FORMULACIÓN ESTABLE DE PROTEINA EN SOLUCION QUE CONTIENE UNA ALTA CONCENTRACION DE UN ANTICUERPO ANTI-VEGF

La presente solicitud reivindica prioridad de la solicitud estadounidense provisional de número de serie 62 / 088.061, presentada el 5 de diciembre de 2014, y a la solicitud estadounidense provisional de número de serie 62 / 076.770, presentada el 7 de noviembre de 2014, cuyas revelaciones están específicamente incorporadas por referencia en el presente documento.

Campo de la invención

La presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas acuosas de anticuerpos anti-VEGF, a un procedimiento para su preparación y a usos de las formulaciones.

Antecedentes de la invención

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un regulador conocido de la angiogénesis y la neovascularización y ha demostrado ser un mediador clave de la neovascularización asociada con tumores y trastornos intraoculares (Ferrara et al., Endocr. Rev. 18: 4-25 (1997)). El ARNm de VEGF está sobreexpresado en muchos tumores humanos y la concentración de VEGF en fluidos oculares está altamente correlacionada con la presencia de proliferación activa de vasos sanguíneos en pacientes con retinopatías relacionadas con la diabetes y otras isquemias (Berkman et al., J Clin Invest 91 : 153-159 (1993), Brown et al., Human Pathol. 26: 86 - 91 (1995), Brown et al., Cancer Res. 53: 4727 - 4735 (1993), Mattern et al., Brit. 73: 931 - 934 (1996), y Dvorak et al., Am. J. Pathol. 146: 1029 - 1039 (1995), Aiello et al., N. Engl. J. Med. 331: 1480-1487 (1994)). Además, losestudios recientes han demostrado la presencia de VEGF localizado en

membranas neovasculares coroides en pacientes afectados por AMD (Lopez et al., Invest. Ophtalmo, Vis. Sci. 37: 855-868 (1996)). Se pueden usar anticuerpos neutralizantes anti-VEGF para suprimir el crecimiento de una variedad de líneas celulares tumorales humanas en ratones desnudos y también inhibir la angiogénesis intraocular en modelos de trastornos retinales isquémicos (Kim et al., Nature 362: 841-844 (1993), Warren Y J. Clin. Invest 95: 1789 - 1797 (1995), Borgstrom et al., Cancer Res. 56: 4032 - 4039 (1996) y Melnyk et al., Cancer Res. 56: 921 - 924 (1996) (Adamis et al., Arch. Opthalmol., 114: 66 - 71 (1996)).

Se han aprobado varios anticuerpos para uso terapéutico en humanos y otros mamíferos, incluyendo anticuerpos anti-VEGF. La concentración de anticuerpos terapéuticos en formulaciones farmacéuticas líquidas varía ampliamente dependiendo, por ejemplo, de la vía de administración. Hay a menudo una necesidad de una formulación de alta concentración de un anticuerpo cuando se desean volúmenes pequeños. Por ejemplo, pueden ser deseables formulaciones de alta concentración para inyección intravítrea o administración subcutánea.

Sin embargo, las formulaciones con alta concentración de anticuerpo pueden tener una vida útil corta, y los anticuerpos formulados pueden perder actividad biológica causada por inestabilidades químicas y físicas durante el almacenamiento. Se sabe que la agregación, la desamidación y la oxidación son las causas más comunes de degradación de los anticuerpos. En particular, la agregación puede conducir potencialmente a una mayor respuesta inmune en los pacientes, lo que conduce a preocupaciones de seguridad. Por lo tanto, se debe minimizar o prevenir.

La formación de partículas en formulaciones bioterapéuticas es también un problema importante de calidad, ya que las partículas en el intervalo de tamaño de decenas de micrómetros a submilimétrico y milímetro pueden ser vistas generalmente por el ojo humano desnudo (véase Das, 2012, AAPS PharmSciTech, 13: 732- 746). Las partículas en preparaciones oftálmicas

terapéuticas pueden causar daño al ojo. Por lo tanto, existen normas reguladoras para asegurar que el contenido de materia particulada sub-visible en las formulaciones oftálmicas esté dentro de ciertos límites. Por ejemplo, la Convención de farmacopea de US (USP) ha establecido requisitos para partículas en soluciones oftálmicas, tales como el número máximo de partículas ≥ 10 µm de diámetro es de 50 por ml, el número máximo de partículas ≥ 25 µm de diámetro es de 5 por ml, Y el número máximo de partículas ≥ 50 µm de diámetro es 2 por ml determinado por el método microscópico de partículas (véase USP Capítulo general <789>).

Se conocen procedimientos para producir formulaciones de anticuerpos de alta concentración. Sin embargo, no existe un enfoque universal para superar el impacto impredecible de la secuencia de aminoácidos de un anticuerpo sobre su tendencia a formar agregados o degradarse en presencia de diversos excipientes farmacéuticos, buffers, etc. Además, preparar una formulación oftálmica con una alta concentración de proteína (tal como un anticuerpo) que contiene un nivel aceptable de partículas sub-visibles es desafiante y no predecible.

Es un objeto de la invención es proporcionar formulaciones adicionales y mejoradas con alta concentración de anticuerpos anti-VEGF y bajos niveles de agregación de anticuerpo y partículas sub-visibles, que son adecuadas para la administración a un ser humano, en particular a un ojo humano.

Breve descripción de la invención

Por consiguiente, la presente invención se refiere a una composición farmacéutica acuosa que comprende una alta concentración de anticuerpo anti-VEGF adecuado para la inyección oftálmica. En ciertos aspectos, las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención presentan niveles bajos o no detectables de agregación o degradación de anticuerpos, con muy poca o ninguna pérdida de las actividades biológicas durante la fabricación, preparación, transporte y largos períodos de almacenamiento, la concentración del anticuerpo anti-VEGF es al menos

aproximadamente 50 mg / ml, 60 mg / ml, 80 mg / ml, 100 mg / ml, 120 mg / ml, 140 mg / ml, 160 mg / ml, 180 mg / ml o 200 mg / ml.

La invención proporciona composiciones farmacéuticas acuosas que comprenden un anticuerpo anti-VEGF, un estabilizador, un tampón y un tensoactivo. En algunos aspectos, como composición farmacéutica acuosa comprende: (i) al menos 50 mg / ml de un anticuerpo anti-VEGF, (ii) sacarosa o trehalosa como estabilizante, (iii) un tampón de citrato o histidina, y (iv) polisorbato 80 como tensoactivo.

En ciertos aspectos, la composición farmacéutica acuosa comprende aproximadamente del 4,5% al 11% p/v de sacarosa o del 5 al 10% de trehalosa, del 0,006% al 0,012% de ácido cítrico (p/v), del 0,2% al 0,6% de citrato trisódico dihidratado (p/v) y aproximadamente 0,01% a 0,1% de polisorbato 80 (p/v), en el que el pH de la formulación es de 6,3 a 7,3.

Las realizaciones preferidas específicas de la invención se pondrán de manifiesto a partir de la siguiente descripción más detallada de ciertas realizaciones preferidas y en las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

La Fig. 1 muestra un gráfico de los resultados de un ensayo de turbidez para 1008 formulado a diferentes pH. El eje x muestra el tiempo de incubación a 55 °C; Mientras que el eje y muestra la densidad óptica monitorizada a 350 nm.

Las Fig. 2A y la Fig. 2B muestran un ensayo de turbidez que monitoriza los cambios en OD360 para diferentes formulaciones de 1008 incubadas a 55ºC durante 180 minutos (Figura 2A). Las curvas a OD360 obtenidas en 60 min se expanden y se muestran en (Figura 2B). Los números de muestra en las Figuras 2A y 2B corresponden al número de formulación en la Tabla 13.

La Figura 3 muestra un ensayo de turbidez con datos recogidos entre cero y 90 minutos por simplicidad. El experimento completo fue de 180 minutos. Los cambios en OD360 se controlaron para diferentes formulaciones 1008 incubadas a 55 °C. Los números de muestra en la figura corresponden a los números de formulación en la Tabla 15.

La Fig. 4 es un gráfico que muestra los resultados de SEC para el pico principal en las ocho formulaciones seleccionadas durante el almacenamiento de 6 semanas a 40ºC.

Descripcion detallada de la invencion

La invención proporciona composiciones farmacéuticas acuosas que comprenden una alta concentración de un anticuerpo anti-VEGF. En ciertas realizaciones, una composición farmacéutica acuosa de la invención es estable durante al menos 18 meses a 2-8ºC y es adecuada para administración ocular, incluyendo inyección o infusión. En una realización particular, una composición farmacéutica acuosa de la invención cumple los requisitos de USP <789> con relación a la presencia de materia partículado. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el número máximo de partículas ≥ 10 µm de diámetro en una composición farmacéutica acuosa de la invención es de 50 por ml, el número máximo de partículas ≥ 25 µm de diámetro en una composición farmacéutica acuosa de la invención es de 5 por ml, y el número máximo de partıculas ≥ 50 µm de diámetro en una composición farmacéutica acuosa de la invención es de 2 por ml, determinándose dichos números de partıculas por el método de oscurecimiento de la luz y / o conteo de partıculas microscópicas según se requiere en el Capítulo General de la Convención de farmacopea de US <789 >).

Como se usa en el presente documento, una composición farmacéutica "acuosa" es una composición adecuada para uso farmacéutico, en la que el vehículo acuoso es agua destilada. Una composición adecuada para uso farmacéutico debe ser estéril, homogénea y / o isotónica. Las composiciones farmacéuticas

acuosas se pueden preparar ya sea directamente en forma acuosa, por ejemplo en jeringa precargada lista para su uso (las "formulaciones líquidas") o como liofilizado para reconstituir poco antes de su uso. Tal como se usa en la presente memoria, el término "composición farmacéutica acuosa" se refiere a la formulación líquida o formulación liofilizada reconstituida. En ciertas realizaciones, las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención son adecuadas para la administración oftálmica a un sujeto humano. En una realización específica, las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención son adecuadas para administración intravítrea. En otra realización, las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención son adecuadas para la administración por infusión intravítrea.

La presente invención proporciona nuevas formulaciones farmacéuticas, en particular nuevas formulaciones farmacéuticas en las que el ingrediente activo comprende anticuerpos para VEGF humano. En un aspecto, la invención se refiere a una composición farmacéutica acuosa con alta concentración de anticuerpos anti-VEGF. Los anticuerpos anti-VEGF preferidos en las formulaciones de la invención se describen en el documento WO 2009/155724, cuyo contenido completo se incorpora en la presente como referencia.

El término anticuerpo, tal como se utiliza en la presente memoria, incluye anticuerpos enteros y cualquier fragmento de unión a antígeno (es decir, "porción de unión a antígeno", "polipéptido de unión a antígeno" o "inmunobente") o cadena única de los mismos. Un "anticuerpo" incluye una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces disulfuro, o una parte de unión a antígeno del mismo. Cada cadena pesada está compuesta por una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de la cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera está compuesta por una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como VL) y una región constante de cadena ligera. La región

constante de la cadena ligera está compuesta por un dominio, CL. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones más conservadas, denominadas regiones de armazón (FR). Cada VH y VL está compuesta por tres CDR y cuatro FRs, dispuestas desde el extremo amino hasta el extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesada y ligera contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a tejidos o factores del hospedero, incluyendo varias células del sistema inmune (por ejemplo, células efectoras) y el primer componente (Clq) del sistema clásico de complemento.

El término porción de unión a antígeno de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo") se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a un antígeno (v.g., VEGF). Se ha demostrado que la función de unión al antígeno de un anticuerpo puede realizarse mediante fragmentos de un anticuerpo de longitud completa. Ejemplos de fragmentos de unión abarcados dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo incluyen (i) un fragmento Fab, un fragmento monovalente que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (Ii) un fragmento $F(ab')_2$, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos por un puente disulfuro en la región bisagra; (iii) un fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iv) un fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo brazo de un anticuerpo, (v) un solo dominio o fragmento dAb (Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546), que consiste en Un dominio VH; Y (vi) una región aislada determinante de la complementariedad (CDR) o (vii) una combinación de dos o más CDR aisladas que pueden estar opcionalmente unidas por un enlazador sintético. Además, aunque los dos dominios del fragmento Fv, VL y VH, están codificados por genes separados, se pueden unir, utilizando métodos recombinantes,

mediante un enlazador sintético que les permite fabricarse como una única cadena proteica en la que las regiones VL y VH se emparejan para formar moléculas monovalentes (conocidas como Fv de cadena sencilla (scFv); véase por ejemplo, Bird et al (1988) Science 242: 423-426; y Huston et al (1988) Proc Natl Acad Sci. USA 85: 5879 - 5883). Tales anticuerpos de cadena única también están destinados a estar comprendidos dentro del término "porción de unión al antígeno" de un anticuerpo. Estos fragmentos de anticuerpo se obtienen usando técnicas convencionales conocidas por los expertos en la técnica, y los fragmentos se seleccionan para su utilidad de la misma manera que los anticuerpos intactos. Las porciones de unión al antígeno pueden producirse mediante técnicas de ADN recombinante, o por división enzimática o química de inmunoglobulinas intactas. Los anticuerpos pueden ser de diferente isotipo, por ejemplo, una IgG (por ejemplo, una IgG1, IgG2, IgG3, o subtipo IgG4), IgA1, IgA2, IgD, IgE, o anticuerpo IgM.

En una realización preferida, una composición farmacéutica acuosa de la invención comprende una cadena pesada variable que tiene la secuencia que se expone en la SEQ ID NO: 1 y una cadena ligera variable que tiene la secuencia como se expone en la SEQ ID NO: 2.

VH: SEQ ID NO: 1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYYYMTWVRQAPGKGLEWVGFID
PDDDPYYATWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGGDHNSGWG
LDIWGQGTLVTVSS

VL: SEQ ID NO: 2

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLG

En otra realización preferida, el anticuerpo anti-VEGF es un fragmento de anticuerpo Fv (scFv) de cadena única que comprende la secuencia:

EIVMTQSPSTLSASVGDRVIITCQASEIIHSWLAWYQQKPGKAPKLLIYLASTLASG
VPSRFSGSGSGAEFTLTISSLQPDDFATYYCQNVYLASTNGANFGQGTKLTVLGG
GGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCTASGFSLTDYY
YMTWVRQAPGKGLEWVGFIDPDDDPYYATWAKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSL
RAEDTAVYYCAGGDHNSGWGLDIWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 3)

Un anticuerpo anti-VEGF en una composición farmacéutica acuosa de la invención se puede producir, por ejemplo, como se describe en el documento WO 2009/155724. Se puede producir un scFv usando un vector de expresión, como se describe en el mismo. Una metionina derivada del codón de inicio en un vector de expresión está presente en la proteína final en los casos en los que no ha sido escindida postranslacionalmente (ver SEQ ID NO: 4 en los Ejemplos).

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-VEGF en una composición farmacéutica acuosa de la invención comprende CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada como se establece en SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera Como se expone en las SEQ ID NO: 8, 9 y 10.

SEQ ID NO: 5 GFSLTDYYYMT

SEQ ID NO: 6 FIDPDDDPYYATWAKG

SEQ ID NO: 7 GDHNSGWGLDI

SEQ ID NO: 8 QASEIIHSWLA

SEQ ID NO: 9 LASTLAS

SEQ ID NO: 10 QNVYLASTNGAN

En una realización, la concentración de un anticuerpo anti-VEGF en la composición farmacéutica acuosa de la invención es de al menos 50 mg / ml.

Preferiblemente, la composición farmacéutica acuosa de la invención comprende aproximadamente 50 mg / ml, aproximadamente 60 mg / ml, aproximadamente 70 mg / ml, aproximadamente 80 mg / ml, aproximadamente 90 mg / ml, aproximadamente 100 mg / ml, aproximadamente 110 mg / Aproximadamente 120 mg / ml, aproximadamente 140 mg / ml, aproximadamente 150 mg / ml, aproximadamente 160 mg / ml, aproximadamente 170 mg / ml, aproximadamente 180 mg / ml, aproximadamente 190 mg / ml, Aproximadamente 200 mg / ml, aproximadamente 210 mg / ml, aproximadamente 220 mg / ml, aproximadamente 230 mg / ml, aproximadamente 240 mg / ml, aproximadamente 250 mg / ml o aproximadamente 300 mg / ml de un anticuerpo anti-VEGF.

En ciertas realizaciones, la composición farmacéutica acuosa de la invención comprende entre 60 mg / ml y 120 mg / ml de un anticuerpo anti-VEGF, por ejemplo, un anticuerpo que comprende SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

En una realización, la composición farmacéutica acuosa de la invención comprende 60 mg / ml de un anticuerpo anti-VEGF que comprende SEQ ID NO: 3.

En otra realización, la composición farmacéutica acuosa de la invención comprende 120 mg / ml de un anticuerpo anti-VEGF que comprende SEQ ID NO: 3.

Las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención incluyen, además del anticuerpo anti-VEGF, otros componentes tales como uno o más de los siguientes: (i) un estabilizante; (ii) un agente tampón; (iii) un tensoactivo; Y (iv) un aminoácido libre. La inclusión de cada uno de dichos componentes adicionales puede dar composiciones con baja agregación del anticuerpo anti-VEGF. Preferiblemente, las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención incluyen, además del anticuerpo anti-VEGF: (i) un estabilizante; (Ii) un agente tampón; Y (iii) un tensoactivo.

Un estabilizante adecuado para uso con la invención puede actuar, por ejemplo, como agentes potenciadores de la viscosidad, agentes de carga, agentes solubilizantes y / o similares. El estabilizante puede ser iónico o no iónico (por ejemplo, azúcares). Como azúcares incluyen, pero no se limitan a, monosacáridos, por ejemplo, fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa y similares; Disacáridos, p. Lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; Polisacáridos, p. Rafinosa, melezitosa, maltodextrinas, dextranos, almidones y similares; Y alditoles, tales como manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol) y similares. Por ejemplo, el azúcar puede ser sacarosa, trehalosa, rafinosa, maltosa, sorbitol o manitol. El azúcar puede ser un alcohol de azúcar o un amino azúcar. Se prefieren sacarosa y trehalosa. La más preferida es la sacarosa. Como estabilizante iónico pueden incluir sales tales como NaCl o componentes de aminoácidos tales como arginina-HCl.

Agentes tampón adecuados para uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos orgánicos tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido glucónico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina o tampón fosfato. Además, también se pueden usar componentes de aminoácidos como agente tampón. El citrato o el tampón de histidina son particularmente útiles, incluyendo 10-20 mM de tampón de histidina, por ejemplo, histidina 0,13% a 0,26% (p / v) y clorhidrato monohidratado de histidina 0,03% - 0,07% (p/ v) Tampón citrato 20 mM, por ejemplo 0,006% a 0,012% de ácido cítrico (p / v) y 0,2% a 0,6% de citrato trisódico dihidrato (p / v). El ácido cítrico usado en una formulación de la invención puede ser cualquier forma de hidratación, por ejemplo anhidro o monohidrato.

Las composiciones farmacéuticas acuosas incluyen dicho agente tampón o agente de ajuste del pH para proporcionar un control del pH mejorado. En cierta realización, una composición farmacéutica acuosa de la invención tiene un pH entre 5,0 y 8,0, entre 5,0 y 7,0, entre 6,0 y 8,0, o entre 6,0 y 7,0. En una realización, el pH de una composición farmacéutica acuosa de la invención es de

aproximadamente 6,3 a aproximadamente 7,3. En una realización específica, una composición farmacéutica acuosa de la invención tiene un pH de aproximadamente 6,8.

Como se usa aquí, el término "tensoactivo" en la presente memoria se refiere a sustancias orgánicas que tienen estructuras anfipáticas; Es decir, están compuestos por grupos de tendencias de solubilidad opuestas, típicamente una cadena hidrocarbonada soluble en aceite y un grupo iónico soluble en agua. Los tensoactivos se pueden clasificar, dependiendo de la carga del resto tensoactivo, en agentes aniónicos, catiónicos y dispersantes para diversas composiciones farmacéuticas y preparaciones de materiales biológicos.

Los tensoactivos adecuados para uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, tensoactivos no iónicos, tensoactivos iónicos y tensoactivos zwitteriónicos. Los tensoactivos típicos para uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, ésteres de ácidos grasos de sorbitán (por ejemplo, sorbitan monocaprilato, monolaurato de sorbitán, monopalmitato de sorbitán), trioleato de sorbitán, ésteres de ácidos grasos de glicerina (por ejemplo, glicerina monocaprilato, glicerina monomiristato, monoestearato de glicerina), ésteres de ácidos grasos de poliglicerina (por ejemplo monoestearato de decaglicerilo, decaglicerilo diestearato de decaglicerilo, monolinoleato), ésteres de ácidos grasos de sorbitán de polioxietileno (por ejemplo monolaurato de polioxietilensorbitán, monooleato de polioxietilensorbitán, monoestearato de polioxietilensorbitán, monopalmitato de polioxietileno sorbitán, trioleato de polioxietileno sorbitán, polioxietileno triestearato de sorbitán), sorbitol de polioxietileno ésteres de ácidos grasos (por ejemplo, polioxietileno sorbitol tetraestearato, polioxietileno sorbitol tetraoleato), ésteres de ácidos grasos de glicerina de polioxietileno (por ejemplo, polioxietileno monoestearato de glicerilo), ésteres de ácidos grasos de polietilenglicol (por ejemplo, polietileno glicol disteara Te), éteres alquílicos de polioxietileno (p. polioxietileno lauril éter), éteres alquílicos de polioxietileno polioxipropileno (por ejemplo, polioxietileno polioxipropileno glicol, éter de polioxietileno polioxipropileno

propilo, polioxietileno polioxipropileno cetil éter), éteres de alquilfenilo de polioxietileno (por ejemplo, polioxietilen nonilfenil éter), polioxietilen hidrogenado aceites de ricino (aceite de ricino por ejemplo polioxietileno aceite de ricino, hidrogenado de polioxietileno), derivados de polioxietileno de cera de abejas (por ejemplo, polioxietileno sorbitol cera de abejas), derivados de lanolina de polioxietileno (por ejemplo, polioxietilen lanolina), y amidas de ácidos grasos de polioxietileno (por ejemplo, polioxietileno amida de ácido esteárico); sulfatos de alquilo C10-C18 (por ejemplo, cetil sulfato de sodio, lauril sulfato de sodio, sulfato de oleil sodio), polioxietileno C10-C18 sulfato de éter de alquilo con un promedio de 2 a 4 moles de unidades de óxido de etileno añadido (por ejemplo, sodio polioxietileno lauril sulfato), y Sales de éster alquilsulfosuccinato C_1-C_{18} (por ejemplo, éster laurilsulfosuccinato de sodio); Y tensoactivos naturales tales como lecitina, glicerofosfolípido, esfingofosfolípidos (por ejemplo, esfingomielina) y ésteres de sacarosa de ácidos grasos C_{12-18}. Una composición puede incluir uno o más de estos tensoactivos. Los tensoactivos preferidos son ésteres de ácidos grasos de polioxietilen sorbitán, p. Polisorbato 20, 40, 60 ó 80. El polisorbato 80 es particularmente preferido.

Los aminoácidos libres adecuados para uso con la invención incluyen, pero no se limitan a, arginina, lisina, histidina, ornitina, isoleucina, leucina, alanina, ácido glicina glutámico o ácido aspártico. Se prefiere la inclusión de un aminoácido básico, es decir arginina, lisina y / o histidina. Si una composición incluye histidina, entonces esto puede actuar tanto como un agente tampón como un aminoácido libre, pero cuando se usa un tampón de histidina es típico incluir un aminoácido libre de histidina, p. Para incluir tampón de histidina y lisina. Un aminoácido puede estar presente en su forma D y / o L, pero la forma L es típica. El aminoácido puede estar presente como cualquier sal adecuada, p. Una sal hidrocloruro, tal como arginina-HCl. En una realización preferida, una composición farmacéutica acuosa de la invención no comprende ninguno de tales aminoácidos libres.

En una realización preferida, un azúcar está presente en la composición farmacéutica acuosa de la invención, p. Después de la reconstitución de un liofilizado en agua, a una concentración de entre 3 y 11% (p / v). En ciertas realizaciones, el azúcar es sacarosa a una concentración de aproximadamente 4,5% a aproximadamente 11%, o trehalosa a una concentración de aproximadamente 5% a aproximadamente 10%. Se prefiere una concentración de sacarosa al 6,75% (p / v).

En una realización preferida, un agente tamponante está presente en la composición farmacéutica acuosa de la invención, p. Después de la reconstitución de un liofilizado en agua, a una concentración de entre 1 y 60 mM p. 10 - 40 mM, 15 - 30 mM, 15 - 25 mM. En ciertas realizaciones, el agente tampón es citrato o histidina. Se prefiere una concentración de tampón citrato 15 mM.

En una realización preferida, un tensoactivo está presente en la composición farmacéutica acuosa de la invención, p. Después de la reconstitución de un liofilizado en agua, a una concentración de hasta 0,2% (en volumen) p. 0,01-0,1%, 0,03-0,08%, 0,04-0,08%. Se prefiere una concentración de 0,05% de polisorbato 80.

Otros excipientes contemplados que pueden utilizarse en las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención incluyen, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes antiestáticos, lípidos tales como fosfolípidos o ácidos grasos, esteroides tales como colesterol, excipientes de proteínas tales como albúmina de suero Albúmina sérica), albúmina humana recombinante, gelatina, caseína, contraiones formadores de sales tales como sodio y similares. Estos y otros excipientes y / o aditivos farmacéuticos conocidos adecuados para uso en las formulaciones de la invención son conocidos en la técnica, por ejemplo, como se enumeran en "The Handbook of Pharmaceutical Excipients, 4th edition, Rowe y col., Eds., American Pharmaceuticals Association

(2003) y Remington: la ciencia y la práctica de la farmacia, 21ª edición, Gennaro, Ed., Lippincott Williams & Wilkins (2005).

Las formulaciones preferidas de la invención se muestran en la Tabla 40 en los Ejemplos siguientes.

En ciertas realizaciones, se contempla la liofilización de un anticuerpo anti-VEGF para proporcionar una composición farmacéutica acuosa de la invención para tratar a un paciente.

Las técnicas para la liofilización de anticuerpos son bien conocidas en la técnica, p. Véase John F. Carpenter y Michael J. Pikal, 1997 (Pharm. Res. 14, 969 - 975); Xialin (Charlie) Tang y Michael J. Pikal, 2004 (Pharm Res. 21, 191-200).

Antes de administrar un liofilizado a un paciente, éste debe reconstituirse con un reconstituyente acuoso. Esta etapa permite que los anticuerpos y otros componentes en el liofilizado se vuelvan a disolver para dar una solución que es adecuada para la inyección a un paciente.

El volumen de material acuoso utilizado para la reconstitución determina la concentración del anticuerpo en una composición farmacéutica resultante. La reconstitución con un volumen más pequeño de reconstituyente que el volumen de pre-liofilización proporciona una composición que está más concentrada que antes de la liofilización. El factor de reconstitución (volumen de la formulación después de la liofilización: volumen de la formulación antes de la liofilización) puede ser de 1: 0,5 a 1: 6. Es útil un factor de reconstitución de 1: 3. Como se ha mencionado anteriormente, los liofilizados de la invención pueden reconstituirse para dar composiciones acuosas con una concentración de anticuerpo anti-VEGF de al menos 50 mg / ml (es decir, al menos 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120 o 130 Mg / ml), y el volumen de reconstituyente se seleccionará en consecuencia. Si es necesario, la formulación reconstituida se puede diluir antes de la administración a un paciente según sea apropiado para administrar la dosis prevista.

Los reconstituyentes típicos para anticuerpos liofilizados incluyen agua estéril o tampón, que contiene opcionalmente un conservante. Si el liofilizado incluye un agente tampón, entonces el reconstituyente puede incluir un agente tampón adicional (que puede ser igual o diferente del agente tampón del liofilizado) o puede incluir en su lugar ningún agente tampón (por ejemplo, WFI (agua para inyección) o solución salina fisiológica).

Las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención que comprenden anticuerpos anti-VEGF pueden usarse para tratar una variedad de enfermedades o trastornos. Las composiciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos anti-VEGF son particularmente útiles para tratar enfermedades oculares neovasculares en un sujeto.

Una "enfermedad ocular neovascular" que se puede tratar usando una composición farmacéutica acuosa de la invención incluye, una afección, enfermedad o trastorno asociado con neovascularización ocular, incluyendo, pero sin limitarse a, angiogénesis anormal, neovascularización coroidea (CNV), vascular retiniana Permeabilidad, edema retiniano, retinopatía diabética (particularmente retinopatía diabética proliferativa), edema macular diabético, degeneración macular relacionada con la edad (AMD) neovascular (exudativa), incluyendo CNV asociada con nAMD (AMD neovascular), secuela asociada con isquemia retiniana, Oclusión (CRVO), y neovascularización del segmento posterior.

Las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención pueden incluir ingredientes activos adicionales además del anticuerpo anti-VEGF. Otros agentes farmacológicos pueden incluir, por ejemplo, otros anticuerpos útiles para tratar enfermedades oculares.

Las composiciones farmacéuticas acuosas de la invención se pueden administrar a un paciente. Tal como se usa en la presente memoria, el término sujeto o paciente se refiere a mamíferos humanos y no humanos, incluyendo pero no

limitados a primates, conejos, cerdos, caballos, perros, gatos, ovejas y vacas. Preferiblemente, un sujeto o paciente es un ser humano.

La administración será típicamente a través de una jeringa. De este modo, la invención proporciona un dispositivo de administración (por ejemplo, una jeringa) que incluye una composición farmacéutica de la invención (por ejemplo, jeringa precargada). Los pacientes recibirán una cantidad eficaz del anticuerpo anti-VEGF como principal ingrediente activo (es decir, una cantidad que es suficiente para conseguir o al menos parcialmente lograr el efecto deseado). Una dosis terapéuticamente eficaz es suficiente si puede producir incluso un cambio incremental en los síntomas o afecciones asociadas con la enfermedad. La dosis terapéuticamente eficaz no tiene que curar completamente la enfermedad o eliminar completamente los síntomas. Preferiblemente, la dosis terapéuticamente eficaz puede detener al menos parcialmente la enfermedad y sus complicaciones en un paciente que ya padece la enfermedad. Las cantidades eficaces para este uso dependerán de la gravedad del trastorno que se esté tratando y del estado general del propio sistema inmune del paciente.

La cantidad de dosis se puede determinar fácilmente usando técnicas de ajuste de dosis conocidas por un médico que tenga habilidades ordinarias en el tratamiento de la enfermedad o condición. La cantidad terapéuticamente eficaz de un anticuerpo anti-VEGF utilizado en una composición farmacéutica acuosa de la invención se determina teniendo en cuenta los volúmenes de dosis deseados y el modo o modos de administración, por ejemplo. Típicamente, las composiciones terapéuticamente eficaces se administran en una dosis que varía de 0,001 mg / ml a aproximadamente 200 mg / ml por dosis. Preferiblemente, una dosificación utilizada en un método de la invención es de aproximadamente 60 mg / ml a aproximadamente 120 mg / ml (es decir, aproximadamente 60, 70, 80, 90, 100, 110 o 120 mg / ml). En una realización preferida, la dosificación de un anticuerpo anti-VEGF utilizado en un método de la invención es 60 mg / ml o 120 mg / ml.

En ciertas realizaciones, se administra una dosis directamente a un ojo de un paciente. En una realización, una dosis por ojo es de al menos aproximadamente 0,5 mg hasta aproximadamente 6 mg. Las dosis preferidas por ojo incluyen aproximadamente 0,5 mg, 0,6 mg, 0,7 mg, 0,8 mg, 0,9 mg, 1,0 mg, 1,2 mg, 1,4 mg, 1,6 mg, 1,8 mg, 2,0 mg, 2,5 mg, 3,0 mg, 3,5 mg, 4,0 mg , 4,5 mg, 5,0 mg, 5,5 mg y 6,0 mg. Las dosis se pueden administrar en varios volúmenes adecuados para administración oftálmica, tales como 50 µl o 100 µl, por ejemplo, incluyendo 3 mg / 50 µl o 6 mg / 50 µl. También se pueden usar volúmenes más pequeños, incluyendo 10 µl o menos, por ejemplo aproximadamente 10 µl o aproximadamente 8 µl. En ciertas realizaciones, se administra una dosis de 1,2 mg / 10 µl o 1 mg / 8,0 µl (por ejemplo, 1 mg / 8,3 µl) a un ojo de un paciente para tratar o mejorar una o más de las enfermedades y trastornos descritos anteriormente. La administración puede ser, por ejemplo, por inyección o infusión intravítrea.

La invención también proporciona formulaciones (es decir, composiciones farmacéuticas acuosas) de la invención para su uso como medicamentos, p. Para uso en la administración de un anticuerpo a un paciente, o para su uso en el tratamiento o mejora de una o más de las enfermedades y trastornos descritos anteriormente.

La invención proporciona además un método para suministrar un anticuerpo anti-VEGF a un paciente, que comprende una etapa de administrar al paciente una composición farmacéutica acuosa de la invención.

En ciertas realizaciones, un método para suministrar un anticuerpo anti-VEGF a una invención paciente comprende las etapas de: (i) reconstituir un liofilizado de la invención para dar una formulación acuosa, y (ii) administrar la formulación acuosa al paciente. La etapa (ii) tiene lugar idealmente dentro de las 24 horas de la etapa (i) (por ejemplo, dentro de 12 horas, dentro de las 6 horas, dentro de las 3 horas, o dentro de 1 hora).

Ciertas realizaciones específicas de la invención se describen como numeradas a continuación:

1. Una composición farmacéutica acuosa que comprende (i) al menos 50 mg / ml de un anticuerpo anti-VEGF que incluye CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y CDR1 de cadena ligera, CDR2 y CDR3 de SEQ ID NO: 8, 9 y 10 respectivamente, (ii) sacarosa o trehalosa, (iii) un tampón de citrato o histidina, y (iv) polisorbato 80 como tensoactivo.

2. La composición farmacéutica acuosa de la Realización 1, que comprende de 4,5 a 11% (p / v) de sacarosa o de 5 a 10% de trehalosa, de 0,006% a 0,012% de ácido cítrico (p / v), de 0,2% a 0,6% de citrato trisódico Dihidrato (p / v), y 0,01% a 0,1% de polisorbato 80 (p / v), en el que el pH de la composición es de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 7,3.

3. La composición farmacéutica acuosa de la Realización 2, en la que la concentración de sacarosa es 6,75% (p/v), la concentración de ácido cítrico es de aproximadamente 0,01% (p/v), la concentración de citrato trisódico dihidratado es de aproximadamente 0,428% (p/v), la concentración de polisorbato 80 es de aproximadamente 0,05% (p /v), y el pH es de aproximadamente 6,8.

4. La composición farmacéutica acuosa de cualquiera de las Realizaciones 1-3, en la que la concentración del anticuerpo anti-VEGF es al menos 60 mg / ml, al menos 70 mg / ml, al menos 80 mg / ml, al menos 90 mg / Ml, al menos 100 mg / ml, al menos 110 mg / ml, al menos 120 mg / ml, al menos 130 mg / ml, al menos 140 mg / ml o al menos 150 mg / ml.

5. La composición farmacéutica acuosa de cualquiera de las realizaciones 1-4, en la que la concentración del anticuerpo anti-VEGF es de aproximadamente 60 mg / ml, aproximadamente 70 mg / ml, aproximadamente 80 mg / ml, aproximadamente 90 mg / ml, aproximadamente 100 mg / ml, aproximadamente 110 mg / ml,

aproximadamente 120 mg / ml, aproximadamente 130 mg / ml, aproximadamente 140 mg / ml, o aproximadamente 150 mg / ml.

6. La composición farmacéutica acuosa de cualquiera de las Realizaciones 1 - 5, en la que el anticuerpo anti - VEGF comprende las secuencias de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

7. La composición farmacéutica acuosa de cualquiera de las Realizaciones 1 - 6, en la que el anticuerpo anti - VEGF comprende la secuencia de la SEQ ID NO: 3.

8. La composición farmacéutica acuosa de cualquiera de las Realizaciones 1-7, en la que la concentración del anticuerpo anti-VEGF es de aproximadamente 60 mg / ml o aproximadamente 120 mg / ml.

9. Un dispositivo de administración que incluye la composición farmacéutica acuosa de cualquiera de las Realizaciones 1-8.

10. El dispositivo de suministro de la Realización 9, que es una jeringa precargada.

11. Un método para administrar un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto, que comprende una etapa de administrar al sujeto una composición farmacéutica acuosa de cualquiera de las Realizaciones 1-8.

12. Un método para tratar una enfermedad o trastorno ocular que está mediado por VEGF, que comprende administrar a un sujeto, una composición farmacéutica acuosa de cualquiera de las Realizaciones 1-8.

13. El método de la realización 12, en el que dicha enfermedad o trastorno ocular es una enfermedad neovascular ocular.

14. Una formulación liofilizada preparada liofilizando la composición farmacéutica acuosa de cualquiera de las Realizaciones 1-8.

15. Un método para preparar un liofilizado, que comprende las etapas de: (i) preparar una solución acuosa de un anticuerpo anti-VEGF, sacarosa o trehalosa, citrato o tampón de histidina, y un tensoactivo; Y (ii) liofilizar la solución acuosa.

16. El método de la realización 15, en el que el anticuerpo anti-VEGF incluye CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada de SEQ ID NO: 5, 6 y 7, respectivamente, y CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera de SEQ ID NO: 8, 9 y 10 respectivamente.

17. El método de la realización 16, en el que el anticuerpo anti-VEGF comprende las secuencias de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2.

18. El método de cualquiera de las realizaciones 16-17, en el que el anticuerpo anti-VEGF comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3.

19. Una composición farmacéutica acuosa de cualquiera de las Realizaciones 1-8 para uso en la administración de un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto, que comprende una etapa de administrar la composición farmacéutica acuosa al sujeto.

20. Una composición farmacéutica acuosa de cualquiera de las Realizaciones 1-8 para uso en el tratamiento de una enfermedad o trastorno ocular mediada por VEGF, que comprende administrar la composición farmacéutica acuosa a un sujeto.

21. El uso de la Realización 20, en el que dicha enfermedad o trastorno ocular que es una enfermedad neovascular ocular.

Como se usa en la presente memoria, todos los porcentajes son porcentajes en peso, a menos que se indique lo contrario.

Tal como se usa aquí y a menos que se indique otra cosa, los términos "a" y "an" se toman para significar "uno", "al menos uno" o "uno o más". A menos que lo

exija el contexto, los términos singulares utilizados aquí incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán lo singular.

Los contenidos de cualesquiera patentes, solicitudes de patentes y referencias citadas a lo largo de esta memoria descriptiva se incorporan aquí por referencia en su totalidad.

Otras realizaciones de la presente invención serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la consideración de la presente descripción y práctica de la presente invención descrita en la presente memoria. Se pretende que la presente memoria descriptiva y ejemplos se consideren ejemplares solamente con un verdadero alcance y espíritu de la invención indicados por las siguientes reivindicaciones y equivalentes de la misma.

EJEMPLOS

Los siguientes ejemplos describen esfuerzos de desarrollo de formulación diseñados para identificar enfoques y composiciones de estabilización adecuados para proporcionar soluciones estables y altamente concentradas que comprenden el anticuerpo 1008, permitiendo una formulación IVT con al menos una vida útil de 18 meses en condiciones de almacenamiento refrigerado que cumpla con los requisitos reglamentarios Para productos oftálmicos.

El anticuerpo 1008 es un anticuerpo de cadena sencilla que se une e inhibe la actividad biológica del factor de crecimiento endotelial vascular humano A (VEGF-A). La secuencia de aminoácidos del 1008 expresado es:

```
MEIVMTQSPS TLSASVGDRV IITCQASEII HSWLAWYQQK PGKAPKLLIY LASTLASGVP
SRFSGSGSGA EFTLTISSLQ PDDFATYYCQ NVYLASTNGA NFGQGTKLTV LGGGGGSGGG
GSGGGGSGGG GSEVQLVESG GGLVQPGGSL RLSCTASGFS LTDYYYMTWV RQAPGKGLEW
VGFIDPDDDP YYATWAKGRF TISRDNSKNT LYLQMNSLRA EDTAVYYCAG GDHNSGWGLD
IWGQGTLVTV SS  (SEQ ID NO: 4)
```

Se observaron cantidades significativas de partículas sub-visibles a una concentración de 60 mg / ml 1008 cuando 1008 se formuló como una solución isotónica en tampón citrato 15 mM con polisorbato 20 al 0,001% a pH 6,25. El principal problema con esta formulación inicial fue que la materia particulada excedió los límites regulatorios para soluciones oftálmicas para inyección (USP <789>), incluso cuando se almacenó a -20 °C.

Los siguientes ejemplos resumen el desarrollo de la formulación de soluciones 1008 intravítreas (IVT) de 60 y 120 mg / ml estables a 2-8ºC durante al menos 18 meses. El esfuerzo de desarrollo de la formulación se centró en la inhibición de la formación de partículas sub-visibles y cumplir con los requisitos de la USP para el contenido, la pureza y la potencia.

MÉTODOS ANALÍTICOS

Se usaron los siguientes métodos a lo largo de los Ejemplos como se indica.

Método de Imágenes de Micro-Flujo (MFI)

El método MFI utilizado para el análisis de excreción de excipientes, Estudio 1 y Estudio 2 para estudios de optimización de 60 mg / ml fue el siguiente:

Volumen de muestra total utilizado: 0,50 mL

Volumen de purga: 0.20 mL

Volumen de análisis: 0,26 ml

El paso de iluminación optimizado se realizó con agua libre de partículas filtradas purificada.

Método MFI utilizado para el análisis de 120 mg / ml 1008 Estudio 3 y Estudio 4:

Volumen de muestra total utilizado: 0.80 ml

Volumen de purga: 0,23 ml

Volumen de análisis: 0,48 ml

El paso de iluminación optimizado se realizó con agua libre de partículas filtradas purificada.

Método SEC

La SE-HPLC (cromatografía de exclusión de tamaño) separa las proteínas según su tamaño. La separación se logró mediante la exclusión diferencial, o inclusión, de las moléculas de muestra a medida que pasaban a través de la fase estacionaria de partículas porosas. Sistema de cromatografía líquida de alto rendimiento capaz de mantener un caudal de 0,25 ml / minuto y una temperatura de muestra de 4 °C, equipado con una columna TOSOH SuperSW3000 (Tosoh Bioscience LLC, King of Prussia, PA) y un detector capaz de funcionar a 214 nm y 280 nm simultáneamente. Este método fue utilizado para pruebas de pureza.

Método IEX-HPLC

AIEX-HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio de aniones) separa las proteínas de acuerdo con su carga neta. Este procedimiento se realizó mediante cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC), capaz de mantener un

caudal de 0,8 ml / minuto, con un compartimiento de columna controlado por temperatura (fijado a 25 ° C) que contenía una columna de intercambio aniónico fuerte, un auto-muestreador (Ajustado a 4 ° C), y un detector UV de longitud de onda variable, capaz de funcionar a 280 nm.

Método CGE

El método de electroforesis en gel capilar se realizó para la determinación de la identidad y pureza de proteínas entre los pesos moleculares de 10 kDa y 225 kDa mediante electroforesis capilar de SDS. El capilar se llenó dinámicamente con un tampón de gel de SDS Beckman Coulter 0,2%, pH 8, formulación patentada. La separación de la proteína se realizó mediante electroforesis de tamizado molecular. El logaritmo del peso molecular de la proteína fue lineal con su movilidad electroforética recíproca. La identidad de una proteína se determinó comparando su migración con un patrón de peso molecular. La pureza se determinó mediante el análisis del porcentaje de área del pico principal y de las impurezas. Se utilizó un detector de matrices de fotodiodos (PDA) para analizar la muestra a 220 nm.

Análisis de potencia

El ELISA de competencia se utilizó para la prueba de potencia. La prueba de ELISA competitiva, midió la capacidad de 1008 para competir con VEGFR2 / Fc por VEGF biotinilado. La señal observada estaba inversamente relacionada con la concentración de 1008, ya que cantidades crecientes de 1008 bloquearon efectivamente la unión de VEGF biotinilado con su receptor VEGFR2 / Fc. Cada muestra se analizó en una placa de microvaloración de 96 pocillos contra un patrón de referencia 1008, y se informó la potencia relativa de la muestra con respecto a la del patrón de referencia.

Ejemplo 1

<u>Detección de Excipiente</u>

1008 se formuló en un tampón citrato a pH 6,25. La composición de formulación se muestra en la Tabla 1.}

Tabla 1

Componente	**Concentración (**W/V %)
1008	6%
Citrato trisódico (Dihidrato)	0.59%
Coruro de sodio	0.73%
Polisorbato 20	0.001%
Ácido clorhidrico	pH 6.25
Agua para Inyección	Qs 100

Se observaron números significativos de partículas sub-visibles en la formulación anterior. La materia particulada excedió los límites regulatorios para soluciones oftálmicas para inyección USP <789> incluso en el almacenamiento de -20 °C.

Se investigó el efecto de varios excipientes en la formación de partículas sub-visibles para desarrollar una solución líquida más estable de 1008. Las soluciones de proteína a 60 mg / ml que contenían excipientes diferentes se almacenaron a 40ºC y se analizaron para detectar partículas en el tamaño de 1 - 100 µm por MFI. Los datos experimentales demostraron que la mayoría de los excipientes probados, incluyendo arginina, dextrano, ácido ascórbico, metionina y acetato de amonio, no redujeron la formación de las partículas. Sólo en presencia de azúcares no reductores, tales como sacarosa y trehalosa, se redujo significativamente la formación de partículas.

Se llevó a cabo otro cribado de excipientes. Se evaluó el efecto de los excipientes sobre la estabilidad 1008 en una solución de ~ 60 mg / ml 1008. Las soluciones de proteína que contenían albúmina de suero humano (HSA) al 0,1%, poloxámero 407 al 0,1%, Brij 35 al 0,1%, glicerina al 3%, glicina 50 mM se almacenaron a 40ºC

y las muestras se ensayaron mediante MFI, SEC e IEX después de 8, 21 y 28 días de almacenamiento. Los resultados se muestran en la Tabla 2. Los datos experimentales demostraron la inestabilidad de la proteína en presencia de los excipientes ensayados.

Tabla 2

Resultados de la selección de excipientes

Excipiente	0.1% HSA	0.1% Poloxamero 407	0.1% Brij 35	3% Glicerina	50 mM Glicina
tiiempo (día)	8				
≥ 10 um por MFI	19	8	18	329	47
≥ 25 um por MFI	5	5	6	43	8
≥ 50 um por MFI	1	0	1	3	0
Total por MFI	538	381	378	24805	2436
SEC (% inicial)	96.2	95.5	81.8	96.3	95.8
IEX (% inicial)	95.1	94.3	82.7	95.0	95.6
Tiempo (día)	21				
≥ 10 um por MFI	30	5	12	95	36
≥ 25 um por MFI	7	0	5	14	10
≥ 50 um por MFI	1	0	0	2	1
Total por MFI	495	197	1091	5622	1037
SEC (%inicial)	88.2	87.7	63.2	89.4	89.4
IEX (%inicial)	87.8	86.1	63.2	87.9	87.1

Tiempo (día)	28				
≥ 10 um por MFI	69	382	595	365	466
≥ 25 um por MFI	21	39	68	65	72
≥ 50 um por MFI	5	4	6	9	15
Total por MFI	505	7718	2208	10690	52375
SEC (%inicial)	85.7	84.7	65.3	86.1	84.5
IEX (%inicial)	82.7	80.9	60.0	83.4	82.3

La estabilidad de 57 mg / ml 1008 se investigó en 20 mM en tampón de fosfato a pH 6,25. La formulación que contenía sacarosa al 9% y PS80 al 0,1% se ensayó a los 6, 14 y 27 días después del almacenamiento a 40ºC. Los resultados se enumeran en la Tabla 3.

Tabla 3

Estabilidad de 1008 57 mg / ml en tampón de fosfato 20 mM

Tiemppo a 40°C (día)	6	14	27
≥ 10 um por MFI (#/mL)	43	42	11
≥ 25 um por MFI (#/mL)	3	13	3
≥ 50 um por MFI	1	4	0

(#/mL)			
Total por MFI (#/mL)	1418	1650	425
SEC (% inicial)	97.3	91.9	82.1
IEX (% inicial)	98.3	92.2	79.2

Ejemplo 2

Desarrollo de nueva formulación

Estudio 1

Detección de Excipiente

Se utilizó una solución de proteína de 60 mg / ml de 1008 en tampón de citrato 20 mM que contenía 0,001% de polisorbato 20 y NaCl 0,73% a pH 6,25 para la preparación de la muestra. Con el fin de eliminar el tensoactivo en la solución de proteína original, se realizó primero el intercambio de tampón usando la columna NAP-25 utilizando el vehículo sin polisorbato 20. La solución de proteína intercambiada se concentró entonces hasta aproximadamente 60 mg / ml utilizando un filtro Vivaspin con MWCO de 10kDa. Los excipientes de HSA, glicina, glicerina, poloxámero 407 y Brij 35 se punzaron individualmente. Las muestras preparadas se filtraron a continuación mediante una jeringa a través de una membrana de PVDF de 0,2 µm a un vial de vidrio transparente de 4 ml. Se usaron aproximadamente 100 ul de muestra para el ensayo inicial, mientras que el resto de las muestras se almacenaron a 40ºC. Se extrajo una muestra de mililitro de cada formulación a los 8, 21 y 28 días después del almacenamiento a 40ºC para análisis por MFI, SEC y IEX.

Selección de componentes de tampón, azúcar y tensoactivo

Sobre la base de exámenes de excipientes realizados internamente, se seleccionaron dos tampones (citrato e histidina), azúcares (sacarosa y trehalosa) y tensoactivos (polisorbato 20 y polisorbato 80) para la selección del componente de formulación. Para el estudio se seleccionaron una concentración de tampón de 20 mM, una concentración de azúcar de 264 mM y una concentración de tensoactivo de 0,1%. Se diseñó un estudio experimental factorial completo como se muestra en la tabla siguiente.

Cuadro 4

Factores y Diseño para el Estudio 1

Factor	Diseño
Buffer	20 mM Citrato o Histidina 20 mM
Azúcar	Sacarosa 264 mM (9%) o Trehalosa 264 mM (9%)
Surfactante	Polisorbato 20 0.1% o Polisorbate 800.1%

El diseño completo utilizado se muestra en la Tabla 5 a continuación:

Tabla 5

Diseño Fatorial Completo de Tres Factores para el Estudio 1

No	Buffer (mM)	Sugar	Surfactant
1	20 mM Citrato	264 mM Trehalosa	0.1% PS 20
2	20 mM Citrato	264 mM Trehalosa	0.1% PS 80
3	20 mM Citrato	264 mM Sacarosa	0.1% PS 20
4	20 mM Citrato	264 mM Sacarosa	0.1% PS 80
5	20 mM Histidina	264 mM Trehalosa	0.1% PS 20
6	20 mM Histidina	264 mM Trehalosa	0.1% PS 80
7	20 mM Histidina	264 mM Sacarosa	0.1% PS 20

8	20 mM Histidina	264 mM Sacarosa	0.1% PS 80

Otros parámetros:

Concentración / pH	50 - 60 mg / ml 1008 a pH 6,25
Buffer de intercambio	columna NAP25, concentrada con Vivaspin 10kDa MWCO
Tamaño de la muestra / Pkg	2-2,5 ml en un vial de vidrio transparente de 4 ml con tapa roscada
Almacenamiento / duración	40 °C / 0, 1, 2 y 4 semanas
Ensayos	MFI, SEC e IEX

Se utilizó solución de proteína de 60 mg / ml 1008 en el tampón original que contenía 0,001% de polisorbato 20 para la preparación de la muestra. Se prepararon cuatro nuevos tampones de vehículo con diferentes combinaciones de tampón / azúcar (Citrato 20 mM / Trehalosa 264 mM, Citrato 20 mM / Sacarosa 264 mM, Histidina 20 mM / Trehalosa 264 mM, Histidina 20 mM / Sacarosa 264 mM). 1008 (DS) se intercambió primero en los tampones del vehículo usando la columna Illustra NAP-25 (GE Healthcare). La columna se equilibró con 25 ml de tampón citrato. A continuación, se cargaron 2 ml de 1008 DS en la columna. Después de que la solución de DS completada se movió dentro de la columna, la columna se lavó con 2 ml del mismo tampón usado para equilibrar la columna. La solución de 6 ml eluida de la columna se recogió en un concentrador Vivaspin 6 (MWCO 10KD, GE Healthcare). La solución eluida de 6 ml se concentró entonces hasta aproximadamente 2 ml usando una centrífuga Beckman GS-15R a 9384 xg y 4ºC. La concentración de proteína se midió entonces con un espectrofotómetro NanoDrop 1000 usando OD280. El polisorbato 20 (PS20) o Polisorbato 80 (PS80)

se introdujo en las formulaciones hasta una concentración final de 0,1%. Las formulaciones preparadas se filtraron entonces a través de un filtro de jeringa PVDF de 0,2 µm y se llenaron en un vial de vidrio transparente de 4 ml. Se usó una muestra de aproximadamente 100 \ mu l para el ensayo inicial, mientras que el resto de las muestras se almacenó a 40ºC. Se extrajo una muestra de mililitro después del almacenamiento de 1, 2 y 4 semanas a 40ºC para análisis por MFI, SEC y IEX.

El estudio cualitativo se realizó con el fin de seleccionar los componentes óptimos de azúcar / tensoactivo / tampón para la formulación. Se usaron dos tampones (citrato e histidina), azúcares (sacarosa y trehalosa), tensoactivos (polisorbato 20 y polisorbato 80) en el diseño del estudio, como se discutió anteriormente. Se realizó un estudio de estabilidad de cuatro semanas bajo condiciones aceleradas (40ºC). Las muestras de estabilidad fueron ensayadas por SEC, IEX e IMF. La Tabla 6 muestra los resultados de estabilidad por SEC, IEX y punto de fusión (Tm) por µDSC.

Tabla 6

Análisis cualitativo de los factores para 60 mg / ml 1008 a 40 ° C

No	1 semana /40°C (SEC)*	2-semana /40°C (SEC)	4-semana /40°C (SEC)	1 semana /40°C (IEX)*	2-semana /40°C (IEX)	4-semana /40°C (IEX)	Tm (°C) por µDSC
1	2.9	10.7	26.6	5.0	13.7	20.2	71.53
2	2.4	7.8	18.3	4.2	10.5	13.6	71.97
3	2.9	11.1	27.1	4.9	13.2	17.5	71.41
4	2.3	7.5	20.9	4.1	10.6	11.7	71.97
5	3.2	11.7	26.8	5.6	14.7	23.4	71.66
6	2.7	8.1	19.1	5.1	12.1	19.9	72.28

7	3.5	13.2	31.4	6.1	16.4	25.2	71.53
8	2.8	8.6	21.2	5.4	13.1	15.1	72.15

***% Pérdida usando el área relativa del pico**

Los resultados de estabilidad se analizaron usando Minitab (Minitab Inc., State College PA). Dado que SEC y IEX mostraron la misma tendencia, sólo los datos de SEC fueron analizados y reportados por Minitab. Los resultados de la SEC demostraron que el agente tensoactivo era el único factor significativo; Los otros factores que parecían afectar la respuesta incluyeron la selección del tampón y la interacción entre el tampón y el azúcar (en menor grado). Los datos de SEC sugirieron que el componente de formulación óptimo era citrato como tampón, polisorbato 80 como tensoactivo y sacarosa como azúcar.

También se analizaron los resultados experimentales en partículas por MFI por Minitab. Los tres factores evaluados (azúcar, surfactante y tampón) parecían ser insignificantes (a = 0,05). Comparando los principales efectos sobre las partículas, el citrato fue mejor que la histidina; PS80 era mejor que PS20; La sacarosa era similar o ligeramente mejor que la trehalosa. Por lo tanto, el citrato como tampón, el polisorbato 80 como tensoactivo y la sacarosa como azúcar se eligieron para estudios adicionales.

Estudio 2

Optimización de las concentraciones de tampón, azúcar y surfactante

Se realizó un estudio factorial completo con tres factores a dos niveles con dos puntos centrales en tampones de citrato e histidina, respectivamente, con el fin de determinar la concentración óptima para cada componente de formulación seleccionado. Los tres factores son el tampón (citrato o histidina), el polisorbato 80 y la sacarosa. Los factores y el espacio de diseño se tabulan en la Tabla 7 y los diseños experimentales detallados se muestran en las Tablas 8 y 9.

Tabla 7

Factores y Diseño Estudio 2

Factor	Design	
buffer Citrato	10 - 20 mM	NA
buffer Histidina	NA	10 -20 mM
Polisorbato 80	0.001 - 0.1%	0.001 - 0.1%
Sacarosa	4.5 - 9%	4.5 - 9%

Tabla 8

Diseño factorial completo en tampón de citrato

Orden de Corrida	**Buffer (mM)**	**Sacarosa (%)**	**Polisorbato 80 (%)**
C1	10	4.5	0.001
C2	20	4.5	0.001
C3	10	9	0.001
C4	20	9	0.001
C5	10	4.5	0.1
C6	20	4.5	0.1
C7	10	9	0.1
C8	20	9	0.1
C9	15	6.75	0.0505
C10	15	6.75	0.0505

Tabla 9

Diseño factorial completo en tampón de histidina

(3 factores a 2 niveles con 2 puntos centrales)

Orden de Corrida	**Buffer (mM)**	**Sacarosa (%)**	**Polyisorbato 80 (%)**
H1	10	4.5	0.001
H2	20	4.5	0.001
H3	10	9	0.001
H4	20	9	0.001
H5	10	4.5	0.1
H6	20	4.5	0.1
H7	10	9	0.1
H8	20	9	0.1
H9	15	6.75	0.0505
H10	15	6.75	0.0505

Para preparar una formulación individual, se utilizó una solución de proteína de 60 mg / ml 1008 en tampón citrato que contenía 0,001% de polisorbato 20 / NaCl 0,73% a pH 6,25. La solución de proteína se cambió primero de tampón a un vehículo usando la columna NAP-25. Este vehículo contenía tampón y sacarosa en sus concentraciones objetivo. La solución de proteína intercambiada se concentró hasta una concentración de aproximadamente 60 mg / ml utilizando Vivaspin 10 kDa MWCO.

Después se añadieron cantidades de lote de polisorbato 80 y cloruro de sodio para preparar las composiciones de formulación final. La concentración de proteína en cada muestra se verificó con el coeficiente de extinción teórico usando absorbancia medida por UV a 280 nm.

Las formulaciones preparadas se filtraron a continuación a través de un filtro de jeringa de PVDF de 0,2 µm a un vial de vidrio transparente limpio de 4 ml. Se

usaron aproximadamente 100 µl de muestra para el ensayo inicial mediante SEC y IEX, mientras que se almacenaron aproximadamente 2-2,5 ml de muestras a 40ºC. Se retiraron aproximadamente 600 µl de la muestra después de almacenamiento durante 11, 20 y 27 días a 40ºC para análisis por MFI, SEC y IEX.

Con base en los resultados del Estudio 1, se realizó un estudio factorial completo que contenía tres factores a dos niveles con dos puntos centrales en tampones de citrato e histidina respectivamente, con el fin de determinar la concentración óptima para cada componente de formulación seleccionado. Las muestras ensayadas se almacenaron a 40 ° C y se retiraron a 0, 1,6, 2,9 y 4 semanas para análisis de MFI, SEC y IEX. Los resultados se tabulan en las Tablas 10 y 11.

Tabla 10

Resultados de estabilidad para Soluciones con buffer de Citrato

Tiempo (sem)	**0**	**1.6**	**2.9**	**4**	**0**	**1.6**	**2.9**	**4**
Condición	**10 mM Citrato/4.5% Sacarosa/0.001% PS80)**				**20 mM Citrato/4.5% Sacarosa/0.001% PS80**			
1008 (mg/ml)	59.1				58.7			
Partículas ≥ 10 µm #/mL por MFI	-	61.1	91.7	36518	-	27	203	51209
Partículas ≥ 25 µm #/mL por MFI	-	7.64	15.29	6508	-	4	27	5071
Partículas ≥ 50 µm #/mL por MFI	-	0	0	325	-	0	4	61
Partículas Totales #/mL por	-	2881	7165	82439	-	627	26078	577345

MFI								
SEC (% Inicial)	99.2	93.4	89.6	85.8	99.3	93.8	90.1	86.4
IEX (% Inicial)	97.7	91.4	85.3	81.4	96.8	92.7	87.2	83.3
Condición	**10 mM Citrato/9% Sacarosa/0.001% PS80**				**20 mM Citrato/9% Sacarosa/0.001% PS80**			
1008 (mg/ml)	54.2				53.3			
Partículas ≥ 10 µm #/mL por MFI	-	38	57	84	-	19	42	126
Partículas ≥ 25 µm #/mL por MFI	-	4	0	8	-	8	0	11
Partículas ≥ 50 µm #/mL por MFI	-	0	0	0	-	0	0	0
Partículas Totales #/mL por MFI	-	791	1838	6993	-	841	1594	8472
SEC (% Inicial)	99.2	93.5	89.7	86.2	99.5	93.4	89.9	86.5
IEX (% Inicial)	97.5	91.1	85.3	81.4	97.4	91.8	86.3	82.6
Condición	**10 mM Citrato/4.5% Sacarosa/0.1% PS80**				**20 mM Citrato/4.5% Sacarosa/0.1% PS80**			
1008 (mg/ml)	58.7				58.7			
Partículas ≥ 10	-	76	27	31	-	34	149	187

µm #/mL por MFI								
Partículas ≥ 25 µm #/mL por MFI	-	0	4	8	-	11	31	31
Partículas ≥ 50 µm #/mL por MFI	-	0	0	0	-	4	0	0
Partículas Totales #/mL por MFI	-	1104	803	23839	-	860	1494	31451
SEC (% Inicial)	99.2	92.4	87.5	82.3	99.5	92.3	87.4	82.5
IEX (% Inicial)	97.5	90.2	83.1	78.0	97.5	90.6	84.0	78.8
Condición	**10 mM Citrato/9% Sacarosa/0.1% PS80**				**20 mM Citrato/9% Sacarosa/0.1% PS80**			
1008 (mg/ml)	54.7				52.5			
Partículas ≥ 10 µm #/mL por MFI	-	103	187	164	-	88	65	99
Partículas ≥ 25 µm #/mL por MFI	-	23	42	27	-	23	11	19
Partículas ≥ 50 µm #/mL por MFI	-	0	4	2	-	0	4	0
Total Partículas #/mL por MFI	-	2538	3642	4055	-	1062	1613	2117

SEC (% Inicial)	98.9	93.2	88.5	84.0	99.4	92.8	88.3	84.0
IEX (% Inicial)	97.2	90.9	83.8	79.1	97.1	91.3	84.3	79.7
Condición	**15 mM Citrato/6.75% Sacarosa/0.0505% PS80**				**15mM Citrato/6.75% Sacarosa/0.0505% PS80**			
1008 (mg/ml)	50.8				51.3			
Partículas ≥ 10 µm #/mL por MFI		42	54	42		31	15	
Partículas ≥ 25 µm #/mL por MFI		8	8	0		4	4	
Partículas ≥ 50 µm #/mL por MFI		0	4	0		0	0	
Total Partículas #/mL por MFI		439	1368	1536		1162	1727	
SEC (% Inicial)	99.1	93.6	88.8	84.7	99.4	92.9	88.3	84.1
IEX (% Inicial)	97.0	91.5	85.0	80.6	97.0	91.4	84.7	80.0

Tabla 11

Resultados de la estabilidad para soluciones de tampón con histidina

Tiempo (semana)	**0**	**1.6**	**2.9**	**4**	**0**	**1.6**	**2.9**	**4**
Condición	**10 mM Histidina/4.5% Sacarosa/0.001% PS80**				**20 mM Histidina /4.5% Sacarosa/0.001% PS80**			
1008 (mg/ml)	48.8				50.6			
Partículas ≥ 10 µm #/mL por MFI	-	26.75	152.86	596		30.57	95.54	4265
Partículas ≥ 25 µm #/mL por MFI	-	15.29	11.46	76.43		0	7.64	172
Partículas ≥ 50 µm #/mL por MFI	-	0	0	7.64		0	0	3.82
Total Partículas #/mL por MFI	-	634	2927	42083		592	14204	246370
SEC (% Inicial)	99.6	93.4	89.5	85.9	99.6	93.3	89.6	86.4
IEX (% Inicial)	96.7	91.9	86.2	82.5	96.9	91.9	86.2	82.4
Condición	**10 mM Histidina / 9% Sacarosa/0.001% PS80**				**20 mM Histidina /9% Sacarosa/0.001% PS80**			
1008 (mg/ml)	54.8				55.6			
Partículas ≥ 10 µm #/mL por MFI		19.11	64.97	202.54		15.29	103.18	149.04
Partículas ≥ 25		7.64	7.64	26.75		0	15.29	15.29

µm #/mL por MFI								
Partículas ≥ 50 µm #/mL por MFI		0	0	0		0	11.46	3.82
Total Partículas #/mL por MFI		684	2538	7505		806	3565	8102
SEC (% Inicial)	99.7	92.8	88.9	85.5	98.8	93.4	89.5	85.9
IEX (% Inicial)	97.0	90.78	84.8	81.1	97.1	90.6	84.4	80.3
Condición	**10 mM Histidina /4.5% Sacarosa/0.1% PS80**				**20 mM Histidina /4.5% Sacarosa/0.1% PS80**			
1008 (mg/ml)	48.8				49.8			
Partículas ≥ 10 µm #/mL por MFI	-	68.8	76.4	126		34	42	54
Partículas ≥ 25 µm #/mL por MFI	-	15.3	3.82	19.1		0	4	8
Partículas ≥ 50 µm #/mL por MFI	-	7.64	0	0		0	4	0
Total Partículas #/mL por MFI	-	753	2033	2782		1311	1704	1724
SEC (% Inicial)	99.7	92.7	87.6	83.9	99.7	92.7	88.0	83.8
IEX (% Inicial)	96.9	90.7	84.5	78.7	97.0	91.0	84.4	78.1
Condición	**10 mM Histidina /9%**				**20 mM Histidina /9%**			

	Sacarosa/0.1% PS80				**Sacarosa/0.1% PS80**			
1008 (mg/ml)	54.1				54.6			
Partículas ≥ 10 µm #/mL por MFI		22.93	42.04	68.79		64.97	72.61	80.25
Partículas ≥ 25 µm #/mL por MFI		3.82	3.82	0		0	7.64	3.82
Partículas ≥ 50 µm #/mL por MFI		0	0	0		0	0	3.82
Total Partículas #/mL por MFI		783	1330	6111		1716	2469	3844
SEC (% Inicial)	99.3	92.8	88.2	84.0	99.7	92.7	87.6	83.3
IEX (% Inicial)	97.0	90.5	83.4	78.7	96.8	90.9	83.3	78.3

Condición	**15 mM Histidina /6.75% Sacarosa/0.0505% PS80**				**15mM Histidina /6.75% Sacarosa/0.0505% PS80**			
1008 (mg/ml)	50.3				49.6			
Partículas ≥ 10 µm #/mL por MFI		19	46	172		31	80	114
Partículas ≥ 25 µm #/mL por MFI		0	0	19		7.6	15.3	22.9
Partículas ≥ 50 µm #/mL por MFI		0	0	0		0	7.6	3.8

Total Partículas #/mL por MFI		1005	1788	4242		760	1823	3053
SEC (% Inicial)	99.3	92.9	87.9	84.2	99.6	92.5	87.7	83.9
IEX (% Inicial)	97.1	90.9	84.3	79.6	96.9	91.0	84.6	79.8

Los datos experimentales se analizaron por Minitab. Para los resultados de la SEC en tampón de citrato, el surfactante fue el factor principal que influyó en la agregación de proteínas, mientras que la sacarosa, la interacción entre la sacarosa y el polisorbato 80, y la fuerza del tampón desempeñaron papeles menos significativos. Mayor concentración de sacarosa y menor concentración de polisorbato 80 favoreció la estabilidad de la proteína. La estabilidad de la proteína afectó ligeramente la agregación y una mayor fuerza del tampón de citrato promovió una ligera mejor estabilidad de la proteína.

Para los resultados de MFI en tampón citrato, los factores de sacarosa y polisorbato 80 así como la interacción de sacarosa y polisorbato 80 desempeñaron papeles igualmente significativos en la formación de partículas. La alta sacarosa y el polisorbato elevado 80 suprimieron significativamente la formación de partıculas, mientras que la resistencia del tampón en el intervalo de 10-20 mM afectó ligeramente a la formación de partıculas, se prefirió una resistencia de tampón menor.

Los resultados del análisis de Minitab de soluciones de tampón de histidina mostraron que el agente tensoactivo, el polisorbato 80, fue el factor principal que influyó en la agregación de proteínas, mientras que la interacción entre la resistencia del tampón y el polisorbato 80, así como la sacarosa, jugaron papeles menos significativos. Menos polisorbato 80 favoreció la estabilidad de la proteína. La concentración de tampón y la concentración de sacarosa no parecen afectar a la agregación de proteínas.

Para los resultados de MFI en tampón de histidina, el polisorbato 80, la sacarosa y la interacción de sacarosa y polisorbato 80 desempeñaron papeles significativos en la formación de partículas. Se prefirió una alta sacarosa y un bajo polisorbato 80, y una baja resistencia del tampón para suprimir la formación de partículas.

Optimización del pH

Se estudiaron los efectos del pH en el comportamiento de agregación de 1008 en seis condiciones de pH (5,0, 6,0, 6,25, 6,50, 6,75 y 7,0) en tampón citrato 15 mM que contenía NaCl al 0,1%, sacarosa al 6,75% y PS80 al 0,05%. 1008 se intercambió primero en los vehículos (sin PS80) de pH diferente usando la columna Illustra NAP-10 (GE Healthcare). La columna se equilibró primero con 15 ml de tampón de citrato. Después se cargó 1 ml de 1008 DS en la columna. Después de que la solución de DS completada se trasladó a la columna, la columna se lavó con 2 ml del mismo tampón de citrato usado para equilibrar la columna. Recoger la solución de 2 ml eluida de la columna en un concentrador Vivaspin 2 (MWCO 10KD, GE Healthcare). La solución eluida de 2 ml se concentró entonces hasta aproximadamente 1 ml usando una centrífuga Beckman GS-15R a 9384 xg y 4ºC. La concentración de proteína se midió a continuación con un espectrofotómetro NanoDrop 1000. Se determinó que la concentración final de 1008 para este estudio era de aproximadamente 70 mg / ml. Se introdujo PS80 en las formulaciones hasta una concentración objetivo final de 0,05%. El ensayo de turbidez cinética se llevó a cabo utilizando un espectrofotómetro PerkinElmer Lambda 35 con un soporte de células de dos posiciones y un lote de agua para la regulación de la temperatura. En una célula de cuarzo de volumen Starna submicro (Starna Scientific Ltd., Inglaterra) con una longitud de trayectoria de 1 cm, se añadieron 250 µl de formulación 1008 o el vehículo correspondiente. Las células se colocaron en el soporte de células que se precalentó a 55ºC. El cambio de OD350 en la formulación 1008 se monitorizó durante 120 minutos. Los datos OD350 obtenidos para formulaciones de pH diferente se representaron entonces en función del tiempo para la comparación.

Utilizando el ensayo cinético basado en turbidez, se estudiaron los efectos del pH en el comportamiento de agregación de 1008 con las formulaciones de pH 5,0 a 7,0 que contenían aproximadamente 70 mg / ml 1008. Para el ensayo de turbidez, un fuerte aumento en OD350 se asoció con el mayor Agregación eventos de la proteína. Por tanto, la diferencia en el tiempo de incubación requerido para que OD350 de cada formulación aumente podría reflejar la diferente estabilidad física de la proteína en las formulaciones. Como se muestra en la Figura 1, el 1008 parecía ser el más estable a pH 6,75 bajo las condiciones de formulación ensayadas, ya que tenía el tiempo de incubación más largo antes del fuerte aumento de OD350. Experimentos repetidos con resultados similares confirmaron que la formulación ensayada era más estable a pH 6,75.

Estudio 3

Efectos de los excipientes y de las altas concentraciones de activo

Se realizó un estudio medio factorial (Tabla 12) para investigar los efectos de las principales condiciones de formulación incluyendo concentraciones de proteína (60 - 120 mg / ml), sacarosa (4,5 - 9,0%), Tampón de citrato (10 a 20 mM) y polisorbato 80 (0,01 - 0,1%)

Tabla 12

Diseño del estudio para el estudio 3

Orden de corrida	**Punto central**	**Bloques**	**1008 (mg/ml)**	**Sacarosa (p/p %)**	**Buffer (mM)**	**Polisorbato 80 (%)**
1	1	1	60	4.5	10	0.01
2	1	1	120	4.5	10	0.1
3	1	1	60	9	10	0.1
4	1	1	120	9	10	0.01

5	1	1	60	4.5	20	0.1
6	1	1	120	4.5	20	0.01
7	1	1	60	9	20	0.01
8	1	1	120	9	20	0.1
9	0	1	90	6.75	15	0.055
10	0	1	90	6.75	15	0.055

Para preparar las formulaciones anteriores, se preparó primero un tampón de citrato al 20% a pH 6,5 y una solución madre de sacarosa al 30% en tampón citrato 20 mM a pH 6,5. A continuación, el tampón de citrato, el material de sacarosa y el agua para inyección se mezclaron en relaciones apropiadas para generar cinco tampones con PS80, que eran sacarosa al 4,5% en citrato 10 mM, sacarosa al 9% en citrato 10 mM, sacarosa al 4,5% en citrato 20 mM, % De sacarosa en citrato 20 mM y sacarosa al 6,75% en citrato 15 mM. 1008 DS se intercambiaron posteriormente en estos cinco tampones usando la columna Illustra NAP-25 (GE Healthcare), seguido por la concentración con el concentrador Vivaspin 6 (5 KD MWCO, GE Healthcare) a 8000 x 5 ° C. Las concentraciones de proteína en cada muestra se determinaron con un espectrofotómetro NanoDrop 2000 durante la centrifugación. Para las muestras en los primeros cuatro tampones, cuando la concentración de 1008 alcanzó ~ 70 mg / ml, parte de la muestra se retiró del concentrador y se usó en formulaciones preparadas (nº 1, 3, 5 y 7 en la Tabla 12) con 60 mg / Ml de API añadiendo la cantidad apropiada de tampón correspondiente y agregando en PS80 al 10%. El resto de las muestras se concentraron adicionalmente por encima de 130 mg / ml ya continuación se añadieron tampón y PS80 al 10% para obtener las formulaciones finales (# 2, 4, 6 y 8 en la Tabla 12). Las formulaciones nº 9 y 10 de la Tabla 12 se prepararon concentrando las 1008 muestras intercambiadas en tampón nº 5 hasta aproximadamente 108 mg / ml y luego se mezclaron con tampón y PS80 al 10%

para alcanzar las concentraciones finales de formulación. Los valores de pH de todas las formulaciones finales se midieron y se ajustaron a 6,5.

Se utilizó un ensayo de turbidez modificado del descrito anteriormente como herramienta analítica para la evaluación. En este ensayo de turbidez modificado se utilizó un espectrofotómetro Cary 100 UV-Vis de célula de 12 células. Las cubetas usadas en este ensayo fueron cubetas de cuarzo de 1 mm con tapones. En cada cubeta, se a~nadieron 300 µl de muestra para el ensayo. El cambio de densidad óptica a 360 nm se controló para las formulaciones incubadas a 55 ° C.

Efectos de los excipientes y de las altas concentraciones de activo

Las concentraciones medidas de 1008 y el pH final de todas las formulaciones para el Estudio 3 se resumen en la Tabla 13. Las formulaciones con concentraciones bajas, medias y altas de 1008 (Tabla 4.3.1.-1) con diferentes sacarosa, concentraciones de PS80 y la fuerza del tampón se incubaron a 55 ° C y se monitorizaron los cambios en OD360. Como se muestra en la Figura 2, se observó diferente propensión a la agregación para las formulaciones. Las formulaciones 2 y 6, que contenían la concentración de 1008 (~ 120 mg / ml) y la menor concentración de sacarosa (4,5%), se agregaron casi inmediatamente después de la incubación. Por otra parte, las formulaciones 3 y 7, que contenían la concentración de 1008 (~ 60 mg / ml) y una concentración de sacarosa (9%) relativamente más baja, se agregaron más lentamente que otras formulaciones. La propensión a la agregación de otras combinaciones de medio 1008 y concentraciones de sacarosa cayó entre los dos grupos anteriores.

Tabla 13

Condiciones finales de formulación para el Estudio 3

Formulación #	**Concentraciones de Excipiente**	**Concentración Final de 1008 (mg/ml)**	**pH Final**
1	10 mM Citrato/4.5%	58.223 (inferior)	6.56

	Sacarosa/0.01% PS80		
2	10 mM Citrato/4.5% Sacarosa/0.1% PS80	113.554 (mayor)	6.53
3	10 mM Citrato/9% Sacarosa/0.1% PS80	59.034 (inferior)	6.55
4	10 mM Citrato/9% Sacarosa/0.01% PS80	117.489 (mayor)	6.48
5	20 mM Citrato/4.5% Sacarosa/0.1% PS80	58.910 (inferior)	6.53
6	20 mM Citrato/4.5% Sacarosa/0.01% PS80	116.712 (mayor)	6.50
7	20 mM Citrato/9% Sacarosa/0.01% PS80	57.431 (inferior)	6.47
8	20 mM Citrato/9% Sacarosa/0.1% PS80	116.466 (mayor)	6.45
9	15 mM Citrato/6.75% Sacarosa/0.055% PS80	87.555 (medium)	6.48
10	15 mM Citrato/6.75% Sacarosa/0.055% PS80	87.769 (medium)	6.49

Usando el tiempo para que OD360 de cada formulación alcanzara 0,25 como criterio, se compararon los efectos de diferentes factores de formulación. Los resultados sugirieron que la sacarosa tuvo el mayor impacto en la agregación de 1008, seguido por la concentración de API. Los efectos de las concentraciones de sacarosa y API fueron opuestos, lo que indica una mayor sacarosa y se prefirieron concentraciones API más bajas para una mejor estabilidad de la formulación. Otros dos factores, la fuerza del tampón y PS80 mostraron menos efecto.

Estudio 4

Estudio adicional sobre concentraciones de activo y sacarosa

Basándose en los resultados del Estudio 3 anterior, se realizó el Estudio 4 para investigar más a fondo los efectos de la concentración de proteína (60 - 120 mg / ml) y la concentración de sacarosa (con un intervalo más estrecho de 6 a 9%) en tampón citrato 15 mM que contenía 0,05 % PS 80 a pH 6,50. El diseño del estudio se muestra en la tabla siguiente.

Tabla 14

Diseño del estudio para el estudio 4

Orden de Corrida	Punto Central	Bloques	1008 (mg/ml)	Sacarosa (p/p%)
1	1	1	60	6
2	1	1	120	6
3	1	1	60	9
4	1	1	120	9
5	-1	1	47.6	7.5
6	-1	1	132.4	7.5
7	-1	1	90	5.4
8	-1	1	90	9.6
9	0	1	90	7.5
10	0	1	90	7.5
11	0	1	90	7.5
12	0	1	90	7.5

Para preparar las formulaciones, se cargaron alrededor de 80 g de sustancia fármaco 1008 en un sistema TFF y después se realizó un intercambio de tampón con tampón citrato 15 mM que contenía 6% de sacarosa a aproximadamente 5 veces el volumen de la sustancia fármaco. Después del intercambio de tampón, el volumen de la solución de proteína se redujo a aproximadamente la mitad del volumen inicial utilizando el sistema TFF. Se recuperaron aproximadamente 44 g de solución 1008 concentrada y la proteína concentrada fue aproximadamente 112 mg / ml medida por el espectrofotómetro NanoDrop 2000. La solución 1008 concentrada se utilizó entonces para preparar las formulaciones nº 1, 3, 5, 7-12 mezclando con una cantidad apropiada de 10% de PS80 y 15 mM de tampones de citrato que contenían sacarosa al 0, 6% y / o 40% para obtener la correspondiente solución final API, sacarosa y PS80 en cada una de estas formulaciones. El resto de la solución 1008 se concentró adicionalmente hasta aproximadamente 132 mg / ml para preparar las formulaciones # 2 y 4 de la misma manera. Por último, la formulación nº 6 se preparó concentrando solución 1008 a aproximadamente 171 mg / ml y las concentraciones de proteína, sacarosa y PS80 se ajustaron con 10% de PS80 y 15 mM de tampones citrato que contenían sacarosa al 0, 6% y / o 40%. La concentración final de 1008 en cada formulación se determinó con el espectrofotómetro NanoDrop 2000 y el pH se ajustó a 6,5.

Las muestras se analizaron utilizando el ensayo de turbidez descrito anteriormente. Ocho formulaciones seleccionadas (# 1-4 y # 7-10) también se almacenaron en una incubadora exploratoria a 40 ° C durante 6 semanas y se analizaron con métodos MIF, IEX y SEC en diferentes puntos temporales.

Se investigaron 12 formulaciones, según se enumeran en la Tabla 15.

Tabla 15

Condiciones de formulación final y Tm del ensayo de turbidez para el Estudio 4

Formulación #	Conc. Sacarosa	Final 1008 (mg/ml)	Final pH	T_m (minutos)
1	6%	61.6	6.49	62.0
2	6%	122.8	6.49	27.4
3	9%	60.0	6.50	86.3
4	9%	119.0	6.51	34.2
5	7.5%	47.7	6.50	97.0
6	7.5%	134.5	6.50	24.2
7	5.38%	94.6	6.50	33.1
8	9.62%	86.2	6.50	49.4
9	7.5%	91.7	6.50	41.2
10	7.5%	89.5	6.50	44.5
11	7.5%	88.4	6.48	38.6
12	7.5%	90.1	6.52	40.0

El ensayo de turbidez a 55ºC se utilizó para monitorizar la agregación de las formulaciones. Como se muestra en la Figura 3, los diferentes grados de agregación fueron mostrados por las formulaciones bajo la misma tensión térmica. Las formulaciones con las concentraciones relativamente más altas de 1008 y las bajas concentraciones de sacarosa (tales como las formulaciones # 2 y 6 en la Tabla 15) fueron las que se agregaron rápidamente tras la incubación. Las formulaciones con concentraciones de sacarosa 1008 y relativamente altas (formulaciones # 3 y 5 en la Tabla 15) se agregaron más lentamente que todas las demás formulaciones. Las curvas obtenidas del ensayo de turbidez para las

diversas formulaciones se ajustaron a una función sigmoidal. El tiempo de incubación corresponde a la mitad de una transición se registró como Tm (transición punto medio) para cada formulación. Los resultados se enumeran en la Tabla 15. Los valores de Tm frente a las concentraciones de sacarosa y 1008 mostraron los efectos opuestos de la sacarosa y las concentraciones de 1008 en la agregación de proteínas.

Además de los estudios utilizando el ensayo de turbidez a 55 ° C, la estabilidad de ocho formulaciones seleccionadas a 40 ° C también fueron controlados por MFI, SEC y IEX durante 6 semanas. Las formulaciones y resultados se enumeran en las Tablas 16 a 23. De acuerdo con el ensayo de turbidez, los resultados de MFI mostraron que las formulaciones con una concentración alta de 1008 (~ 120 mg / ml) formaron más partículas, especialmente partículas mayores de 25 \ mu m, en comparación con formulaciones con API inferior Concentraciones. Los resultados de la MFI no mostraron efectos claros de la concentración de sacarosa para las formulaciones con una cantidad similar de 1008 (formulaciones # 7 a 10). Como se muestra en la Figura 4, después de un almacenamiento de 6 semanas a 40ºC, las dos formulaciones (# 2 y 4) con la concentración alta de 1008 se degradaron más, que las formulaciones con ~ 60 mg / ml 1008 se degradaron menos que todas las demás formulaciones . En cuanto a las formulaciones con ~ 90 mg / ml 1008, se observó una degradación ligeramente menor a una concentración más alta de sacarosa (formulaciones # 8) que a la menor concentración de sacarosa (formulación # 7). Los resultados del IEX mostraron la misma tendencia que la SEC.

Tabla 16

Resultados del estudio de estabilidad acelerada a 40 ° C

Para la formulación # 1 del Estudio 4

Condiciones de Formulación	**F1: 61.6 mg/ml 1008 in 15 mM Citrato, 6% Sacarosa, 0.05% PS80, pH 6.5**			
Tiempo	**Inicial**	**2 semana**	**4 semana**	**6 semana**
Particulados por MFI				
≥10 µm, < 100 µm (#/mL)	42	18	107	26
≥25 µm, < 100 µm (#/mL)	6	2	4	4
≥50 µm, < 100 µm (#/mL)	0	0	0	0
≥2 µm, < 100 µm (#/mL)	1076	656	12911	2076
SEC (% Inicial)	99.9	93.6	83.0	77.1
IEX (% Inicial)	97.7	92.8	83.2	76.8

Tabla 17

Resultados del estudio de estabilidad acelerada a 40 °C

Para la formulación # 2 del Estudio 4

Condiciones de Formulación	**F2: 122.8 mg/ml 1008 in 15 mM Citrato, 6% Sacarosa, 0.05% PS80, pH 6.5**			
Tiempo	**Inicial**	**2 semana**	**4 semana**	**6 semana**
Particulados por MFI				
≥10 µm, < 100 µm (#/mL)	36	8	16	32
≥25 µm, < 100 µm (#/mL)	8	2	2	2
≥50 µm, < 100 µm (#/mL)	2	2	0	0
≥2 µm, < 100 µm (#/mL)	1267	994	235	4856
SEC (% Inicial)	100.0	91.2	78.7	63.3
IEX (% Inicial)	97.8	91.0	79.1	69.3

Tabla 18

Resultados del estudio de estabilidad acelerado a 40ºC para la formulación # 3 del Estudio 4

Condiciones de Formulación	**F3: 60.0 mg/ml 1008 in 15 mM Citrato, 9% Sacarosa, 0.05% PS80, pH 6.5**			
Tiempo	**Inicial**	**2 semana**	**4 semana**	**6 semana**
Particulados por MFI				
≥10 µm, < 100 µm (#/mL)	10	22	16	28
≥25 µm, < 100 µm (#/mL)	0	0	0	2
≥50 µm, < 100 µm (#/mL)	0	0	0	0
≥2 µm, < 100 µm (#/mL)	959	782	897	2428
SEC (% Inicial)	100.0	94.0	84.8	77.7
IEX (% Inicial)	97.8	93.1	84.4	76.9

Tabla 19

Resultados del estudio de estabilidad acelerado a 40ºC para la formulación # 4 del Estudio 4

Condiciones de Formulación	**F4: 119.0mg/ml 1008 in 15 mM Citrato, 9% Sacarosa, 0.05% PS80, pH 6.5**			
Tiempo	**Inicial**	**2**	**4**	**6**

		semana	semana	semana
Particulados por MFI				
≥10 µm, < 100 µm (#/mL)	12	24	4	16
≥25 µm, < 100 µm (#/mL)	0	0	0	4
≥50 µm, < 100 µm (#/mL)	0	0	0	2
≥2 µm, < 100 µm (#/mL)	366	581	384	2659
SEC (% Inicial)	100.0	92.5	79.1	63.6
IEX (% Inicial)	97.8	92.2	81.3	69.1

Tabla 20

Resultados del estudio de estabilidad acelerado a 40ºC para la formulación # 7 del Estudio 4

Condiciones de Formulación	**F7: 94.6mg/ml 1008 in 15 mM Citrato, 5.4% Sacarosa, 0.05% PS80, pH 6.5**			
	Inicial	**2 semana**	**4 semana**	**6 semana**
Particulados (MFI)				
≥10 µm, < 100 µm (#/mL)	14	20	6	6
≥25 µm, < 100 µm (#/mL)	0	0	0	0
≥50 µm, < 100 µm (#/mL)	0	0	0	0
≥2 µm, < 100 µm (#/mL)	626	1647	843	2896
SEC (% Inicial)	100.0	93.1	82.2	70.3
IEX (% Inicial)	97.9	92.5	82.6	71.5

Tabla 21

Resultados del estudio de estabilidad acelerada a 40ºC para la formulación # 8 del Estudio 4

Condiciones de Formulación	**F8: 86.2 mg/ml 1008 in 15 mM Citrato, 9.6% Sacarosa, 0.05% PS80, pH 6.5**			
Tiempo	**Inicial**	**2 semana**	**4 semana**	**6 semana**
Particulados por MFI				
≥10 µm, < 100 µm (#/mL)	4	18	8	8
≥25 µm, < 100 µm (#/mL)	0	0	0	0
≥50 µm, < 100 µm (#/mL)	0	0	0	0
≥2 µm, < 100 µm (#/mL)	533	1810	1281	2162
SEC (% Inicial)	100.0	93.3	83.2	73.8
IEX (% Inicial)	97.8	93.1	83.6	73.9

Tabla 22

Resultados del estudio de estabilidad acelerado a 40ºC para la formulación # 9 del Estudio 4

Condiciones de Formulación	**F9: 91.7mg/ml 1008 in 15 mM Citrato, 7.5% Sacarosa, 0.05% PS80, pH 6.5**			
Tiempo	**Inicial**	**2 semana**	**4 semana**	**6 semana**
Particulados por MFI				
≥10 µm, < 100 µm (#/mL)	6	20	6	28
≥25 µm, < 100 µm (#/mL)	0	0	2	0
≥50 µm, < 100 µm (#/mL)	0	0	0	0

≥2 µm, < 100 µm (#/mL)	678	682	1068	4003
SEC (% Inicial)	100.0	93.8	83.0	71.0
IEX (% Inicial)	97.8	93.2	83.7	72.2

Tabla 23

Resultados del estudio de estabilidad acelerada a 40 ° C

Para la formulación # 10 del Estudio 4

Condiciones de Formulación	**F10: 89.5mg/ml 1008 in 15 mM Citrato, 7.5% Sacarosa, 0.05% PS80, pH 6.5**			
Tiempo	**Inicial**	**2 semana**	**4 semana**	**6 semana**
Particulados por MFI				
≥10 µm, < 100 µm (#/mL)	18	10	22	44
≥25 µm, < 100 µm (#/mL)	0	2	4	0
≥50 µm, < 100 µm (#/mL)	0	0	0	0
≥2 µm, < 100 µm (#/mL)	352	638	1068	2536
SEC (% Inicial)	100.0	93.9	83.4	72.0
IEX (% Inicial)	97.9	93.5	83.7	72.9

Ejemplo 3

Estudios Exploratorios de Estabilidad

Formulación de control

Se realizó estabilidad exploratoria para una formulación de 60 mg / ml solución 1008 en citrato 20 mM, PS20 0,001% a pH 6,25 como control. La formulación de control se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 µm y se almacenó a 40 ° C, temperatura ambiente y refrigerador. Las muestras se retiraron a 0, 2 y 5 semanas

para muestras a 40ºC, y 26 semanas para muestras almacenadas a temperatura ambiente y refrigerador. Las muestras de estabilidad seleccionadas se ensayaron en cuanto a pH, osmolalidad, contenido en A280, SEC, IEX CGE y ELISA. Los resultados se muestran en la Tabla 24.

Tabla 24

Resultados de la exploración de estabilidad para la formulación de control

(60 mg / ml 1008 en citrato 20 mM, PS20 0,001% a pH 6,25)

Temp		**40°C**		**RT**	**2-8°C**
Tiempo (semana)	**0**	**2**	**5**	**26**	**26**
Concentraciónpor A280 (mg/ml)	na	62	61*	na	na
pH	na	6.297	6.333	na	na
Osmolalidad	na	312	310	na	na
SEC (% Inicial)	100	90.6	75.6	88.8	99.4
IEX (% Inicial)	100	91.3	70.9	88.5	99.3
CGE	na	99.3	98.3	na	na
ELISA	na	na	1.0	na	na

*** La muestra se observó visualmente nublada con precipitado blanco.**

Otro estudio sobre la formulación de control se realizó para 60 mg / ml solución 1008 en 20 mM citrato, 0,001% PS20 y 0,73% NaCl a pH 6,25. La formulación se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 \ mu m y se almacenó a 40ºC. Las muestras se retiraron a 1, 2, 3 y 4 semanas para el análisis de MFI. Los resultados se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25

Resultados de estabilidad para la formulación de POC a 40 ° C (60 mg / ml de 1008 en citrato 20 mM, PS20 0,001% a pH 6,25)

Tiempo (semana)	**0**	**1**	**2**	**3**	**4**
≥ 10 um por MFI (#/mL)	na	172	894	2946	3183
≥ 25 um por MFI (#/mL)	na	23	157	539	1189
≥ 50 um por MFI (#/mL)	na	4	19	92	248
Total Partículas por MFI (#/mL)	na	2381	8954	29716	17705

Estudio exploratorio de estabilidad para 60 mg / ml de 1008 con 9% de sacarosa y 0,5% de polisorbato 80

Se realizó estabilidad exploratoria para una formulación 1008 de 60 mg / ml que contenía sacarosa al 9% y PS80 al 0,5%. La formulación se filtró a través de un filtro de jeringa de 0,2 \ mu m y se almacenó a 40ºC. Las muestras se retiraron a 1,6, 2,9 y 4 semanas y se analizaron por MFI, SEC y IEX. Los resultados se tabulan en la Tabla 26.

Tabla 26

Resultados de estabilidad para una formulación de 60 mg / ml de 1008 a 40ºC (60 mg / ml de 1008 en citrato 20 mM, sacarosa al 9% y PS80 al 0,5% a pH 6,25)

Tiempo (semana)	**0**	**1.6**	**2.9**	**4**
≥ 10 um por MFI (#/mL)	-	12	80	130
≥ 25 um por MFI (#/mL)	-	4	12	12
≥ 50 um por MFI	-	0	4	0

(#/mL)				
Total Partículas por MFI (#/mL)	-	688	2900	4876
SEC (% Inicial)	98.4	93.3	88.6	84.1
IEX (% Inicial)	97.0	91.3	83.9	78.9

Estudio de estabilidad piloto para 60 mg / ml de 1008, sacarosa al 9%, citrato 20 mM, PS80 al 0,1% a pH 6,25

Se realizó un estudio de estabilidad en tiempo real de una solución de 60 mg / ml 1008 para la formulación que contenía sacarosa al 9%, citrato 20 mM, PS80 al 0,1% a pH 6,25 como se muestra en la Tabla 27. Las muestras de estabilidad se almacenaron a 2-8ºC, 25 ° C, 40 ° C y gabinete de luz (LC); También pasaron por tres ciclos de congelación-descongelación (FT). Las muestras se extrajeron de acuerdo con el programa mostrado en la Tabla 28, y se analizaron mediante diversos métodos analíticos tales como pH, osmolalidad, MFI, contenido, SEC, IEX, CGE y potencia.

Tabla 27

Composición de la formulación piloto de estabilidad

Componente	**Concentración (W/V %)**
1008	6
Ácido citrico anhidro	0.012
Citrato trisodico (dihidrato)	0.57
Sacarosa	9
Polisorbato 80	0.1
Ácido clorhidrico o Hidróxido de sodio	pH 6.25
Agua para Inyección	qs 100

Tabla 28

Condiciones de almacenamiento y horario para el estudio piloto de estabilidad

Condición	**Tiempo**
2-8°C (refrigerador)	0, 4, 6.9, 8, 12, y 26 semanas
25°C	2, 4, 6.9, 8, 12, y 26 semanas
40°C	1.1, 2, y 4 semanas
Luz de cabina (LC)	6 semanas
Congelamiento Descongelamiento (FT)	3 ciclos

En la etapa inicial, se inició el estudio de estabilidad en tiempo real de una solución de 60 mg / ml 1008. La formulación contenía 9% de sacarosa, citrato 20 mM, PS80 al 0,1% a pH 6,25 como se muestra en la Tabla 29. Las muestras se almacenaron a 2-8ºC, 25ºC, 40ºC y gabinete de luz (LC); También pasaron por tres ciclos de congelación-descongelación (FT). Las muestras se retiraron de acuerdo con el programa mostrado en la Tabla 30, y se analizaron mediante diversos métodos analíticos. Los resultados de estabilidad se tabulan en las Tablas 31-33.

Tabla 29

Composición de la formulación piloto de estabilidad

De la Solución de 60 mg / ml de 1008 (1008)

Component	**Concentración (**W/V %)
1008	6
Ácido Cítrico Anhidro	0.012
Citrato trisódico (dihidrato)	0.57
Sacarosa	9
Polisorbato 80	0.1

Äcido clorhídrico o Hidroxido de sodio	pH 6.25
Agua para Inyección	qs 100

Tabla 30

Condiciones de almacenamiento y horario para el estudio piloto de estabilidad

Condición	**Tiempo**
2-8°C (refrigerador)	0, 4, 6.9, 8, 12, y 26 semanas
25°C	2, 4, 6.9, 8, 12, y 26 semanas
40°C	1.1, 2, y 4 semanas
Luz de cabina (LC)	6 semanas
Congelamiento Descongelamiento (FT)	3 ciclos

5

Tabla 31 Resultados (Parte 1/3) del Estudio Piloto de Estabilidad

Para el 6% de 1008, 9% de sacarosa, 20 mM de citrato, 0,1% de PS80 a pH 6,25

Temperatura	**2-8 C**					
Tiempo (sem)	**0**	**4**	**6.9**	**8**	**12**	**26**
≥ 10 um por MFI (#/mL)	31	57	134	8	19	42
≥ 25 um por MFI (#/mL)	8	4	31	4	0	11
≥ 50 um por MFI (#/mL)	0	0	8	0	0	4
Total Partículas por MFI (#/mL)	1284	4620	6848	5916	1047	4976
Apariencia						

Concentración (mg/ml)	58	64	66			
pH	6.197	6.184	6.184			
Osmolalidad	349	349	356			
UV 280 (mg/ml)						
SEC (% Inicial)	100			99.5	99.4	99.9
IEX (% Inicial)	100			99.3	99.3	98.9
CGE	99.83			99.7	99.5	
ELISA	0.86			1.2	0.97	1.1

Tabla 32 Resultados (Parte 2/3) del Estudio Piloto de Estabilidad

Para el 6% de 1008, 9% de sacarosa, 20 mM de citrato, 0,1% de PS80 a pH 6,25

Temp	**25°C**					
Tiempo (sem)	**2**	**4**	**6.9**	**8**	**12**	**26**
≥ 10 um por MFI (#/mL)	46	50	206	27	38	157
≥ 25 um por MFI (#/mL)	4	4	50	4	0	19
≥ 50 um por MFI (#/mL)	0	0	11	0	0	0
Total Partículas por MFI (#/mL)	8186	6581	8679	2553	4143	10681
Apariencia						
Concentración(mg/ml)	66	75	69			
pH	6.209	6.198	6.196			
Osmolalidad	356	353	350			
UV 280 (mg/ml)						
SEC (% Inicial)	99.3	98.1	95.8	95.2	93.8	86.6
IEX (% Inicial)	99.8	97.2	95.0	94.2	91.5	85.7
CGE	99.6	99.7		99.6	99.3	

ELISA	-	-	-	1.1	0.92	1.1

Tabla 33 Resultados (Parte 3/3) del Estudio Piloto de Estabilidad

Para el 6% de 1008, 9% de sacarosa, 20 mM de citrato, 0,1% de PS80 a pH 6,25

Temp	**40°C**				**LC**	**FT**
Tiempo (semana)	**0**	**1.1**	**2**	**4**	**6**	**3 ciclos**
≥ 10 um por MFI (#/mL)	31	34	161	88	287	138
≥ 25 um por MFI (#/mL)	8	4	50	15	31	19
≥ 50 um por MFI (#/mL)	0	0	15	4	0	0
Total Partículas por MFI (#/mL)	1284	3871	6306	29372	16081	8415
Apariencia				nublado, precipitado blanco observado	amirillo	
Concentración(mg/ml)	58	66	65	74	57	63
pH	6.20	6.18	6.22	6.24	6.16	6.19
Osmolaildad (mOsm/Kg)	349	348	350	353	353	349
UV 280 (mg/ml)						
SEC (% Inicial)	100	95.6	88.6	72.9	10.5	100
IEX (% Inicial)	100	98.1	89.1	71.3	n/a	100
CGE	99.8	99.8	99.0	98.6	34.9	99.5
ELISA	0.86	-	-	0.87		

Estabilidad exploratoria en tampón de citrato: 60 mg / ml 1008 en citrato de 15 mm / sacarosa al 6,75% / PS80 al 0,05% / pH 6,75

Se realizó una estabilidad exploratoria en tampón citrato para la formulación de 60 mg / ml 1008 en citrato 15 mM / sacarosa al 6,75% / PS80 al 0,05% / pH 6,75. Las muestras de estabilidad se almacenaron a 5 ° C y 25 ° C, así como se sometieron a ciclos de congelación-descongelación. Las muestras se extrajeron de acuerdo con el calendario mostrado en la tabla siguiente, y se analizaron en cuanto a aspecto, pH, osmolalidad, MFI, contenido, SEC y IEX.

Tabla 34

Condiciones de almacenamiento y horario para estudios de estabilidad interinos

Condición	**Tiempo**
25°C	0, 1, 3, 6, y 9 meses
5°C	3, 6, y 9 meses
Congelamiento Desconglamiento (FT)	3 ciclos

De forma similar, se llevó a cabo la estabilidad exploratoria en tampón de histidina para la formulación de 60 mg / ml de 1008 en histidina 15 mM / sacarosa al 6,75% / PS80 al 0,05% / pH 6,75. Las muestras de estabilidad se almacenaron a 5ºC y 25ºC. Las muestras también se sometieron a ciclos de congelación-descongelación. Las muestras se extrajeron de acuerdo con el calendario mostrado en la tabla siguiente, y se analizaron en cuanto a aspecto, pH, osmolalidad, MFI, contenido, SEC y IEX.

Tabla 35

Condiciones de almacenamiento y horario para estudios de estabilidad interinos

Condición	Tiempo
25°C	0, 1, 3, y 6 meses
5°C	3 y 6 meses
Congelamiento Desconglamiento (FT)	3 ciclos

Los datos experimentales se tabulan en las tablas siguientes.

Tabla 36 Resultados (Parte 1/2) del Estudio de Estabilidad Provisional a 25 °C

60 mg / ml 1008 en citrato 15 mM / sacarosa al 6,75% / PS80 al 0,05% / pH 6,75

Tiempo (mese)	Inicial	1	3	6	9
Particulados					
≥ 10 um por MFI (#/mL)	28	42	49	70	
≥ 25 um por MFI (#/mL)	3	0	3	3	
≥ 50 um por MFI (#/mL)	0	0	0	0	
Total Partículas por MFI (#/mL)	400	1819	2279	8355	
≥ 10 um por HIAC (#/mL)	218.3				
≥ 25 um por HIAC (#/mL)	38.7				
≥ 50 um por HIAC (#/mL)	7.0				
Total Partículas por HIAC (#/mL)	11170				
apariencia					
Color	Sin color	Sin color	Sin color	Sin color	
Claridad	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1	
pH	6.74	6.72	6.76		
Osmolalidad (mOsm)	320				

SEC (% Inicial)	99.9 (%area)	98.6	94.2	97.4	
IEX (% Inicial)	97.0 (%area)	98.4	94.2	91.0	89.9

Tabla 37 Resultados (Parte 2/2) del Estudio Interino de Estabilidad

60 mg / ml 1008 en citrato 15 mM / sacarosa al 6,75% / PS80 al 0,05% / pH 6,75

Condición	**5°C**			**FT**
Tiempo (Mes)	**3**	**6**	**9**	**3 ciclos**
Particulados				
≥ 10 um por MFI (#/mL)	56	63		24
≥ 25 um por MFI (#/mL)	14	6.95		3
≥ 50 um por MFI (#/mL)	0	0		0
Total Partículas por MFI (#/mL)	1092	6322		29052
≥ 10 um por HIAC (#/mL)				441
≥ 25 um por HIAC (#/mL)				67
≥ 50 um por HIAC (#/mL)				18
Total Partículas por HIAC (#/mL)				27700
Apariencia				
Color	Sin color	Sin color		ND
Claridad	NMT EP1	NMT EP1		ND
pH	6.72	-		6.71
Osmolalidad (mOsm)	-	-		306

SEC (% Inicial)	99.8	99.8		99.7
IEX (% Inicial)	100.0	99.4	99.9	99.5

Tabla 38 Resultados (Parte 1/2) del Estudio Interino de Estabilidad a 25 °C

60 mg / ml 1008 en histidina 15 mM / sacarosa al 6,75% / PS80 al 0,05% / pH 6,75

Tiempo (Mes)	**Inicial**	**1**	**3**	**6**
Particulados				
≥ 10 um por MFI (#/mL)	14	642	153	56
≥ 25 um por MFI (#/mL)	3	54	14	3
≥ 50 um por MFI (#/mL)	0	4	0	0
Total Partículas por MFI (#/mL)	302	20483	9805	13374
≥ 10 um por HIAC (#/mL)	1493			
≥ 25 um por HIAC (#/mL)	127			
≥ 50 um por HIAC (#/mL)	15			
Total Partículas por HIAC (#/mL)	17341			
Apariencia				
Color	Sin color	Sin color	Sin color	Sin color
Claridad	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1	NMT EP1
pH	6.72	6.70	6.70	
Osmolalidad (mOsm)	286			
SEC (% Inicial)	99.9 (% area)	98.3	93.6	97.5
IEX (% Inicial)	97.1 (%area)	97.9	92.5	87.8

Tabla 39 Resultados (Parte 2/2) del Estudio Interino de Estabilidad

60 mg / ml 1008 en histidina 15 mM / sacarosa al 6,75% / PS80 al 0,05% / pH 6,75

Condición	**5°C**		**F-T**
Tiempo (Mes)	**3**	**6**	**3 ciclos**
Particulados			
≥ 10 um por MFI (#/mL)	167	59.	17
≥ 25 um por MFI (#/mL)	10	7	0
≥ 50 um por MFI (#/mL)	3	0	0
Total Partículas por MFI (#/mL)	17404	7368	7607
≥ 10 um por HIAC (#/mL)			756
≥ 25 um por HIAC (#/mL)			175
≥ 50 um por HIAC (#/mL)			51
Total Partículas por HIAC (#/mL)			27698
Apariencia			
Color	Sin color	Sin color	ND
Claridad	NMT EP1	NMT EP1	ND
pH	6.70		6.70
Osmolalidad (mOsm)	-	-	271
SEC (% Inicial)	99.7	100.0	99.9
IEX (% Inicial)	99.2	99.2	99.2

Los datos experimentales indicaron que la estabilidad de las formulaciones ensayadas se incrementó significativamente, especialmente en la supresión de la formación de materia particulada, comparando con la de la formulación de control a una concentración de proteína de 60 mg / ml.

La formulación en solución estable identificada contenía Citrato 15 mM / Sacarosa al 6,75% / PS80 al 0,0505% como se muestra en la Tabla 40.

Tabla 40

Componente	**Concentración(W/V %)**	**Concentración Rango (p/v %)**
1008	12	6-12
Ácido citrico anhidro	0.009	0.006 – 0.012
Citrato Trisódico (dihydrate)	0.428	0.285 – 0.57
Sacarosa	6.75	6.75
Polisorbato 80	0.05%	0.05%
Ácido clorhídrico o Hidroxido de sodio	pH 6.75	pH 6.75
Agua para Inyección	qs 100	qs 100

La presente invención y sus realizaciones se han descrito en detalle. Sin embargo, el alcance de la presente invención no se pretende que esté limitado a las realizaciones particulares de cualquier procedimiento, fabricación, composición de materia, compuestos, medios, métodos y / o etapas descritos en la memoria descriptiva. Pueden hacerse varias modificaciones, sustituciones y variaciones al material descrito sin apartarse del espíritu y / o características esenciales de la presente invención. De acuerdo con esto, un experto en la técnica apreciará fácilmente a partir de la descripción que las modificaciones, sustituciones y / o variaciones posteriores que realizan sustancialmente la misma función o que logran sustancialmente el

mismo resultado que las realizaciones descritas aquí se pueden utilizar de acuerdo con tales realizaciones relacionadas del Presente invención. Por lo tanto, se pretende que las siguientes reivindicaciones abarquen dentro de su alcance modificaciones, sustituciones y variaciones a procedimientos, manufacturas, composiciones de materia, compuestos, medios, métodos y / o etapas descritos en la presente memoria. Las reivindicaciones no deben leerse como limitadas al orden o elementos descritos, a menos que se indique lo contrario. Debe entenderse que pueden realizarse diversos cambios de forma y detalle sin apartarse del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

Reivindicaciones

1. Una composición farmacéutica acuosa, que comprende (i) al menos 50 mg / ml de un anticuerpo anti-VEGF que comprende las secuencias de SEQ ID NO: 1 y SEQ ID NO: 2, (ii) sacarosa o trehalosa, (iii) Un tampón de citrato o histidina, y (iv) polisorbato 80 como un tensoactivo.

2. La composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 1, que comprende aproximadamente 4,5% a 11% (p / v) de sacarosa o aproximadamente 5% a 10% (p / v) de trehalosa, 0,006% a 0,012% de ácido cítrico (p / 0,2 a 0,6 citrato trisódico dihidrato (p / v) y 0,01% a 0,1% polisorbato 80 (p / v), en el que el pH de la composición es de aproximadamente 6,3 a aproximadamente 7,3.

3. La composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 2, en la que el pH de la composición es aproximadamente 6,8.

4. La composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 1, en la que el anticuerpo comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3.

5. La composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 1, en la que la concentración del anticuerpo anti-VEGF es de aproximadamente 60 mg / ml, la concentración de sacarosa es aproximadamente 6,75% (p / v), la concentración de ácido cítrico es de aproximadamente 0,01% P / v), la concentración de citrato

trisódico dihidrato es de aproximadamente 0,428% (p / v), y la concentración de polisorbato 80 es de aproximadamente 0,05% (p / v).

6. La composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 5, en la que el anticuerpo anti-VEGF comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3, y el pH es aproximadamente 6,8.

7. La composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 1, en la que la concentración del anticuerpo anti-VEGF es de aproximadamente 120 mg / ml, la concentración de sacarosa es de aproximadamente 6,8% (p / v), la concentración de ácido cítrico es de aproximadamente 0,01% (p / v), la concentración de citrato trisódico dihidrato es de aproximadamente 0,428% (p / v), y la concentración de polisorbato 80 es de aproximadamente 0,05% (p / v).

8. La composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 7, en la que el anticuerpo anti-VEGF comprende la secuencia de SEQ ID NO: 3, y el pH es de aproximadamente 6,8.

9. Un dispositivo de administración que incluye la composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 1.

10. El dispositivo de suministro de la reivindicación 9, que es una jeringa precargada.

11. Un dispositivo de suministro que incluye la composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 2.

12. El dispositivo de suministro de la reivindicación 11, que es una jeringa precargada.

13. Un dispositivo de administración que incluye la composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 7.

14. El dispositivo de suministro de la reivindicación 13, que es una jeringa precargada.

15. Un método para administrar un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto, que comprende una etapa de administrar al sujeto una composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 1.

16. Un método para tratar una enfermedad o trastorno ocular que está mediado por VEGF, que comprende administrar a un sujeto, una composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 1.

17. El método de la reivindicación 16, en el que dicha enfermedad o trastorno ocular que es una enfermedad neovascular ocular.

18. Una formulación liofilizada preparada por liofilización de la composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 1.

19. Un método para suministrar un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto, que comprende una etapa de administrar al sujeto una composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 2.

20. Un método para tratar una enfermedad o trastorno ocular que está mediado por VEGF, que comprende administrar a un sujeto, una composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 2.

21. El procedimiento de la reivindicación 20, en el que dicha enfermedad o trastorno ocular que es una enfermedad neovascular ocular.

22. Una formulación liofilizada preparada liofilizando la composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 2.

23. Un método para suministrar un anticuerpo anti-VEGF a un sujeto, que comprende una etapa de administrar al sujeto una composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 7.

24. Un método para tratar una enfermedad o trastorno ocular que está mediado por VEGF, que comprende administrar a un sujeto, una composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 7.

25. El método de la reivindicación 24, en el que dicha enfermedad o trastorno ocular es una enfermedad neovascular ocular.

26. Una formulación liofilizada preparada al liofilizar la composición farmacéutica acuosa de la reivindicación 7.

Resumen

La presente invención proporciona anticuerpos anti-VEGF formulados como composiciones farmacéuticas acuosas de alta concentración, adecuadas para inyección, preferiblemente, una inyección intravitreal. Las composiciones farmacéuticas acuosas son útiles para la entrega de una alta concentración del ingrediente activo anticuerpo a un paciente sin niveles altos de agregación de anticuerpo y sin niveles altos de material particulado sub-visible. Una composición farmacéutica de la invención que comprende un anticuerpo que tiene una concentración de al menos 50mg/ml. Una composición farmacéutica acuosa de la invención que incluye un azúcar, un agente regulador de pH y un surfactante.