100 mM	5,8	0,6	0,67	0,02	98,11	-0,06	14,06	63,70	22,25	-0,57	-0,88	1,44	2,89
12	5	Prol PS80	n/a	n/a	0,66	0,05	97,97	0,03	13,45	62,23	24,33	-0,10	-0,30	0,39	0,79
13	5	Prol Koll	n/a	n/a	0,65	0,04	98,1	-0,09	13,67	62,81	23,53	-0,35	-0,77	1,11	2,23
14	5*	Prol PPG	n/a	n/a	0,58	0,08	98,03	-0,17	14,00	62,82	23,19	-0,54	-0,97	1,50	3,01

* La concentración de proteínas es específica del método y se indica en la descripción del mismo.

Las formulaciones dadas mostraron excelentes resultados en términos de estabilidad coloidal y química: se reveló un ligero cambio en el contenido de monómero y en el perfil de variante de carga bajo estrés térmico (SE HPLC, Labchip). Además, las composiciones dadas mostraron un punto de fusión y una temperatura de agregación elevados, lo que indica una gran estabilidad de la proteína bajo estrés térmico. Las formulaciones dadas también tienen una alta capacidad de concentración.

Ejemplo 5. Determinación de los factores cuantitativos críticos de la formulación y optimización de la formulación

El presente estudio emplea el sistema tampón de histidina como base de la composición farmacéutica. El estudio se realizó en el diseño experimental fraccionado de 3 factores con dos niveles. Se estudiaron como factores cuantitativos la concentración de proteínas (de 10 a 50), el pH (de 5,7 a 6,9) y la concentración de agente osmótico (de 19 a 35).

Como parte del estudio, evaluamos el efecto de los factores de prueba sobre la estabilidad coloidal y conformacional de la proteína. Como respuesta se determinaron la temperatura de agregación, el punto de fusión, el parámetro de interacción de difusión, los cambios en la pureza y en el perfil ácido-base tras estrés térmico, agitación, hidrólisis ácida y alcalina, varios ciclos de congelación-descongelación y oxidación.

Las formulaciones de prueba se muestran en la Tabla 18.

La Tabla 19 muestra las formulaciones de tampón de histidina 5 mM para varios pH implicados en el experimento.

Tabla 18. Formulaciones de prueba

Nro.	Designación	Proteína C, mg/ml	Solución tampón	pH	Prolina C, mg/ml
1	10 mg/ml His 5,7 + 35 Prol	10	5 mM His	5,7	35
2	30 mg/ml His 6,3 + 27 Prol	30	5 mM His	6,3	27
3	10 mg/ml His 6,9 + 19 Prol	10	5 mM His	6,9	19
4	50 mg/ml His 6,9 + 35 Prol	50	5 mM His	6,9	35
5	50 mg/ml His 5,7 + 19 Prol	50	5 mM His	5,7	19

Tabla 19. Formulaciones de soluciones tampón

Designación	Formulación
5 mM His, pH 5,7	L-histidina 0,259 mg/ml Clorhidrato de L-histidina 0,698 mg/ml monohidratado
5 mM His, pH 6,3	L-histidina 0,517 mg/ml Clorhidrato de L-histidina 0,35 mg/ml monohidratado
5 mM His, pH 6,9	L-histidina 0,689 mg/ml Clorhidrato de L-histidina 0,117 mg/ml monohidratado

Estudio de los indicadores de predicción de la estabilidad.

El punto de fusión y el punto de inicio de desnaturalización se determinaron por el método 4, el punto de agregación se determinó por el método 3. El parámetro de interacción de difusión se determinó por el método 6, el pH se midió por el método 20. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados del estudio de estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones

Nr o.	Formulación de prueba, mg/ml		pH de la solución proteica	DSF		DLS	
	Proteína	Designación de la formulación		Tonset, °C	Tm, °C	Etiqueta, °C	Kd
1	10	10 mg/ml His 5,7 + 35 Prol	5,75	53,8	66,1	65,27	5,29E-02
2	30	30 mg/ml His 6,3 + 27 Prol	6,40	52,3	66,4	62,19	8,22E-02
3	10	10 mg/ml His 6,9 + 19 Prol	6,75	53,5	65,8	62,33	9,98E-02
4	50	50 mg/ml His 6,9 + 35 Prol	7,20	52,3	66,1	58,45	1,06E-01
5	50	50 mg/ml His 5,7 + 19 Prol	5,86	53,5	65,8	61,86	6,75E-02

Determinación de la estabilidad térmica.

La estabilidad térmica se evaluó por el método 7. Antes y después del estrés térmico, determinamos: pureza por SE HPLC por el método 13, purezas por EC en condiciones no reductoras por el método 16, perfil de variantes de carga por el método 18, radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 21.

Tabla21. Resultados del estudio de estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo estrés térmico

N r o .	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				EC no red.		Perfil de la variante de carga (CZE), %.						
	Pr ot ei na	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Monómero %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs
			CE	TS50 120H	CE	Δ TS50 120H	CE	Δ TS50 120H	CE	Δ TS50 120H	CE			Δ TS50 120H			TS50 120H
1	10	10 mg/ml His 5,7 + 35 Prol	3,6	3,7	0,4	0,41	99,46	0,01	96,9	-1,59	3,18	74,68	22,14	37,32	-63,26	25,93	126,51
2	30	30 mg/ml His 6,3 + 27 Prol	2,5	2,5	0,43	0,9	99,44	0,47	96,74	-1,36	3,02	77,46	19,52	-1,20	-18,53	19,73	39,46
3	10	10 mg/ml His 6,9 + 19 Prol	2,4	2,9	0,44	0,8	99,42	0,37	96,75	-1,71	3,09	76,85	20,05	-1,21	-21,64	22,85	45,7
4	50	50 mg/ml His 6,9 + 35 Prol	3,1	3,9	0,51	1,58	99,38	1,07	96,62	-1,91	3,09	76,32	20,59	6,46	-26,91	20,45	53,82
5	50	50 mg/ml His 5,7 + 19 Prol	2,3	2,6	0,45	1,13	99,43	0,68	96,57	-0,81	3,17	74,51	22,32	22,10	-32,41	10,32	64,83

Determinación de la estabilidad bajo agitación.

La estabilidad bajo agitación se evaluó por el método 8. Antes y después de la agitación, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, la pureza por electroforesis en condiciones no reductoras por el método 16, el perfil de variantes de carga en capilar por el método 18, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Resultados del estudio de estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo agitación

Nr o.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinám ico, nm		SE HPLC				EC no red.		Perfil de la variante de carga (CZE), %.						
	Prote ína	Designaci ón de la formulaci ón			Agregados, %		Monómero, %		Monómero %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs
			CE	SH800 120H	CE	Δ SH800 120H	CE	Δ SH800 120H	CE	Δ SH800 120H	CE			Δ SH800 120H			SH800 120H
1	10	10 mg/ml His 5,7 + 35 Prol	3,6	3,5	0,4	0,39	99,46	-0,01	96,9	0,46	3,18	74,68	22,14	-0,15	-1,07	1,22	2,44
2	30	30 mg/ml His 6,3 + 27 Prol	2,5	2,3	0,43	0,43	99,44	0	96,74	0,46	3,02	77,46	19,52	0,07	-4,51	4,44	9,02
3	10	10 mg/ml His 6,9 + 19 Prol	2,4	2,3	0,44	0,39	99,42	-0,05	96,75	0,46	3,09	76,85	20,05	-0,14	-3,60	3,75	7,49
4	50	50 mg/ml His 6,9 + 35 Prol	3,1	2,8	0,51	0,46	99,38	-0,04	96,62	0,39	3,09	76,32	20,59	-0,06	-1,75	1,81	3,62
5	50	50 mg/ml His 5,7 + 19 Prol	2,3	2,3	0,45	0,42	99,43	-0,03	96,57	0,47	3,17	74,51	22,32	-0,38	1,91	-1,53	3,82

Determinación de la estabilidad bajo hidrólisis básica.

La estabilidad bajo hidrólisis básica se evaluó por el método 11. Antes y después de la hidrólisis, determinamos: la pureza por SE HPLC por el método 13, la pureza por electroforesis en condiciones no reductoras por el método 18, el perfil de variantes de carga en capilar por el método 14, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 23.

Tabla 23. Resultados del estudio de la estabilidad del anti-TRBV9 en diversas formulaciones sometidas a hidrólisis básica

Nro .	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				EC no red.		Perfil de la variante de carga (CZE), %.						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Monómero %		Alc .	Base	Ácido	Alc .	Base	Ácido	Δ abs
			CE	Básico 9,0 1H	CE	Δ Básico 9,0 1H	CE	Δ Básico 9,0 1H	CE	Δ Básico 9,0 1H	CE			Δ Básico 9,0 1H			Básico 9,0 1H
1	10	10 mg/ml His 5,7 + 35 Prol	3,5	5,8	0,46	0,82	99,47	0,36	97,32	0,35	7,06	76,36	16,58	0,12	- 0,69	0,57	1,38
2	30	30 mg/ml His 6,3 + 27 Prol	2,4	5,2	0,45	1,47	99,47	1,02	96,78	0,32	7,00	75,78	17,21	- 1,52	- 0,56	2,09	4,17
3	10	10 mg/ml His 6,9 + 19 Prol	2,4	n/a	0,44	2,15	99,5	1,71	96,92	0,36	6,11	76,29	17,59	- 1,67	- 5,26	6,94	13,87
4	50	50 mg/ml His 6,9 + 35 Prol	3,3	n/a	0,52	2,82	99,41	2,31	96,89	0,76	6,45	75,81	17,73	- 3,05	1,30	1,76	6,11
5	50	50 mg/ml His 5,7 + 19 Prol	2,4	4,5	0,46	2,81	99,48	2,35	97	0,35	7,19	75,94	16,87	0,50	- 0,11	- 0,39	1,0

Determinación de la estabilidad bajo hidrólisis ácida.

La estabilidad bajo hidrólisis ácida se evaluó por el método 10. Antes y después de la hidrólisis, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, la pureza por electroforesis en condiciones no reductoras por el método 16, el perfil de variantes de carga en capilar por el método 18, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24. Resultados del estudio de la estabilidad del anti-TRBV9 en diversas formulaciones sometidas a hidrólisis ácida

Nro .	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico , nm		SE HPLC				EC no red.		Perfil de la variante de carga (CZE)						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Monómero %		Alc .	Base	Ácido	Alc .	Base	Ácido	Δ abs
			CE	Ácido 4,0 1H	CE	Δ Ácido 4,0 1H	CE	Δ Ácido 4,0 1H	CE	Δ Ácido 4,0 1H	CE			Δ Ácido 4,0 1H			Ácido 4,0 1H
1	10	10 mg/ml His 5,7 + 35 Prol	3,5	6,2	0,46	0,54	99,47	0,08	97,32	0,38	7,06	76,36	16,58	-0,78	0,98	-0,2	1,96
2	30	30 mg/ml His 6,3 + 27 Prol	2,5	6,8	0,47	0,75	99,46	0,28	96,98	0,34	6,58	76,56	16,86	0,04	-0,09	0,06	0,19
3	10	10 mg/ml His 6,9 + 19 Prol	2,4	6,2	0,44	0,92	99,5	0,48	96,92	0,33	6,11	76,29	17,59	0,03	0,74	-0,76	1,53
4	50	50 mg/ml His 6,9 + 35 Prol	3,3	n/a	0,52	1,83	99,41	1,31	96,89	0,37	6,45	75,81	17,73	-0,27	0,6	-0,32	1,19
5	50	50 mg/ml His 5,7 + 19Prol	2,4	6,1	0,46	1,08	99,48	0,63	97	0,34	7,19	75,94	16,87	-0,69	1,4	-0,71	2,8

Determinación de la estabilidad bajo congelación-descongelación.

La estabilidad bajo congelación-descongelación se evaluó por el método 9. Antes y después de cinco ciclos de congelación-descongelación, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de variantes de carga en el capilar por el método 18, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Resultados del estudio de estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo cinco ciclos de congelación-descongelación

Nro .	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico , nm		SE HPLC				EC no red.		Perfil de la variante de carga (CZE)						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Monómero %		Alc .	Base	Ácido	Alc .	Base	Ácido	Δ abs
			CE	CD 5C	CE	Δ CD 5C	CE	Δ CD 5C	CE	Δ FT 5C	CE			CD 5C			CD 5C
1	10	10 mg/ml His 5,7 + 35 Prol	3,6	3,2	0,4	0,41	99,46	0	96,9	0,47	3,18	74,68	22,14	-0,48	2,03	-1,54	4,05
2	30	30 mg/ml His 6,3 + 27 Prol	2,5	2,2	0,43	0,45	99,44	0,02	96,74	0,41	3,02	77,46	19,52	-0,3	-1,29	1,59	3,18
3	10	10 mg/ml His 6,9 + 19 Prol	2,4	2,2	0,44	0,45	99,42	0,01	96,75	0,44	3,09	76,85	20,05	-0,27	-2,13	2,4	4,8
4	50	50 mg/ml His 6,9 + 35 Prol	3,1	2,8	0,51	0,49	99,38	-0,01	96,62	0,47	3,09	76,32	20,59	-0,34	-0,97	1,3	2,61
5	50	50 mg/ml His 5,7 + 19 Prol	2,3	2,4	0,45	0,44	99,43	-0,01	96,57	0,46	3,17	74,51	22,32	-0,4	1,8	-1,4	3,6

Determinación de la estabilidad bajo oxidación.

La estabilidad bajo oxidación se evaluó por el método 21. Antes y después de la oxidación, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, la pureza por electroforesis en condiciones no reductoras por el método 16, el perfil de variantes de carga en capilar por el método 18, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 26.

Tabla 26. Resultados del estudio de la estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo oxidación con H₂O₂

Nro .	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico , nm		SE HPLC				EC no red.		Perfil de la variante de carga (CZE)						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Monómero %		Alc .	Base	Ácido	Alc .	Base	Ácido	Δ abs
			CE	Óxido 0,1	CE	Δ Óxido 0,1%	CE	Δ Óxido 0,1%	CE	Δ Óxido 0,1%	CE			Δ Óxido 0,1%			Óxido 0,1
1	10	10 mg/ml His 5,7 + 35 Prol	3,6	3,5	0,46	-0,01	99,47	0,04	97,32	-1,11	7,06	76,36	16,58	-1,24	-1,03	2,27	4,54
2	30	30 mg/ml His 6,3 + 27 Prol	2,5	2,4	0,47	0,02	99,46	-0,01	96,98	-1,03	6,58	76,56	16,86	-0,80	-1,90	2,70	5,4
3	10	10 mg/ml His 6,9 + 19 Prol	2,4	2,6	0,44	0,01	99,5	-0,02	96,92	-0,72	6,11	76,29	17,59	-0,49	-2,98	3,49	6,96
4	50	50 mg/ml His 6,9 + 35 Prol	3,1	2,9	0,52	-0,04	99,41	0,05	96,89	-0,78	6,45	75,81	17,73	-0,81	-2,88	3,70	7,39
5	50	50 mg/ml His 5,7 + 19Prol	2,3	2,5	0,46	-0,01	99,48	0,02	97	-1,02	7,19	75,94	16,87	-0,99	-1,17	2,16	4,32

Las formulaciones dadas mostraron excelentes valores de punto de fusión, temperatura de agregación, radio hidrodinámico, así como el valor del parámetro de interacción de difusión, hecho que indica una alta estabilidad bajo estrés térmico y de otros tipos. Las formulaciones dadas también demostraron un efecto positivo sobre la estabilidad coloidal y química: un ligero cambio en el contenido de monómero (SE HPLC, EC no red.) bajo oxidación, hidrólisis básica y ácida y congelación-descongelación.

Ejemplo 6. Selección de agentes osmóticos y estabilizadores adicionales

El presente estudio emplea el sistema tampón de histidina (tampón de histidina 5 mM, pH 6,3) como base de la composición farmacéutica. Se estudiaron los excipientes adecuados para la administración parenteral que se utilizarían como estabilizantes y tensioactivos.

Como parte del estudio, evaluamos el efecto de cada uno de los agentes osmóticos, estabilizadores y tensioactivos de prueba sobre la estabilidad coloidal y conformacional de la proteína. Como respuesta se determinaron la temperatura de agregación, el punto de fusión, el parámetro de interacción de difusión, los cambios en la pureza y en el perfil ácido-base tras el estrés térmico, la agitación y varios ciclos de congelación-descongelación. Además, se evaluaron el radio hidrodinámico y la pureza (SE HPLC) antes y después del almacenamiento durante 24 horas a 2-8 °C en soluciones de infusión de las formulaciones dadas.

Las fórmulas de ensayo se muestran en la Tabla 27.

Tabla 27. Formulaciones de prueba

Nro.	Designación	Formulación
1	Prol 27 (5 mM His. pH 6,3)	anti-TRBV9 5 mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml Clorhidrato de L-histidina monohidratado 0,35 mg/ml L-prolina 27 mg/ml Agua para inyección a 1 ml
2	Prol 27 + 1 PS80 (5 mM His. pH 6,3)	anti-TRBV9 5 mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml Clorhidrato de L-histidina monohidratado 0,35 mg/ml L-prolina 27 mg/ml Polisorbato 80 1 mg/ml Agua para inyección a 1 ml
3	Prol + 1 PLXM188 (5 mM His. pH 6,3)	anti-TRBV9 5 mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml Clorhidrato de L-histidina monohidratado 0,35 mg/ml L-prolina 27 mg/ml Poloxamer 188 1 mg/ml Agua para inyección a 1 ml

Nro.	Designación	Formulación
4	Tre 100 (5 mM His. pH 6,3)	anti-TRBV9 5 mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml Clorhidrato de L-histidina monohidratado 0,35 mg/ml Trehalosa 100 mg/ml Agua para inyección a 1 ml
5	Tre + 1 PS80 (5 mM His. pH 6,3)	anti-TRBV9 5 mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml Clorhidrato de L-histidina monohidratado 0,35 mg/ml Trehalosa 100 mg/ml Polisorbato 80 1 mg/ml Agua para inyección a 1 ml
6	Tre + 1 PLXM188 (5 mM His. pH 6,3)	anti-TRBV9 5 mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml Clorhidrato de L-histidina monohidratado 0,35 mg/ml Trehalosa 100 mg/ml Poloxámero 188 1 mg/ml Agua para inyección a 1 ml
7	NaCl 9 (5 mM His. pH 6,3)	anti-TRBV9 5 mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml Clorhidrato de L-histidina monohidratado 0,35 mg/ml NaCl 9 mg/ml Agua para inyección a 1 ml
8	NaCl 9 + 1 PS80 (5 mM His. pH 6,3)	anti-TRBV9 5 mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml Clorhidrato de L-histidina monohidratado 0,35 mg/ml NaCl 9 mg/ml Polisorbato 80 1 mg/ml Agua para inyección a 1 ml
9	NaCl 9 + 1 PLXM188 (5 mM His. pH 6,3)	anti-TRBV9 5 mg/ml L-histidina 0,517 mg/ml Clorhidrato de L-histidina monohidratado 0,35 mg/ml NaCl 9 mg/ml Poloxámero 188 1 mg/ml Agua para inyección a 1 ml

Estudio de los indicadores de predicción de la estabilidad.

Las formulaciones que contienen tensioactivos no se sometieron a pruebas relacionadas con el calentamiento, como la determinación de la temperatura de inicio de la desnaturalización y el punto de fusión, la temperatura de agregación, lo que se debe a la degradación de los tensioactivos bajo el calentamiento y, en consecuencia, a resultados no interpretables. Además, no se sometieron a concentración directa, ya que la formación de micelas causada por los tensioactivos puede afectar al proceso de concentración.

Los resultados de la determinación de la temperatura de agregación por el método 3, la temperatura de inicio de desnaturalización y el punto de fusión por el método 4, el parámetro de interacción de difusión por el método 6 y la concentración directa por el método 1 se muestran en la Tabla 28.

Tabla 28. Resultados del estudio de las características fisicoquímicas del anti-TRBV9 en diversas formulaciones.

N r o .	DSF				DLS		Concentración directa					
	Designación de la formulación	Tonset, °C	Tm1, °C	Tm2, °C	Etiqueta, °C	kd	C fin., mg/ml	V fin., ml	Rendimiento (%)	Cfin./Cin.	C η, mg/ml *	η cp, mPa*s
1	Prol 27	52,6	66,1	n/a	65,66	5,52E-02	59,3	0,62	75	12,1	54,1	2,02
4	Tre 100	52,9	67,3	n/a	65,81	5,66E-02	77,2	0,57	89,8	15,8	54,4	2,26
7	NaCl 9	51,7	64,6	69,1	61,05	-3,35E-03	54,1	0,875	94,7	10,8	54,1	1,76

* Concentración de una muestra cuya viscosidad se ha determinado.

Determinación de la estabilidad térmica.

Tampoco se estudió la estabilidad térmica de las formulaciones de tensioactivos debido a su degradación por calentamiento.

La estabilidad térmica se evaluó por el método 7. Antes y después del estrés térmico, determinamos: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de variantes de carga por el método 15, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Resultados del estudio de estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo estrés térmico

Nro.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs
			CE	TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE	Δ TS50 96H	CE			Δ TS50 96H			TS50 96H

1	4,9	Prol 27	3,8	3,9	0,46	0,12	99,42	-0,59	8,51	63,96	27,53	12,85	-16,11	3,26	32,22
4	4,9	Tre 100	3,8	4	0,47	0,09	99,42	-0,52	8,16	63,68	28,16	13,43	-15,81	2,38	31,62
7	5	NaCl 9	5,9	6,8	0,45	-0,45	99,43	-1,02	9,99	63,68	26,33	11,18	-14,9	3,72	29,8

Determinación de la estabilidad bajo agitación.

La estabilidad bajo agitación se evaluó por el método 8. Antes y después de la agitación, se determinó: la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de variantes de carga por el método 15, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 30.

Tabla 30. Resultados del estudio de estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo agitación

N r o .	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs
			CE	SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE			Δ SH800 96H			SH800 96H
1	4,9	Prol 27	3,8	3,6	0,46	-0,03	99,42	0,07	8,51	63,96	27,53	1,24	-0,79	-0,45	2,48
2	4,9	Prol 27 + 1 PS80	3,8	3,7	0,55	0,2	99,34	-0,18	8,39	63,76	25,85	1,38	-0,84	1,47	3,69
3	4,9	Prol 27 + 1 PLXM188	3,5	3,2	0,54	-0,05	99,34	0,09	8,47	63,52	28,01	1,24	-0,3	-0,94	2,48
4	4,9	Tre 100	3,8	3,7	0,47	0	99,42	0,03	8,16	63,68	28,16	1,63	-0,57	-1,06	3,26
5	4,9	Tre 100 + 1 PS80	3,6	3,8	0,55	0,18	99,34	0,11	8,06	63,6	28,34	1,62	-0,77	-0,85	3,24
6	4,9	Tre 100 + 1 PLXM188	4	3,8	0,54	-0,03	99,35	-0,17	9,92	63,66	26,42	-0,19	-0,35	0,55	1,09
7	5	NaCl 9	5,9	5,7	0,45	0,02	99,43	-0,02	9,99	63,68	26,33	-0,3	-0,05	0,35	0,7
8	5	NaCl 9 + 1 PS80	5,8	5,6	0,55	0,19	99,32	0,13	9,93	63,59	26,48	-0,05	-0,41	0,46	0,92

N r o .	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs
			CE	SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE	Δ SH800 96H	CE		Δ SH800 96H				SH800 96H
9	5	NaCl 9 + 1 PLXM188	5,7	5,5	0,53	-0,03	99,34	-0,17	9,78	63,78	26,44	-0,19	-0,31	0,51	1,01

Determinación de la estabilidad bajo congelación-descongelación.

La estabilidad bajo congelación-descongelación se evaluó por el método 9. Antes y después de cinco ciclos de congelación-descongelación, determinamos: la pureza mediante SE HPLC por el método 13, el perfil de variantes de carga por el método 15, el radio hidrodinámico por el método 5; el cambio absoluto en el perfil de variantes de carga se calculó por el método 22. Los resultados se muestran en la Tabla 31.

Tabla 31. Resultados del estudio de estabilidad de anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo congelación-descongelación

Nro.	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico, nm		SE HPLC				Perfil de la variante de carga, en %						
	Proteína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %		Alc.	Base	Ácido	Alc.	Base	Ácido	Δ abs
			CE	Δ FT5C	CE	Δ FT5C	CE	Δ FT5C	CE			Δ FT5C			Δ FT5C
1	4,9	Prol 27	3,8	3,7	0,46	-0,04	99,42	-0,22	8,51	63,96	27,53	1,13	0,10	-1,22	2,45
2	4,9	Prol 27 + 1 PS80	3,8	3,9	0,55	-0,11	99,34	-0,17	8,39	63,76	25,85	-8,39	0,02	0,84	9,25
3	4,9	Prol 27 + 1 PLXM188	3,5	3,6	0,54	-0,11	99,34	-0,18	8,47	63,52	28,01	1,17	0,54	-1,7	3,41
4	4,9	Tre 100	3,8	3,6	0,47	-0,05	99,42	-0,24	8,16	63,68	28,16	1,37	0,1	-1,47	2,94
5	4,9	Tre 100 + 1 PS80	3,6	3,8	0,55	-0,12	99,34	-0,2	8,06	63,6	28,34	1,39	0,23	-1,62	3,24
6	4,9	Tre 100 + 1 PLXM188	4	3,7	0,54	-0,12	99,35	-0,16	9,92	63,66	26,42	-0,55	0,39	0,15	1,09
7	5	NaCl 9	5,9	5,9	0,45	-0,03	99,43	-0,26	9,99	63,68	26,33	-0,32	-0,16	0,48	0,96
8	5	NaCl 9 + 1 PS80	5,8	5,8	0,55	-0,1	99,32	-0,18	9,93	63,59	26,48	-0,13	-0,28	0,41	0,82
9	5	NaCl 9 + 1 PLXM188	5,7	6,1	0,53	-0,1	99,34	-0,18	9,78	63,78	26,44	-0,58	-0,03	0,61	1,22

Determinación de la estabilidad de las soluciones de infusión de la formulación resultante.

Las soluciones de infusión se prepararon según el método 23. Antes y después del almacenamiento de las soluciones de infusión, se determinó la pureza mediante SE HPLC por el método 13, el radio hidrodinámico se determinó por el método 5. Los resultados se muestran en la Tabla 32.

Tabla 32 Resultados del estudio de estabilidad del anti-TRBV9 en varias formulaciones bajo dilución con solución de infusión

N r o .	Formulación de prueba, mg/ml		Radio hidrodinámico , nm		SE HPLC			
	Prote ína	Designación de la formulación			Agregados, %		Monómero, %	
			CE	Δ 24H 5C	CE	Δ 24H 5C	CE	Δ 24H 5C
1	0,5	Prol 27	3,8	5,5	0,34	-0,04	99,52	-0,19
2	0,5	Prol 27 + 1 PS80	3,8	5,1	0,48	-0,09	99,37	-0,17
3	0,5	Prol 27 + 1 PLXM188	3,5	5,1	0,55	-0,11	99,3	-0,16
4	0,5	Tre 100	3,8	5,3	0,49	-0,06	99,35	-0,2
5	0,5	Tre 100 + 1 PS80	3,6	5,5	0,47	-0,08	99,39	-0,18
6	0,5	Tre 100 + 1 PLXM188	4	4,9	0,49	-0,04	99,38	-0,24
7	0,5	NaCl 9	5,9	5,4	0,49	-0,05	99,36	-0,21
8	0,5	NaCl 9 + 1 PS80	5,8	5,2	0,46	-0,06	99,4	-0,2
9	0,5	NaCl 9 + 1 PLXM188	5,7	5,2	0,51	-0,08	99,35	-0,22

Las formulaciones dadas mostraron una temperatura de inicio de desnaturalización y un punto de fusión elevados, así como una temperatura de agregación y un parámetro de interacción de difusión, lo que indica una mayor estabilidad térmica. Las formulaciones dadas demostraron una excelente estabilidad coloidal bajo agitación, congelación-descongelación y dilución con solución de infusión; también, las formulaciones dadas mostraron un ligero cambio en el contenido de monómero seguido por SE HPLC y una excelente estabilidad del perfil de variante de carga seguido por IE HPLC bajo todos los tipos de estrés.

Ejemplo 7. Confirmación de la estabilidad en envejecimiento acelerado

El presente estudio emplea el sistema tampón de histidina (tampón de histidina 5 mM, pH 6,3) como base de la composición farmacéutica, la prolina se utilizó como agente osmótico. Como parte del estudio, se estudió el efecto de la adición de tensioactivos a dos concentraciones diferentes, a saber 0,5 y 1,0 mg/ml; como muestra de referencia se utilizó una muestra sin tensioactivos.

Antes y después del estrés, se determinaron los cambios en la concentración, el pH, la pureza y el perfil ácido-base.

Las formulaciones de prueba se muestran en la Tabla 33.

Tabla33.Formulaciones de prueba.

Nro.	Designación	Formulación
1	Formulación 1*	L-histidina 0,517 mg/ml Clorhidrato de L-histidina monohidratado 0,350 mg/ml L-prolina 27 mg/ml Agua para inyección a 1 ml
2	Formulación 2*	L-histidina 0,517 mg/ml Clorhidrato de L-histidina monohidratado 0,350 mg/ml L-prolina 27 mg/ml Poloxamer 188 0,5 mg/ml Agua para inyección a 1 ml
3	Formulación 3*	L-histidina 0,517 mg/ml Clorhidrato de L-histidina monohidratado 0,350 mg/ml L-prolina 27 mg/ml Poloxamer 188 1 mg/ml Agua para inyección a 1 ml

* Se estudiaron concentraciones de proteínas de 25, 50, 100 mg/ml.

Determinación de la estabilidad en almacenamiento acelerado.

La estabilidad acelerada se evaluó por el método 12. Antes y después del estrés, se determinó el contenido de proteínas por el método 2, el pH por el método 20, la pureza por SE HPLC por el método 13, el perfil de variante de carga en capilar por el método 14.

Los resultados del estudio figuran en las Tablas 34-36.

Tabla 34. Resultados del estudio de estabilidad de la formulación 1 bajo almacenamiento acelerado a +37 °C a concentraciones de 25, 50 y 100 mg/ml.

Información de la muestra	Indicador	C teor. mg/ml	CE	AS37 2W	AS37 4W	Δ AS37 4W
Formulación 1	C, mg/ml	25	26	n/a	n/a	n/a
		50	49	n/a	n/a	n/a
		100	103	n/a	n/a	n/a
	pH	25	6,25	n/a	6,29	n/a
		50	6,36	n/a	6,36	n/a
		100	6,41	n/a	6,42	n/a
	SE HPLC (contenido de monómeros, %)	25	n/a	0,92	1,074	0,154
			n/a	95,29	94,68	-0,61
		50	n/a	1,41	1,65	0,24
			n/a	95,09	94,41	-0,68
		100	n/a	2,24	2,63	0,39
			n/a	93,28	91,94	-1,34
	EC (contenido de monómero, %)	25	n/a	95,88	96,18	0,30
		50	n/a	94,17	93,72	-0,45
		100	n/a	96,05	94,97	-1,08
		25	n/a	92,79	91,46	-1,33
		50	n/a	92,87	91,47	-1,40
		100	n/a	91,79	89,99	-1,80
	IE HPLC (de arriba abajo: contenido de la forma ácida, %; contenido de la forma	25	21,000	23,802	26,35	5,35
			60,408	46,79	39,487	-20,921
			18,592	29,408	34,163	15,571
		Δ abs PAB	n/a	27,236	41,842	n/a
		50	21,279	24,804	27,603	6,324
			60,381	47,5	41,28	-19,101

Información de la muestra	Indicador	C teor. mg/ml	CE	AS37 2W	AS37 4W	Δ AS37 4W
	básica, %; contenido de la forma alcalina, %)		18,340	27,696	31,117	12,777
		Δ abs PAB	n/a	25,762	38,202	n/a
		100 mg/ml	21,021	25,105	28,03	7,009
			59,855	48,176	42,047	-17,808
			19,125	26,719	29,923	10,798
		Δ abs PAB	n/a	23,357	35,615	n/a

Tabla 35. Resultados del estudio de estabilidad de la formulación 2 bajo almacenamiento acelerado a +37 °C a concentraciones de 25, 50 y 100 mg/ml.

Información de la muestra	Indicador	C teor. mg/ml	CE	AS37 2W	AS37 4W	Δ AS37 4W
Formulación 2	C, mg/ml	25	26	n/a	n/a	n/a
		50	52	n/a	n/a	n/a
		100	102	n/a	n/a	n/a
	pH	25	6,26	n/a	6,27	n/a
		50	6,32	n/a	6,28	n/a
		100	6,39	n/a	6,41	n/a
	SE HPLC (contenido de monómeros, %)	25	n/a	0,96	1,09	0,13
			n/a	95,20	94,37	-0,83
		50	n/a	2,23	2,96	0,73
			n/a	92,00	88,50	-3,5
		100	n/a	2,26	2,62	0,36
			n/a	92,86	91,56	-1,3

Información de la muestra	Indicador	C teor. mg/ml	CE	AS37 2W	AS37 4W	Δ AS37 4W
	EC (contenido de monómero, %)	25	n/a	95,75	96,15	0,40
		50	n/a	95,76	93,82	-1,94
		100	n/a	96,12	94,56	-1,56
		25	n/a	92,12	91,60	-0,52
		50	n/a	91,21	88,58	-2,63
		100	n/a	92,68	90,63	-2,05
	IE HPLC (de arriba abajo: contenido de la forma ácida, %; contenido de la forma básica, %; contenido de la forma alcalina, %)	25	20,77	24,027	26,096	5,326
			60,671	46,962	39,783	-20,888
			18,559	29,011	34,121	15,562
		Δ abs PAB	n/a	27,418	41,776	n/a
		50	21,319	28,324	31,717	10,398
			60,588	44,942	37,527	-23,061
			18,093	26,734	30,756	12,663
		Δ abs PAB	n/a	31,292	46,122	n/a
		100	20,497	25,168	28,016	7,519
			60,456	48,359	41,156	-19,3
			19,047	26,473	30,828	11,781
		Δ abs PAB	n/a	24,194	38,6	n/a

Tabla 36. Resultados del estudio de estabilidad de la formulación 3 bajo almacenamiento acelerado a +37 °C a concentraciones de 25, 50 y 100 mg/ml.

Información de la muestra	Indicador	C teor. mg/ml	CE	AS37 2W	AS37 4W	Δ AS37 4W
Formulación 3	C, mg/ml	25	26	n/a	n/a	n/a
		50	48	n/a	n/a	n/a

Información de la muestra	Indicador	C teor. mg/ml	CE	AS37 2W	AS37 4W	Δ AS37 4W
		100	103	n/a	n/a	n/a
	pH	25	6,23	n/a	6,25	n/a
		50	6,34	n/a	6,36	n/a
		100	6,39	n/a	6,42	n/a
	SE HPLC (contenido de monómeros, %)	25	n/a	1,07	1,08	0,01
			n/a	94,68	94,14	-0,54
		50	n/a	1,40	1,63	0,23
			n/a	95,17	94,34	-0,83
		100	n/a	2,32	2,55	0,23
			n/a	92,94	91,74	-1,2
	EC (contenido de monómero, %)	25	n/a	94,76	95,08	0,32
		50	n/a	96,82	94,89	-1,93
		100	n/a	95,51	94,23	-1,28
		25	n/a	92,93	91,65	-1,28
		50	n/a	93,56	92,83	-0,73
		100	n/a	92,50	91,20	-1,30
	IE HPLC (de arriba abajo: contenido de la forma ácida, %; contenido de la forma básica, %; contenido de	25	21,103	24,18	26,234	5,131
			60,051	46,5	39,455	-20,596
			18,846	29,32	34,312	15,466
		Δ abs PAB	n/a	27,102	41,193	n/a
		50	21,405	24,722	27,078	5,673
			60,41	48,117	41,129	-19,281
			18,184	27,161	31,792	13,608
		Δ abs PAB	n/a	24,587	38,562	n/a

Información de la muestra	Indicador	C teor. mg/ml	CE	AS37 2W	AS37 4W	Δ AS37 4W
	la forma alcalina, %)	100	20,922	25,443	27,657	6,735
			59,932	48,448	41,908	-18,024
			19,146	26,109	30,435	11,289
		Δ abs PAB	n/a	22,968	36,048	n/a

Las formulaciones dadas demostraron una excelente estabilidad coloidal en el estudio de estabilidad bajo almacenamiento acelerado ($T = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$), así como un alto contenido de monómero seguido por SE HPLC y estabilización del perfil de variante de carga seguido por IE HPLC.