

MEMORIA DESCRIPTIVA

Esta solicitud se presenta el 23 de Marzo 2018 como una Solicitud de Patente Internacional y reivindica el beneficio de prioridad a la Solicitud de Patente Provisional de los Estados Unidos N° 62/482.270, presentada el 6 de Abril, 2017, cuya revelación se incorpora en este documento en su totalidad.

Campo de la Invención

La presente invención tiene relación con el campo de formulaciones de anticuerpos terapéuticos. Más específicamente, la presente invención tiene relación con el campo de formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo humano que se une específicamente a la proteína programada de muerte-1 humana (PD-1).

Antecedentes de la Invención

Las macromoléculas terapéuticas (por ejemplo, anticuerpos) deben ser formuladas en una manera que no sólo haga las moléculas adecuadas para administración a pacientes, sino que también mantenga su estabilidad durante el almacenamiento y posterior uso. Por ejemplo, los anticuerpos terapéuticos en una solución líquida son propensos a degradación, agregación o modificaciones químicas no deseadas, a menos que la solución sea formulada adecuadamente. La estabilidad de un anticuerpo en formulación líquida depende no sólo de los tipos de excipientes usados en la formulación, sino que también en las cantidades y proporciones de los excipientes entre sí. Además, otras consideraciones aparte de la estabilidad deben ser consideradas cuando se prepara una formulación de anticuerpo líquido. Ejemplos de dichas consideraciones adicionales incluyen la viscosidad de la solución y la concentración del anticuerpo que puede ser acomodado por una formulación dada, y la calidad visual o el atractivo de la formulación. Por tanto, cuando se formula un anticuerpo terapéutico, se debe tener mucho cuidado de llegar a una formulación que permanezca estable, contenga una adecuada concentración de anticuerpo, y posea una viscosidad adecuada como también otras propiedades que le permitan administrar la formulación convenientemente a pacientes.

Los anticuerpos a la proteína programada de muerte-1 humana (PD-1) son un ejemplo de una macromolécula terapéuticamente relevante que requiere una adecuada formulación. Los anticuerpos anti-PD-1 son clínicamente útiles para el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cáncer de pulmón, melanoma, y cáncer cerebral) y las infecciones virales y enfermedades autoinmunes.

Los anticuerpos anti-PD-1 ejemplares se describen, entre otros, en las Publicaciones de Patente U.S. N°s 7101550, 7595048, 7488802, 7563869, 8168757, 8216996, 20110008369, 20130017199, 20130022595, y en WO2006121168, WO2009114335, WO2012145493, WO2013014668, WO2008101611, EP2262837, y EP2504028. US20140234296 describe formulaciones liofilizadas de un anticuerpo anti-PD-1.

Aunque los anticuerpos anti-PD-1 son conocidos, permanece una necesidad en la técnica por nuevas formulaciones farmacéuticas que comprendan los anticuerpos anti-PD-1 que sean suficientemente estables y adecuados para administración a pacientes.

Breve resumen de la invención

La presente invención satisface la necesidad antes mencionada proporcionando formulaciones farmacéuticas estables que comprenden un anticuerpo humano que se une específicamente a la proteína programada de muerte-1 humana (PD-1).

En un aspecto, se proporciona una formulación farmacéutica líquida estable de baja viscosidad, que comprende: (i) un anticuerpo humano que se une específicamente a la proteína programada de muerte -1 humana (PD-1); (ii) un tampón; (iii) un cosolvente orgánico; (iv) un estabilizador; y (v) un modificador de viscosidad.

En diversas realizaciones, el anticuerpo es proporcionado en una concentración desde aproximadamente 5 ± 0.75 mg/mL a aproximadamente 250 ± 37.5 mg/mL. En una realización, el anticuerpo es proporcionado en una concentración de 12.5 mg/mL ± 1.85 mg/mL o aproximadamente 12.5 mg/mL. En una realización, el anticuerpo es proporcionado en una concentración de 25 mg/mL ± 3.75 mg/mL, o aproximadamente 25 mg/mL. En otra realización, el anticuerpo es proporcionado en una concentración de 50 mg/mL ± 7.5 mg/mL o aproximadamente 50 mg/mL. En otra realización, el anticuerpo es proporcionado en una concentración de 100 mg/mL ± 15 mg/mL o aproximadamente 100 mg/mL. En una realización, el anticuerpo es proporcionado en una concentración de 150 mg/mL ± 22.5 mg/mL o aproximadamente 150 mg/mL. En otra realización, el anticuerpo es proporcionado en una concentración de 175 mg/mL ± 26.25 mg/mL o aproximadamente 175 mg/mL. En otra realización, el anticuerpo es proporcionado en una concentración de 200 mg/mL ± 30 mg/mL o aproximadamente 200 mg/mL.

En ciertas realizaciones, la formulación comprende cualquiera de los anticuerpos anti-PD-1 revelados en la Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos N°: 20150203579 incorporado en este documento en su totalidad. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1

comprende (a) una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada 1, 2 y 3 (HCDR1-HCDR2-HCDR3) cada una comprendiendo una secuencia de SEQ ID N°3, SEQ ID N°4 y SEQ ID N°5; respectivamente; y (b) una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende regiones determinantes de complementariedad 1, 2, y 3 (LCDR1-LCDR2-LCDR3) cada una comprendiendo una secuencia de SEQ ID N°6, SEQ ID N°7 y SEQ ID N°8, respectivamente. En una realización, el anticuerpo comprende un HCVR que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°1 y un LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ IND N°2. En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°9, y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°10. En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°11 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°10. En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de SEQ ID N°9 y 11; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°10. En una realización, el anticuerpo comprende un HCVR que tiene 90% de identidad de secuencia con SEQ ID N°1. En una realización, el anticuerpo comprende un LCVR que tiene 90% de identidad de secuencia con SEQ ID N°2. En una realización, el anticuerpo comprende un HCVR que tiene 90% de identidad de secuencia con SEQ ID N°:1 y un LCVR que tiene un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID N°2.

En una realización, el pH de la formulación líquida es pH 6.0 ± 0.5 , pH 6.0 ± 0.4 , pH 6.0 ± 0.3 , pH 6.0 ± 0.2 , pH 6.0 ± 0.1 , pH 6.0 ± 0.05 , pH 6.0 ± 0.01 o pH 6.0. En una realización, el pH de la formulación líquida es aproximadamente 6.0 ± 0.3 .

En una realización, el tampón comprende histidina. En ciertas realizaciones, el tampón de histidina está en una concentración de desde $5\text{mM} \pm 1\text{ mM}$ a $50\text{ mM} \pm 10\text{mM}$, preferentemente desde $5\text{mM} \pm 1\text{mM}$ a $25\text{mM} \pm 5\text{mM}$. En una realización, el tampón de histidina está en una concentración de $10\text{mM} \pm 2\text{mM}$ o aproximadamente 10mM. En una realización, el tampón de histidina está en una concentración de $20\text{mM} \pm 4\text{ mM}$ o aproximadamente 20mM. En una realización, el tampón de histidina está en una concentración de $40\text{mM} \pm 8\text{mM}$ o aproximadamente 40mM. En ciertas realizaciones, el tampón de histidina comprende L-histidina y monohidrocloreto de L-histidina monohidrato. En una realización, L-histidina está en una concentración de desde $2\text{mM} \pm 0.4\text{mM}$ a $25\text{mM} \pm 5\text{mM}$, preferentemente desde $4\text{mM} \pm 0.8\text{mM}$ a $20\text{mM} \pm 4\text{mM}$. En una realización, el monohidrocloreto de L-histidina monohidrato está en una concentración desde $2\text{mM} \pm 0.4\text{mM}$ a $25\text{mM} \pm 5\text{mM}$, preferentemente desde $4\text{mM} \pm 0.8\text{mM}$ a $20\text{ mM} \pm 4\text{mM}$. En una realización, el tampón comprende L-histidina en una concentración de $4.8\text{mM} \pm 0.96\text{mM}$ y

monohidrocloreto de L-histidina monohidrato en una concentración de $5.2\text{mM} \pm 1.04\text{mM}$. En una realización, el tampón comprende histidina en una concentración de $10\text{mM} \pm 2\text{mM}$, donde la histidina comprende L-histidina en una concentración de $4.8\text{mM} \pm 0.96\text{mM}$ y monohidrocloreto de L-histidina monohidrato en una concentración de $5.2\text{mM} \pm 1.04\text{mM}$.

En ciertas realizaciones, el cosolvente orgánico es un polímero no-iónico que contiene un resto de polioxietileno. En una realización, el solvente orgánico es un surfactante. En algunas realizaciones, el cosolvente orgánico es cualquiera o más de polisorbato, poloxámero 188 y polietilenglicol 3350. En una realización, el cosolvente orgánico es polisorbato 80. En una realización, el cosolvente orgánico es polisorbato 20.

En una realización, el cosolvente orgánico está en una concentración de desde aproximadamente $0.01\% \pm 0.005\%$ a aproximadamente $1\% \pm 0.5\%$ “peso por volumen” o “p/v”, donde, por ejemplo, $0.1\text{ g/ml} = 10\%$ y $0.01\text{ g/ml} = 1\%$. En ciertas realizaciones, el solvente orgánico es polisorbato en una concentración de desde $0.05\% \pm 0.025\%$ a $0.5\% \pm 0.25\%$ (p/v). En una realización, el cosolvente orgánico es polisorbato 80, el cual está en una concentración de $0.2\% \pm 0.1\%$ p/v, o aproximadamente 0.2% . En otra realización, el cosolvente orgánico es polisorbato 80, el cual está en una concentración de $0.1\% \pm 0.05\%$ p/v o aproximadamente 0.1% p/v. En una realización, el cosolvente orgánico es polisorbato 20, el cual está en una concentración de $0.2\% \pm 0.1\%$, o aproximadamente 0.2% . En otra realización, el cosolvente orgánico es polisorbato 20, el cual está en una concentración de $0.1\% \pm 0.05\%$ p/v o aproximadamente 0.1% p/v.

En ciertas realizaciones, el estabilizador es un azúcar. En una realización, el azúcar es sacarosa. En diversas realizaciones, el estabilizador está en una concentración de desde $1\% \pm 0.2\%$ p/v a $20\% \pm 4\%$ p/v, desde $5\% \pm 1\%$ p/v a $15\% \pm 3\%$ p/v, o desde $1\% \pm 0.2\%$ a $10\% \pm 2\%$ p/v. En una realización, el estabilizador es sacarosa en una concentración de $5\% \pm 1\%$ p/v o aproximadamente 5% p/v. En otra realización, el estabilizador es sacarosa en una concentración de $9\% \pm 1.8\%$ p/v o aproximadamente 9% p/v. En otra realización, el estabilizador es sacarosa en una concentración de $10\% \pm 2\%$ p/v o aproximadamente 10% p/v.

En una realización, el modificador de viscosidad es un aminoácido. En una realización, el modificador de viscosidad es L-prolina. En ciertas realizaciones, el modificador de viscosidad está en una concentración de desde $1\% \pm 0.2\%$ a $5\% \pm 1\%$ p/v. En una realización, el modificador de viscosidad es prolina en una concentración de $1.5\% \pm 0.3\%$ o aproximadamente 1.5% . En una realización, el modificador de viscosidad es prolina en una concentración de $3\% \pm 0.6\%$ o aproximadamente 3% .

En ciertas realizaciones, la viscosidad de la formulación farmacéutica líquida a 25°C es menor o igual a aproximadamente 15cPoise $\pm$ 10%. En ciertas realizaciones, la viscosidad a 25°C es entre 1.0cPoise $\pm$ 10% y 20cPoise $\pm$ 10%. En ciertas realizaciones, la viscosidad de la formulación farmacéutica líquida es $\leq$ 15cPoise. En ciertas realizaciones, la viscosidad de la formulación farmacéutica líquida es $\leq$ 20cPoise. En ciertas realizaciones, la viscosidad de la formulación farmacéutica líquida es $\leq$ 10cPoise. En ciertas realizaciones, la viscosidad de 25°C es 5cPoise $\pm$ 10%, 6.0cPoise $\pm$ 10%, 7.0cPoise $\pm$ 10%, 7.1cPoise $\pm$ 10%, 7.2cPoise $\pm$ 10%, 7.9cPoise $\pm$ 10%, 8.3cPoise $\pm$ 10%, 9.0cPpoise $\pm$ 10%, 0.6cPoise $\pm$ 10%, 10.0cPoise $\pm$ 10%, 10.6cPoise $\pm$ 10%, 11.4cPoise $\pm$ 10%, 11.6cPoise $\pm$ 10%, 11.8cPoise $\pm$ 10%, 12.0cPoise $\pm$ 10%, 13.0cPoise $\pm$ 10%, 14.0cPoise $\pm$ 10%, 15.0cPoise $\pm$ 10% o 16cPoise $\pm$ 10%.

En un aspecto, se proporciona una formulación farmacéutica líquida estable de baja viscosidad, que comprende: (i) de 5 ± 0.75 mg/ml a 250 ± 37.5 mg/ml de un anticuerpo humano que se une específicamente a PD-1 humana; (ii) de 0 mM a 40 ± 8 mM de tampón de histidina; (iii) de 0% a $0.5\% \pm 0.25\%$ (p/v) de polisorbato 80; (iv) de 0% a $15\% \pm 3\%$ (p/v) de sacarosa; y (v) de 0 a $5\% \pm 1\%$ de prolina, a un pH de aproximadamente 5.3 a aproximadamente 6.7; donde el anticuerpo anti-PD-1 comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región variable de cadena ligera (LCVR) de manera que la combinación HCVR/LCVR comprende regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada y ligera (HCDR1-HCDR2-HCDR3/LCDR1-LCDR2-LCDR3), que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°s: 3-4-5 / SEQ ID N°s: 6-7-8, respectivamente. En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) y una región variable de cadena ligera (LCVR) que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°1 y SEQ ID N°2, respectivamente. En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD1 comprende una región Fc elegida del grupo que consiste en los isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanos. En una realización, el anticuerpo comprende un isotipo IgG4 humano. En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°9 y 11; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°10. En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°10. En una realización, el anticuerpo comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°11 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°10. En una realización, el anticuerpo tiene un peso molecular de 143 kDa $\pm$ 5kDa.

En ciertas realizaciones, se proporciona una formulación farmacéutica líquida estable de baja viscosidad, que comprende: (i) de 5 ± 0.75 mg/ml a 250 ± 37.5 mg/ml de un anticuerpo humano que se une específicamente a PD-1 humana; (ii) de 0 mM a 40 ± 8 mM de tampón de

histidina; (iii) de 0% a 0.5% $\pm$ 0.25% (p/v) de polisorbato 80; (iv) de 0% a 15% $\pm$ 3% (p/v) de sacarosa; y (v) de 0 a 5% $\pm$ 1% de prolina, a un pH de aproximadamente 5.3 a aproximadamente 6.7; donde el anticuerpo anti-PD-1 comprende un HCVR y un LCVR, donde el HCVR tiene 90% de identidad de secuencia con la SEQ ID N°1 y/o el LCVR tiene un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID N°2. En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende un HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°1 y un LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°2. En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N°9 y 11; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°10.

En ciertas realizaciones, se proporciona una formulación farmacéutica líquida estable de baja viscosidad, que comprende: (i) de 5 $\pm$ 0.75 mg/ml a 250 $\pm$ 37.5 mg/ml de un anticuerpo humano que se une específicamente a la PD-1 humana; (ii) de 0 mM a 40 $\pm$ 8 mM de tampón de histidina; (iii) de 0% a 0.5% $\pm$ 0.25% (p/v) de polisorbato 80; (iv) de 0% a 15% $\pm$ 3% (p/v) de sacarosa; y (v) de 0 a 5% $\pm$ 1% de prolina, a un pH de aproximadamente 5.3 a aproximadamente 6.7; donde el anticuerpo anti-PD-1 comprende un HCVR y un LCVR, donde el HCVR comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°1 que no tiene más de cinco sustituciones de aminoácidos, y donde el LCVR comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°2 que no tiene más de dos sustituciones de aminoácidos. En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende un HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°1 y un LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°2. En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID N° 9 y 11; y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°10.

En ciertas realizaciones, la formulación de cualquiera de los aspectos anteriores tiene un atributo seleccionado del grupo que consiste de: (i) la formulación es estable al almacenamiento a largo plazo a 25°C, 5°C, -20°C, -30°C y -80°C, como se describe en este documento; (ii) la formulación es estable al estrés de agitación como se describe en este documento; (iii) la formulación es de baja viscosidad (viscosidad inferior a 20 cPoise, preferentemente inferior a 15 cPoise); (iii) la formulación es estable incluso con una variación de hasta $\pm$ 50% en las concentraciones de excipiente de formulación, como se describe en este documento; (iv) la formulación es iso-osmolar a condiciones fisiológicas; (v) la formulación es estable y compatible con los dispositivos y procedimientos de administración intravenosa; y (vi) la formulación es estable al almacenamiento a largo plazo en un frasco de vidrio o en una jeringa precargada.

En ciertas realizaciones de este aspecto, se proporciona una formulación líquida estable, que comprende: (i) de 5 ± 0.75 mg/ml a 250 ± 37.5 mg/ml de un anticuerpo humano que se une específicamente a la PD-1 humana; (ii) de $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ a $20 \pm 4 \text{ mM}$ de tampón de histidina; (iii) de $0.05\% \pm 0.025\%$ a $0.3\% \pm 0.15\%$ (p/v) de polisorbato 80; (iv) de $1\% \pm 0.2\%$ a $10\% \pm 2\%$ (p/v) sacarosa; y (v) de $1\% \pm 0.2\%$ a $5\% \pm 1\%$ de prolina, a un pH de aproximadamente 6.0, donde el anticuerpo comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°s 1/2. En una realización, la formulación líquida estable de este aspecto tiene una viscosidad inferior a 15 cP. En una realización, $\geq 90\%$ de los anticuerpos tienen un peso molecular de $143 \text{ kDa} \pm 1 \text{ kDa}$. En una realización, la formulación farmacéutica tiene una viscosidad de menos de 20 cP, menos de 15 cP o menos de 10 cP. En una realización, más del 96% de los anticuerpos tiene una conformación nativa tras el almacenamiento durante 12 meses a 5°C . En una realización, al menos 97% o más de los anticuerpos tiene conformación nativa tras el almacenamiento a -80°C , -30°C y/o -20°C durante 6 meses.

En una realización de este aspecto, la formulación líquida estable comprende (i) 25 ± 3.75 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1; (ii) $10 \pm 2 \text{ mM}$ de tampón de histidina; (iii) $0.2\% \pm 0.1\%$ (p/v) polisorbato 80; (iv) $1.5\% \pm 0.3\%$ (p/v) prolina; y (v) $5\% \pm 1\%$ (p/v) sacarosa a un pH de 6.0 ± 0.3 , donde el anticuerpo comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencias de aminoácidos de la SEQ ID N° 1/2.

En una realización de este aspecto, la formulación líquida estable comprende (i) 25 ± 3.75 mg/ml de un anticuerpo anti-PD-1; (ii) $4.8 \text{ mM} \pm 0.96 \text{ mM}$ L-histidina; (iii) $5.2 \text{ mM} \pm 1.04 \text{ mM}$ monohidrócloruro de L-histidina monohidrato; (iv) $0.2\% \pm 0.1\%$ (p/v) de polisorbato 80; (v) $1.5\% \pm 0.3\%$ (p/v) de prolina; y (vi) $5\% \pm 1\%$ (p/v) de sacarosa, a un pH de 6.0 ± 0.3 , donde el anticuerpo comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°s 1/2.

En una realización de este aspecto, la formulación líquida estable comprende (i) 50 ± 7.5 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1; (ii) $10 \pm 2 \text{ mM}$ tampón de histidina; (iii) $0.2\% \pm 0.1\%$ (p/v) polisorbato 80; (iv) $1.5\% \pm 0.3\%$ (p/v) prolina; y (v) $5\% \pm 1\%$ sacarosa, a un pH de 6.0 ± 0.3 , donde el anticuerpo comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°s 1/2. En una realización de esta formulación particular, la viscosidad es de menos de 10 cPoise.

En una realización de este aspecto, la formulación líquida estable comprende (i) 50 ± 7.5 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1; (ii) $4.8 \text{ mM} \pm 0.96 \text{ mM}$ L-histidina; (iii) $5.2 \text{ mM} \pm 1.04 \text{ mM}$ monohidrócloruro de L-histidina monohidrato; (iv) $0.2\% \pm 0.1\%$ (p/v) polisorbato 80; (v) $1.5\% \pm 0.3\%$ (p/v) prolina; y (vi) $5\% \pm 1\%$ (p/v) sacarosa a un pH de 6.0 ± 0.3 , donde el anticuerpo

comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s 1/2.

En una realización, la formulación líquida estable comprende (i) 100 ± 15 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1; (ii) 10 ± 2 mM de tampón de histidina; (iii) $0.2\% \pm 0.1\%$ (p/v) polisorbato 80; (iv) $1.5\% \pm 0.3\%$ (p/v) de prolina; y (v) $5\% \pm 1\%$ (p/v) de sacarosa, a un pH de 6.0 ± 0.3 , donde el anticuerpo comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°s: 1/2. En una realización de esta formulación particular, la viscosidad es de menos de 10 cPoise.

En una realización de este aspecto, la formulación líquida estable comprende (i) 100 ± 15 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1; (ii) $4.8 \text{ mM} \pm 0.96 \text{ mM}$ L-histidina; (iii) $5.2 \text{ mM} \pm 1.04 \text{ mM}$ monohidrocloreto L-histidina monohidrato; (iv) $0.2\% \pm 0.1\%$ (p/v) de polisorbato 80; (v) $1.5\% \pm 0.3\%$ (p/v) de prolina; y (vi) $5\% \pm 1\%$ (p/v) de sacarosa, a un pH de 6.0 ± 0.3 , donde el anticuerpo comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s 1/2.

En una realización, la formulación líquida estable comprende (i) 150 ± 22.5 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1; (ii) 10 ± 2 mM de tampón de histidina ; (iii) $0.2\% \pm 0.1\%$ (p/v) polisorbato 80; (iv) $10\% \pm 2\%$ sacarosa; y (v) $1.5\% \pm 0.3\%$ (p/v) prolina, a un pH de 6.0 ± 0.3 , donde el anticuerpo comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s 1/2. En una realización de esta formulación particular, la viscosidad es de menos de 20 cPoise, preferentemente menos de 15 cPoise.

En una realización de este aspecto, la formulación líquida estable comprende (i) 150 ± 22.5 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1; (ii) $4.8 \text{ mM} \pm 0.96 \text{ mM}$ L-histidina; (iii) $5.2 \text{ mM} \pm 1.04 \text{ mM}$ monohidrocloreto L-histidina monohidrato; (iv) $0.2\% \pm 0.1\%$ (p/v) polisorbato 80; (v) $1.5\% \pm 0.3\%$ (p/v) prolina; y (vi) $5\% \pm 1\%$ sacarosa; a un pH de 6.0 ± 0.3 , donde el anticuerpo comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s 1/2.

En una realización, la formulación líquida estable comprende (i) 175 ± 26.25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1; (ii) 10 ± 2 mM de tampón de histidina ; (iii) $0.2\% \pm 0.1\%$ (p/v) polisorbato 80; (iv) $5\% \pm 1\%$ sacarosa; y (v) $1.5\% \pm 0.3\%$ (p/v) prolina, a un pH de 6.0 ± 0.3 , donde el anticuerpo comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s 1/2. En una realización de esta formulación particular, la viscosidad es de menos de 20 cPoise, preferentemente menos de 15 cPoise.

En una realización de este aspecto, la formulación líquida estable comprende (i) 175 ± 26.25 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1; (ii) $4.8\text{mM} \pm 0.96$ mL L-histidina; (iii) $5.2 \text{ mM} \pm 1.04 \text{ mM}$ monohidrócloruro L-histidina monohidrato; (iv) $0.2\% \pm 0.1\%$ (p/v) polisorbato 80; (v) $1.5\% \pm 0.3\%$ (p/v) prolina; y (vi) $5\% \pm 1\%$ sacarosa; a un pH de 6.0 ± 0.3 , donde el anticuerpo comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s 1/2.

En una realización de este aspecto, la formulación líquida estable comprende (i) 200 ± 30.00 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1; (ii) $10 \pm 2 \text{ mM}$ de tampón de histidina ; (iii) $0.2\% \pm 0.1\%$ (p/v) polisorbato 80; (iv) $5\% \pm 1\%$ sacarosa; y (v) $1.5\% \pm 0.3\%$ (p/v) prolina, a un pH de 6.0 ± 0.3 , donde el anticuerpo comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s 1/2. En una realización de esta formulación particular, la viscosidad es de menos de 20 cPoise.

En una realización de este aspecto, la formulación líquida estable comprende (i) 200 ± 30.00 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1; (ii) $4.8\text{mM} \pm 0.96 \text{ mL}$ L-histidina; (iii) $5.2 \text{ mM} \pm 1.04 \text{ mM}$ monohidrócloruro L-histidina monohidrato; (iv) $0.2\% \pm 0.1\%$ (p/v) polisorbato 80; (v) $1.5\% \pm 0.3\%$ (p/v) prolina; y (vi) $5\% \pm 1\%$ sacarosa; a un pH de 6.0 ± 0.3 , donde el anticuerpo comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°s 1/2.

En una realización, después del almacenamiento de la formulación a 45° durante 28 días, $\geq 90\%$ del anticuerpo es nativo y $\geq 35\%$ del anticuerpo es de la forma de carga principal. En una realización, después del almacenamiento de la formulación a 25° durante tres meses, $> 94\%$ del anticuerpo es nativo y $\geq 44\%$ del anticuerpo es de la forma de carga principal. En una realización, después del almacenamiento de la formulación a 5° durante 12 meses, $> 96\%$ del anticuerpo es nativo y $> 50\%$ del anticuerpo es de la forma de carga principal. En una realización, después del almacenamiento de la formulación a -20° durante 12 meses, $> 96\%$ del anticuerpo es nativo y $> 40\%$ del anticuerpo es de la forma de carga principal. En una realización, después del almacenamiento de la formulación a -30° durante 12 meses, $> 96\%$ del anticuerpo es nativo y $> 40\%$ del anticuerpo es de la forma de carga principal. En una realización, después del almacenamiento de la formulación a -80° durante 12 meses, $> 96\%$ del anticuerpo es nativo y $> 40\%$ del anticuerpo es de la forma de carga principal. En una realización, más del 96% de los anticuerpos tienen conformación nativa tras el almacenamiento durante 12 meses a 5°C . En una realización, al menos el 97% o más de los anticuerpos tienen conformación nativa tras el almacenamiento a -80°C , -30°C y/o -20°C durante 6 meses.

En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación líquida estable que comprende: (i) hasta 100 mg/mL de un anticuerpo anti-PD-1; (ii) desde $2 \text{ mM} \pm 0.4 \text{ mM}$ a 20 mM

± 4 mM de tampón de histidina; (iii) hasta $20\% \pm 4\%$ (p/v) de sacarosa; y (iv) hasta $0.2\% \pm 0.1\%$ p/v de polisorbato, a pH 6.0 ± 0.3 . En una realización, la formulación líquida estable comprende 25 mg/ml de anticuerpo anti-PD-1. En una realización, la formulación líquida estable comprende 50 mg/ml de anticuerpo anti-PD-1. En una realización, la formulación líquida estable comprende 75 mg/ml de anticuerpo anti-PD-1. En una realización, la formulación líquida estable comprende $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ de tampón de histidina. En una realización, la formulación líquida estable comprende 5% de sacarosa. En una realización, la formulación líquida estable comprende 6% de sacarosa. En una realización, la formulación líquida estable comprende 9% de sacarosa. En una realización, la formulación líquida estable comprende 10% de sacarosa. En una realización, la formulación líquida estable comprende 0.1% de polisorbato. En una realización, el polisorbato es polisorbato 80 o polisorbato 20. En una realización, el anticuerpo anti-PD-1 comprende un HCVR/LCVR de SEQ ID N°s 1/2.

En un aspecto, se proporciona una formulación farmacéutica líquida estable de cualquiera de los aspectos anteriores en un contenedor. En una realización, el contenedor es un frasco de policarbonato. En una realización, el contenedor es un frasco de vidrio. En una realización, el frasco de vidrio es un frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 con un tapón de goma de butilo recubierto de fluorocarbono. En una realización, el contenedor es un microinfusor. En una realización, el contenedor es una jeringa. En una realización, el contenedor es una jeringa precargada. En una realización, la jeringa comprende un émbolo recubierto de fluorocarbono. En ciertas realizaciones, la jeringa es una jeringa de vidrio de 1 ml o 2.25 ml de largo que contiene menos de aproximadamente 500 partes por billón de tungsteno equipada con una aguja de 27 G, un tapón de goma de butilo recubierto de fluorocarbono y una tapa con punta de goma no citotóxica y sin látex. En una realización, la jeringa es una jeringa de vidrio de 1 ml de largo equipada con una aguja de pared delgada de 27 G, un tapón de goma 4023/50 recubierto con FLUROTEC y una tapa con punta de goma FM 27. En una realización, la jeringa es una jeringa de plástico de 1 mL, 2 mL, 3 mL, 5 mL ó 10 mL equipada con una aguja.

En un aspecto, se proporciona un kit que comprende una composición farmacéutica estable de cualquiera de los aspectos anteriores, un contenedor e instrucciones. En una realización, el contenedor es un frasco de vidrio. En una realización, el contenedor es una jeringa precargada. En una realización, la jeringa es una jeringa de vidrio de 1 ml o 2.25 ml de largo equipada con una aguja de pared delgada de 27 G, un tapón de goma 4023/50 recubierto con FLUROTEC y una tapa con punta de goma FM 27. En una realización, la jeringa es una jeringa de plástico de 1 mL, 2 mL, 3 mL, 5 mL ó 10 mL, equipada con una aguja.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una jeringa precargada que comprende una formulación farmacéutica líquida estable que comprende: (i) de 5 ± 0.75 mg/ml a 250 ± 37.5 mg/ml de un anticuerpo humano que se une específicamente a PD-1 humana; (ii) de 5 mM ± 1 mM a 20 ± 4 mM de tampón de histidina; (iii) de $0.05\% \pm 0.025\%$ a $0.3\% \pm 0.15\%$ (p/v) de polisorbato 80; (iv) de $1\% \pm 0.2\%$ a $10\% \pm 2\%$ (p/v) sacarosa; y (v) de $1\% \pm 0.2\%$ a $5\% \pm 1\%$ de prolina, a un pH de 6.0 ± 0.3 , donde el anticuerpo comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°s 1/2; donde la formulación tiene un atributo seleccionado del grupo que consiste en: (i) $\geq 98\%$ del anticuerpo está en forma nativa después del almacenamiento a 5°C durante 12 meses; (ii) $\geq 53\%$ del anticuerpo es la variante de carga principal después del almacenamiento a 5°C durante 12 meses; (iii) $\geq 97\%$ del anticuerpo está en forma nativa después del almacenamiento a 25°C durante 6 meses; (iv) la formulación es estable al estrés de agitación donde $\geq 98\%$ del anticuerpo está en forma nativa después de 120 minutos de estrés de agitación en la jeringa precargada; (v) más del 90% de los anticuerpos tienen un peso molecular de $143 \text{ kDa} \pm 1 \text{ kDa}$; (vi) la formulación farmacéutica tiene una viscosidad de menos de 20 cP, menos de 15 cP o menos de 10 cP; (vii) más del 96% de los anticuerpos tienen conformación nativa tras el almacenamiento durante 12 meses a 5°C ; y (viii) al menos el 97% o más de los anticuerpos tienen conformación nativa tras el almacenamiento a -80°C , -30°C y/o -20°C durante 6 meses.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un frasco de vidrio que comprende una formulación farmacéutica líquida estable que comprende: (i) de 5 ± 0.75 mg/ml a 250 ± 37.5 mg/ml de un anticuerpo humano que se une específicamente a PD-1 humana; (ii) de 5 mM ± 1 mM a 20 ± 4 mM de tampón de histidina; (iii) de $0.05\% \pm 0.025\%$ a $0.3\% \pm 0.15\%$ (p/v) de polisorbato 80; (iv) de $1\% \pm 0.2\%$ a $10\% \pm 2\%$ (p/v) sacarosa; y (v) de $1\% \pm 0.2\%$ a $5\% \pm 1\%$ de prolina, a un pH de 6.0 ± 0.3 , donde el anticuerpo comprende un HCVR/LCVR que comprende un par de secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°s 1/2; donde la formulación tiene un atributo seleccionado del grupo que consiste en: (i) la formulación es estable al almacenamiento y al estrés en un frasco de vidrio; (ii) la formulación es estable y compatible para su uso en dispositivos de administración IV; (iii) la formulación es química y físicamente estable a la dilución con diluyentes estándar conocidos en la técnica (por ejemplo, cloruro de sodio al 0,9% o dextrosa al 5%); (iv) la formulación es estable a bolsas IV hechas de vidrio o plásticos poliméricos (por ejemplo, cloruro de polivinilo, ftalatos, poliolefinas o polipropileno); (v) la formulación es compatible con bombas de infusión estándar (por ejemplo, bomba peristáltica, bomba de desplazamiento de fluido); (vi) $\geq 90\%$ de los anticuerpos tienen un peso molecular de $143 \text{ kDa} \pm 1 \text{ kDa}$; (vii) la formulación farmacéutica tiene una viscosidad de menos de 20 cP, menos de 15 cP o menos de 10 cP; (viii) más del 96% de los anticuerpos tienen conformación nativa tras el almacenamiento durante 12 meses a 5°C ; y (ix) al menos el 97% o más de los anticuerpos tienen conformación nativa tras el almacenamiento a -80°C , -30°C y/o -20°C durante 6 meses.

Otras realizaciones serán evidentes a partir de la revisión de la siguiente descripción detallada.

Breve descripción de las Figuras

Figura 1 es una tabla que muestra el efecto del pH en la estabilidad de 150 mg/mL de mAb1 incubado a 45°C durante 28 días. Los resultados del “Material Inicial” ^aSE-UPLC y CEX-UPLC son los valores promedio del material inicial para todas las formulaciones.

Figura 2 muestra la estabilidad de almacenamiento para las tres formulaciones F1, F2 y F3, donde F1 comprende 210 mg/mL mAb1, 10mM de histidina y 3% prolina, a un pH de 6.0; F2 comprende 210 mg/mL mAb1, 10mM de histidina y 3% de sacarosa a un pH de 6.0; y F3 comprende 210 mg/mL mAb1, 10 mM de histidina y 5% sacarosa, a un pH de 6.0. La estabilidad de almacenamiento se mide por % de especies de alto peso molecular (HMW) generadas tras el almacenamiento a -80°C (**A**), -30°C (**B**) y -20°C (**C**) hasta 9 meses y analizados mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Figura 3 muestra la estabilidad de almacenamiento de tres formulaciones F1, F2 y F3, donde F1 comprende 150 mg/mL mAb1, 10mM de histidina, 9% de sacarosa y 0.2% de polisorbato 80 (PS80) a un pH de 6.0; F2 comprende 175 mg/mL de mAb1, 10 mM histidina, 3% prolina y 0.2% PS80, a un pH de 6.0; y F3 comprende 175 mg/mL de mAb1, 10mM de histidina, 5% sacarosa, 1.5% de prolina y 0.2% de PS80, a un pH de 6.0. La estabilidad de almacenamiento se mide por % de especies de alto peso molecular (HMW) generadas tras el almacenamiento a -80°C (**A**), -30°C (**B**) y -20°C (**C**) hasta 6 meses y analizados mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC).

Figura 4 es una tabla que muestra la viscosidad de 150 mg/mL de mAb1 con la adición de excipientes y modificadores de viscosidad.

Figura 5 es una tabla que muestra el efecto de los modificadores de viscosidad en la estabilidad de 175 mg/mL de mAb1 incubado a 45°C durante 14 días. Los resultados del “Material Inicial” ^apH, SE-UPLC y CEX-UPLC son los valores promedio del material inicial para todas las formulaciones.

Descripción Detallada

Antes de describir los métodos presentes, se debe entender que esta invención no está limitada a métodos en particular, y las condiciones experimentales descritas, dado que dichos métodos y condiciones pueden variar. También se debe entender que la terminología usada en este documento es para fines de describir sólo realizaciones en particular, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención estará limitado sólo por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que el entendido comúnmente por un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Como se usa en este documento, el término “aproximadamente”, cuando se usa en referencia a un valor número en particular o un rango de valores, significa que el valor puede variar del valor recitado por no más del 1%. Por ejemplo, como se usa en este documento, la expresión “aproximadamente 100” incluye 99 y 101 y todos los valores entre medio (por ejemplo, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, etc.). Aunque cualquier método y materiales similares o equivalentes a aquellos descritos en este documento pueden ser usados en la práctica o pruebas de la presente invención, los métodos y materiales preferidos se describen ahora. Todas las publicaciones mencionadas en este documento son incorporadas por referencia en su totalidad.

Como se usa en este documento, la expresión “formulación farmacéutica” significa una combinación de al menos un ingrediente activo (por ejemplo, una pequeña molécula, macromolécula, compuesto, etc. que sea capaz de ejercer un efecto biológico en un humano o animal no humano), y al menos un ingrediente inactivo que, cuando se combina con el ingrediente activo o uno o más de ingredientes inactivos adicionales, es adecuado para administración terapéutica a un humano o animal no humano. El término “formulación”, como se usa en este documento, significa “formulación farmacéutica” a menos que se especifique lo contrario. La presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un polipéptido terapéutico. De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, el polipéptido terapéutico es un anticuerpo, o un fragmento de unión al antígeno de los mismos, el cual se une específicamente a la proteína programada de muerte-1 humana (PD-1). Más específicamente, la presente invención incluye formulaciones farmacéuticas que comprenden: (i) un anticuerpo humano que se une específicamente a un PD-1 humano; (ii) un tampón de histidina; (iii) un cosolvente orgánico que es un surfactante no iónico; (iv) un estabilizador que es un carbohidrato; y, opcionalmente, (v) un modificador de viscosidad que es un aminoácido. Los componentes y formulaciones ejemplares específicas incluidas dentro de la presente invención se describen en detalle a continuación.

Anticuerpos que se unen específicamente a PD-1

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender un anticuerpo humano, o un fragmento de unión al antígeno de los mismos, que une específicamente a PD-1 humano. Como se usa en este documento, el término “PD-1” significa proteína programada de muerte-1 humana (PD-1). Los anticuerpos al PD-1 humano son descritos en, por ejemplo, la Publicación de Patente de los Estados Unidos Nos. 8008449, 8168757, 20110008369, 20130017199, 20130022595, 20150203579, y en WO2006121168, WO20091154335, WO2012145493, WO2013014668, WO2009101611, WO2015112800, EP2262837, y EP2504028.

El término “anticuerpo”, como se usa en este documento, se refiere generalmente a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas de polipéptidos, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por enlaces de disulfuro, como también multímeros de los mismos (por ejemplo, IgM); sin embargo, las moléculas de inmunoglobulina que consisten de sólo cadenas pesadas (es decir, que carecen de cadenas ligeras) también son abarcados dentro de la definición del término “anticuerpo”. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en este documento como HCVR o V_H) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en este documento como LCVR o V_L) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (CL1). Las regiones V_H y V_L pueden además ser subdivididas en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes complementarias (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada V_H y V_L está compuesta de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al término carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

A menos que se especifique lo contrario, se entiende que el término “anticuerpo”, como se usa en este documento, comprenderá moléculas de anticuerpos completas como también fragmentos de unión al antígeno de los mismos. El término “porción de unión al antígeno” o “fragmento de unión al antígeno” de un anticuerpo (o simplemente “porción de anticuerpo” o “fragmento de anticuerpo”), como se usa en este documento, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retiene la capacidad de unir específicamente a un PD-1 humano o un epítipo de los mismos.

Un “anticuerpo aislado”, como se usa en este documento, se refiere a un anticuerpo que es sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen diferentes especificidades antigénicas (por ejemplo, un anticuerpo aislado que se une específicamente a un PD-1 humano es sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos al PD-1 humano).

El término “une específicamente” o similar, significa que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de los mismos forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable bajo condiciones fisiológicas. La unión específica se puede caracterizar por una disociación constante de al menos aproximadamente 1×10^{-8} o superior. Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio, resonancia de plasmón de superficie, y similares. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a PD-1 humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, como moléculas de PD-1 de otras especies (ortólogos). En el contexto de la presente invención, anticuerpos multi-específicos (por ejemplo, bi-específicos) que se unen a PD-1 humano como también uno o más antígenos adicionales se consideran que se “unen específicamente” a PD-1 humano. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otro material celular o productos químicos.

Anticuerpos PD-1 anti-humanos ejemplares que pueden ser incluidos en las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se establecen en las publicaciones de solicitud de patentes US20150203579, y WO2015112800, cuyas revelaciones se incorporan por referencia en su totalidad.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, un anticuerpo PD-1 anti-humano, o fragmento de unión al antígeno de los mismos, comprende una región determinante complementaria de cadena pesada (HCDR) 1 de SEQ ID N°3, un HCDR2 de SEQ ID N°4, y un HCDR3 de SEQ ID N° 5. En ciertas realizaciones, el anticuerpo PD-1 anti-humano o fragmento de unión de al antígeno de los mismos, comprende un HCVR de SEQ ID N°1.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, un anticuerpo PD-1 anti-humano, o fragmento de unión al antígeno de los mismos, comprende una región determinante complementaria de cadena ligera (LCDR) 1 de SEQ ID N°6, un LCDR2 de SEQ ID N°7, y un LCDR3 de SEQ ID N° 8. En ciertas realizaciones, el anticuerpo PD-1 anti-humano o fragmento de unión de al antígeno de los mismos, comprende un LCVR de SEQ ID N°2.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, el PD-1 anti-humano o fragmento de unión al antígeno de los mismos, comprende un HCVR que tiene 90%, 95%, 98% ó 99% de identidad de secuencia a SEQ ID N°1.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, el PD-1 anti-humano o fragmento de unión al antígeno de los mismos, comprende un LCVR que tiene 90%, 95%, 98% ó 99% de identidad de secuencia a SEQ ID N°2.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, el PD-1 anti-humano o fragmento de unión al antígeno de los mismos, comprende un HCVR que comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 1, teniendo no más de 5 sustituciones de aminoácidos.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, el PD-1 anti-humano o fragmento de unión al antígeno de los mismos, comprende un LCVR que comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 2, teniendo no más de 2 sustituciones de aminoácidos.

La identidad de secuencia puede ser medida por un método conocido en la técnica (por ejemplo, GAP, BESTFIT, y BLAST).

La presente invención también incluye formulaciones que comprenden anticuerpos anti-PD-1, donde los anticuerpos anti-PD-1 comprenden variantes de cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR reveladas en este documento que tienen una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos. Por ejemplo, la presente invención incluye formulaciones que comprenden anticuerpos anti-PD-1 que tienen secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR con, por ejemplo, 10 o menos, 8 o menos, 6 o menos, 4 o menos, etc., de sustituciones conservadoras de aminoácidos respecto a cualquiera de las secuencias de aminoácidos de HCVR, LCVR y/o CDR reveladas en este documento.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende una región Fc elegida del grupo que consiste de isotipos IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 humanos.

El anticuerpo ejemplar, no limitante usado en los Ejemplos en este documento es referido como “mAb1”. Este anticuerpo también es referido en US20150203579 como H2M7798N o H4H7798N, y también es conocido como “REGN2810” o “cemiplimab”. mAb1 (H4H7798N) comprende un par de secuencias de aminoácidos HCVR/LCVR que tiene SEQ ID N°1/2, y los dominios HCDR1-HCDR2-HCDR3 / LCDR1-LCDR2-LCDR3 representados por SEQ ID N°s 3-4-5 / SEQ ID N°s 6-7-8.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, el PD-1 anti-humano o fragmento de unión al antígeno de los mismos, comprende una cadena pesada de SEQ ID N° 9 y una cadena ligera de SEQ ID N° 10.

Es bien sabido en la técnica que la escisión terminal de aminoácidos puede ocurrir durante la producción de anticuerpos (véase, por ejemplo, Wang *et al.*, 2007, J. Pharma. Sci 96: 1-26). En

consecuencia, en ciertas realizaciones, el anticuerpo anti-PD-1 comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 11. La SEQ ID N° 11 comprende la secuencia de aminoácido de cadena pesada donde la lisina C-terminal está ausente de la secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 9. En ciertas realizaciones, las formulaciones de la presente revelación contienen aproximadamente 50%, aproximadamente 60%, aproximadamente 70%, aproximadamente 80%, aproximadamente 90%, aproximadamente 95%, aproximadamente 98% o más del anticuerpo anti-PD-1 donde la lisina de C-terminal está ausente.

La cantidad de anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de los mismos, contenidos dentro de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo en las propiedades específicas deseadas de las formulaciones, como también en las circunstancias y fines particulares para los cuales las formulaciones están destinadas a ser usadas. En ciertas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas son formulaciones líquidas que pueden contener 5 ± 0.75 mg/mL a 250 ± 37.5 mg/mL de anticuerpo; 10 ± 1.5 mg/mL a 240 ± 36 mg/mL de anticuerpo; 20 ± 3.0 mg/mL a 230 ± 34.5 mg/mL de anticuerpo; 25 ± 3.75 mg/mL a 240 ± 36 mg/mL de anticuerpo; 50 ± 7.5 mg/mL a 230 ± 34.5 mg/mL de anticuerpo; 60 ± 9 mg/mL a 240 ± 36 mg/mL de anticuerpo; 70 ± 10.5 mg/mL a 230 ± 34.5 mg/mL de anticuerpo; 100 ± 15 mg/mL a 200 ± 30 mg/mL de anticuerpo; 110 ± 16.5 mg/mL a 190 ± 28.5 mg/mL de anticuerpo; 120 ± 18 mg/mL a 180 ± 27 mg/mL de anticuerpo; 130 ± 19.5 mg/mL a 170 ± 25.5 mg/mL de anticuerpo; 140 ± 21 mg/mL a 160 ± 24 mg/mL de anticuerpo; 150 ± 22.5 mg/mL de anticuerpo; o 175 ± 26.25 mg/mL. Por ejemplo, las formulaciones de la presente invención pueden comprender aproximadamente 5 mg/mL; aproximadamente 10 mg/mL, aproximadamente 15 mg/mL, aproximadamente 20 mg/mL; aproximadamente 25 mg/mL; aproximadamente 30 mg/mL; aproximadamente 35 mg/mL, aproximadamente 40 mg/mL, aproximadamente 45 mg/mL; aproximadamente 50 mg/mL; aproximadamente 55 mg/mL; aproximadamente 60 mg/mL, aproximadamente 65 mg/mL, aproximadamente 70 mg/mL; aproximadamente 75 mg/mL; aproximadamente 80 mg/mL; aproximadamente 85 mg/mL, aproximadamente 90 mg/mL, aproximadamente 95 mg/mL; aproximadamente 100 mg/mL; aproximadamente 105 mg/mL, aproximadamente 110 mg/mL; aproximadamente 115 mg/mL; aproximadamente 120 mg/mL; aproximadamente 125 mg/mL, aproximadamente 130 mg/mL, aproximadamente 135 mg/mL; aproximadamente 140 mg/mL; aproximadamente 145 mg/mL; aproximadamente 150 mg/mL, aproximadamente 155 mg/mL; aproximadamente 160 mg/mL, aproximadamente 165 mg/mL; aproximadamente 170 mg/mL; aproximadamente 175 mg/mL; aproximadamente 180 mg/mL; aproximadamente 185 mg/mL, aproximadamente 190 mg/mL, aproximadamente 195 mg/mL; aproximadamente 200 mg/mL; aproximadamente 205 mg/mL; aproximadamente 210 mg/mL, aproximadamente 215 mg/mL, aproximadamente 220 mg/mL; aproximadamente 225 mg/mL; aproximadamente 230 mg/mL; aproximadamente 235 mg/mL, aproximadamente 240 mg/mL,

aproximadamente 245 mg/mL; o aproximadamente 250 mg/mL de un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno de los mismos, que une específicamente a PD-1 humano.

Excipientes y pH

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención comprenden uno o más excipientes. El término “excipiente” como se usa en este documento, significa cualquier agente no terapéutico agregado a la formulación para proporcionar una consistencia, viscosidad o efecto estabilizador deseado.

En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica de la invención comprende al menos un cosolvente orgánico en un tipo y en una cantidad que estabiliza el anticuerpo PD-1 humano bajo condiciones de manipulación brusca o agitación, como, por ejemplo, vórtice. En algunas realizaciones, lo que se entiende por “estabilizar” es la prevención de la formación de más de 3% de anticuerpo agregado de la cantidad total de anticuerpo (en una base molar) en el transcurso de una manipulación brusca. En algunas realizaciones, la manipulación brusca es agitar una solución que contiene el anticuerpo y el cosolvente orgánico durante aproximadamente 60 minutos o aproximadamente 120 minutos.

En ciertas realizaciones, el cosolvente orgánico es un surfactante no-iónico, como un alquil poli (óxido de etileno). Surfactantes no iónicos específicos que pueden ser incluidos en las formulaciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, polisorbatos como polisorbato 20, polisorbato 28, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 81, y polisorbato 85; poloxámeros como poloxámero 181, poloxámero 188, poloxámero 407; o polietilenglicol (PEG). El polisorbato 20 también es conocido como TWEEN 20, monolaurato de sorbitán y monolaurato de polioxietilenosorbitán. El poloxámero 188 también es conocido como PLURONIC F68.

La cantidad de surfactante no iónico contenido dentro de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden variar dependiendo en las propiedades específicas deseadas de la formulación, como también las circunstancias y fines particulares para los cuales las formulaciones están destinadas a ser usadas. En ciertas realizaciones, las formulaciones pueden contener 0.01% $\pm$ 0.005% a 0.5% $\pm$ 0.25% de surfactante. Por ejemplo, las formulaciones de la presente invención pueden comprender aproximadamente 0.005%; aproximadamente 0.01%; aproximadamente 0.02%; aproximadamente 0.03%; aproximadamente 0.04%; aproximadamente 0.05%; aproximadamente 0.06%; aproximadamente 0.07%; aproximadamente 0.08%; aproximadamente 0.09%; aproximadamente 0.1%; aproximadamente 0.11%; aproximadamente 0.12%;

aproximadamente 0.13%; aproximadamente 0.14%; aproximadamente 0.15%; aproximadamente 0.16%; aproximadamente 0.17%; aproximadamente 0.18%; aproximadamente 0.19%; aproximadamente 0.20%; aproximadamente 0.21%; aproximadamente 0.22%; aproximadamente 0.23%; aproximadamente 0.24%; aproximadamente 0.25%; aproximadamente 0.26%; aproximadamente 0.27%; aproximadamente 0.28%; aproximadamente 0.29%; aproximadamente 0.30%; aproximadamente 0.35%; aproximadamente 0.40%; aproximadamente 0.45%; aproximadamente 0.46%; aproximadamente 0.47%; aproximadamente 0.48%; aproximadamente 0.49%; aproximadamente 0.50%; aproximadamente 0.55%; o aproximadamente 0.575% de polisorbato 20 o polisorbato 80.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender uno o más estabilizadores en un tipo y en una cantidad que estabiliza el anticuerpo PD-1 humano bajo condiciones de estrés térmico. En algunas realizaciones, lo que se entiende por "estabilizar" es mantener más del 91% del anticuerpo en una conformación nativa cuando la solución que contiene el anticuerpo y el estabilizador térmico son mantenidos a aproximadamente 45°C durante aproximadamente 28 días. En algunas realizaciones, lo que se entiende por "estabilizar" es donde menos de aproximadamente 6% del anticuerpo es agregado cuando la solución que contiene el anticuerpo y el estabilizador térmico son mantenidos a aproximadamente 45°C durante aproximadamente 28 días. Como se usa en este documento, "nativo" significa la mayor forma del anticuerpo por exclusión por tamaño, lo cual es generalmente un monómero intacto del anticuerpo. El término "nativo" también se refiere a una forma no-agregado y no-degradada del anticuerpo.

En ciertas realizaciones, el estabilizador térmico es un azúcar como sacarosa, cuya cantidad contenida dentro de la formulación puede variar dependiendo de las circunstancias específicas y los propósitos previstos para los cuales se usa la formulación. En ciertas realizaciones, las formulaciones pueden contener aproximadamente 1% a aproximadamente 15% de azúcar; aproximadamente 2% a 14% de azúcar; 1% a aproximadamente 15% de azúcar; aproximadamente 2% a 14% de azúcar; 3% a aproximadamente 13% de azúcar; aproximadamente 4% a 12% de azúcar; 5% a aproximadamente 12% de azúcar; aproximadamente 6% a 11% de azúcar; 7% a aproximadamente 10% de azúcar; aproximadamente 8% a 11% de azúcar; o aproximadamente 9% a aproximadamente 11% de azúcar. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender $4\% \pm 0.8\%$; $5\% \pm 1\%$; $6\% \pm 1.2\%$; $7\% \pm 1.4\%$; $8\% \pm 1.6\%$; $9\% \pm 1.8\%$; $10\% \pm 2\%$; $11\% \pm 2.2\%$; $12\% \pm 2.4\%$; $13\% \pm 2.6\%$; o aproximadamente $14\% \pm 2.8\%$ de azúcar (por ejemplo, sacarosa).

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender un tampón o sistema de tampón, el cual sirve para mantener un pH estable y ayuda a estabilizar el

anticuerpo PD-1 humano. El término “tampón” como se usa en este documento indica un tampón farmacéuticamente aceptable que mantiene un pH estable o resiste los cambios en pH de la solución. En realizaciones preferidas, el tampón comprende histidina. En el contexto de esta revelación, “tampón de histidina” o “tampón que comprende histidina” es un tampón que comprende el aminoácido histidina. Ejemplos de tampones de histidina incluyen cloruro de histidina, acetato de histidina, fosfato de histidina, y sulfato de histidina. En una realización preferida, el tampón de histidina es preparado disolviendo L-histidina y clorhidrato de L-histidina (por ejemplo, como monohidrato) en una cantidad y relación definida. En una realización, el tampón de histidina es preparado titulando L-histidina (base libre, sólida) con ácido clorhídrico diluido. El término “histidina” es usado de forma indistinta con “tampón de histidina” a través de esta revelación. En algunas realizaciones, lo que se entiende por “estabilizar” es donde menos de $4.5\% \pm 0.5\%$ del anticuerpo es agregado cuando la solución que contiene el anticuerpo y el tampón es mantenido a aproximadamente 45°C durante aproximadamente 28 días. En algunas realizaciones, lo que se entiende por “estabilizar” es donde menos de $3\% \pm 0.5\%$ o menos de $2.5\% \pm 0.5\%$ del anticuerpo es agregado cuando la solución que contiene el anticuerpo y el tampón es mantenido a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 28 días. En algunas realizaciones, lo que se entiende por “estabilizar” es donde menos de $93\% \pm 0.5\%$ o al menos $94\% \pm 0.5\%$ del anticuerpo está en su conformación nativa según lo determinado por cromatografía de exclusión por tamaño cuando la solución que contiene el anticuerpo y el tampón es mantenido a aproximadamente 45°C durante aproximadamente 28 días. En algunas realizaciones, lo que se entiende por “estabilizar” es donde menos de $94\% \pm 0.5\%$ o al menos $95\% \pm 0.5\%$ del anticuerpo está en su conformación nativa según lo determinado por cromatografía de exclusión por tamaño cuando la solución que contiene el anticuerpo y el tampón es mantenido a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 28 días. Por “nativo” o “conformación nativa” lo que se entiende es la fracción de anticuerpo que no está agregado o degradado. Esto es determinado generalmente por un ensayo que mide el tamaño relativo de la entidad del anticuerpo, como un ensayo cromatográfico de exclusión por tamaño. El anticuerpo no agregado y no degradado eluye en una fracción que equivale al anticuerpo nativo, y generalmente es la fracción de elución principal. El anticuerpo agregado eluye en una fracción que indica un tamaño mayor que el anticuerpo nativo. El anticuerpo degradado eluye en una fracción que indica un tamaño menor que el anticuerpo nativo.

En algunas realizaciones, lo que se entiende por “estabilizar” es donde al menos $35\% \pm 0.5\%$ del anticuerpo está en su forma de carga principal como lo determina la cromatografía de intercambio catiónico cuando la solución que contiene el anticuerpo y el tampón es mantenido a aproximadamente 45°C durante aproximadamente 28 días. En algunas realizaciones, lo que se entiende por “estabilizar” es donde al menos $46\% \pm 0.5\%$ o al menos $39\% \pm 0.5\%$ del anticuerpo está en su forma de carga principal como lo determina la cromatografía de intercambio catiónico

cuando la solución que contiene el anticuerpo y el tampón es mantenido a aproximadamente 37°C durante aproximadamente 28 días. Por “carga principal” o “forma de carga principal”, lo que se entiende es la fracción del anticuerpo que eluye de una resina de intercambio iónico en el pico principal, que generalmente está flanqueada por más picos "básicos" en un lado y más picos "ácidos" en el otro lado.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden tener un pH desde aproximadamente 5.2 a aproximadamente 6.4. Por ejemplo, las formulaciones de la presente invención pueden tener un pH de aproximadamente 5.5; aproximadamente 5.7; aproximadamente 5.8; aproximadamente 5.9; aproximadamente 6.0; aproximadamente 6.1; aproximadamente 6.2; aproximadamente 6.3; aproximadamente 6.4 o aproximadamente 6.4. En algunas realizaciones, el pH es 6.0 ± 0.4 ; 6.0 ± 0.3 ; 6.0 ± 0.2 ; 6.0 ± 0.1 ; aproximadamente 6.0; o 6.0.

En algunas realizaciones, el tampón o sistema de tampón comprende al menos un tampón que tiene un rango de amortiguación que se superpone completamente o en parte al rango de pH 5.5 - 7.4. En ciertas realizaciones, el tampón comprende un tampón de histidina. En ciertas realizaciones, el tampón de histidina está presente en una concentración de $5\text{ mM} \pm 1\text{ mM}$ a $15\text{ mM} \pm 3\text{ mM}$; $6\text{ mM} \pm 1.2\text{ mM}$ a $14\text{ mM} \pm 2.8\text{ mM}$; $7\text{ mM} \pm 1.4\text{ mM}$ a $13\text{ mM} \pm 2.6\text{ mM}$; $8\text{ mM} \pm 1.6\text{ mM}$ a $12\text{ mM} \pm 2.4\text{ mM}$; $9\text{ mM} \pm 1.8\text{ mM}$ a $11\text{ mM} \pm 2.2\text{ mM}$; $10\text{ mM} \pm 2\text{ mM}$; o aproximadamente 10 mM. En ciertas realizaciones, el sistema de tampón comprende histidina a $10\text{ mM} \pm 2\text{ mM}$, a un pH de 6.0 ± 0.3 . En realizaciones preferidas, el tampón de histidina comprende L-histidina y monoclóridato L-histidina monohidrato. En una realización, el tampón de histidina comprende L-histidina en una concentración de $4.8\text{ mM} \pm 0.96\text{ mM}$. en una realización, el tampón de histidina comprende monoclóridato L-histidina monohidrato en una concentración de $5.2\text{ mM} \pm 1.04\text{ mM}$. En una realización, el tampón de histidina comprende L-histidina en una concentración de $4.8\text{ mM} \pm 0.96\text{ mM}$ y monoclóridato L-histidina monohidrato en una concentración de $5.2\text{ mM} \pm 1.04\text{ mM}$.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender uno o más excipientes que sirven para mantener una viscosidad reducida o para disminuir la viscosidad de las formulaciones que contienen una alta concentración de sustancia farmacológica de anticuerpos anti-PD-1 (por ejemplo, generalmente $\geq 150\text{ mg/ml}$ de anticuerpo). En ciertas realizaciones, el modificador de viscosidad es un aminoácido. En una realización, el aminoácido es prolina. En una realización, la formulación farmacéutica de la presente invención contiene prolina, preferentemente como L-prolina, en una concentración de 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5% ó 5%. El término “prolina” es usado indistintamente con “L-prolina” a través de esta revelación. En algunas realizaciones, la formulación comprende prolina en una cantidad suficiente

para mantener la viscosidad de la formulación líquida a menos de 20 ± 3 cPoise, menos de 15 ± 2.25 cPoise, o menos de 11 ± 1.65 cPoise. En algunas realizaciones, la formulación comprende prolina en una cantidad suficiente para mantener la viscosidad en o por debajo 15 ± 2.25 cPoise. En ciertas realizaciones, las formulaciones pueden contener aproximadamente 1% a aproximadamente 5% de prolina; aproximadamente 2% a aproximadamente 4% de prolina; o aproximadamente 3% de prolina. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender $1\% \pm 0.2\%$; $1.5\% \pm 0.3\%$; $2\% \pm 0.4\%$; $2.5\% \pm 0.5\%$; $3\% \pm 0.6\%$; $3.5\% \pm 0.7\%$; $4\% \pm 0.8\%$; $4.5\% \pm 0.9\%$; o aproximadamente $5\% \pm 1\%$ de prolina.

Durante el proceso de purificación del anticuerpo puede ser necesario o desear intercambiar un tampón por otro para lograr las apropiadas concentraciones de excipientes, concentración de anticuerpos, pH., etc. El intercambio de tampones se puede lograr, por ejemplo, usando ultrafiltración/diafiltración (UF/DF), por ejemplo, una membrana de filtración de flujo tangencial semi-permeable. El uso de dichas técnicas, sin embargo, tiene el potencial de provocar el efecto Gibbs-Donnan [Bolton et al., 2011, Biotechnol. Prog. 27(1):140-152]. La acumulación de carga positiva en el lado del producto de la membrana durante la concentración de proteínas es contrarrestada eléctricamente por el movimiento preferencial de iones positivos al lado opuesto de la membrana. La consecuencia potencial de este fenómeno es que la concentración final de ciertos componentes (por ejemplo, histidina, L-prolina, etc.) puede ser inferior a las concentraciones objetivos previstas de estos componentes debido a la repulsión electrostática de los excipientes del tampón de diafiltración cargados positivamente a la proteína del anticuerpo cargado positivamente durante la etapa UF/DF. Por tanto, la presente invención incluye formulaciones en las cuales la concentración de, por ejemplo, histidina y/o L-prolina varían de las cantidades o rangos recitados debido al efecto Gibbs-Donnan.

La exclusión del volumen describe el comportamiento de muestras altamente concentradas en las cuales una porción significativa del volumen total de la solución es absorbida por el soluto, especialmente moléculas grandes como las proteínas, excluyendo el solvente de este espacio. Esto disminuye entonces el volumen total del solvente disponible para que otros solutos se disuelvan, lo que puede resultar en una distribución desigual a través de la membrana de ultrafiltración. Por tanto, la presente invención incluye formulaciones en las cuales la concentración de, por ejemplo, histidina y/o L-prolina pueden variar de las cantidades o rangos recitados en este documento debido al efecto de exclusión del volumen.

Durante la fabricación de las formulaciones de la presente invención, pueden ocurrir variaciones en la composición de las formulaciones. Estas variaciones pueden incluir la concentración del ingrediente activo, la concentración de los excipientes, y/o el pH de la

formulación. Dado que los cambios en cualquiera de estos parámetros pueden impactar potencialmente la estabilidad o potencia del producto farmacológico, se realizaron estudios probados de rango aceptable (PAR) para evaluar si las variaciones en la composición, dentro de los rangos definidos, afectarían la estabilidad del anticuerpo. En consecuencia, la presente invención incluye formulaciones que comprenden anticuerpos anti-PD-1 que son estables y retienen potencia con hasta 50% de variación en la concentración de excipiente. Por ejemplo, se incluyen en este documento las formulaciones de anticuerpos anti-PD-1, donde la estabilidad y potencia de dichas formulaciones no se ve afectada por una variación de $\pm 10\%$, $\pm 20\%$, $\pm 30\%$, $\pm 40\%$ o $\pm 50\%$ en la concentración de anticuerpo, sacarosa, tampón de histidina y/o polisorbato.

Estabilidad y Viscosidad de las Formulaciones Farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención normalmente muestran altos niveles de estabilidad. El término “estable” como se usa en este documento con referencia a las formulaciones farmacéuticas, significa que los anticuerpos dentro de las formulaciones farmacéuticas retienen un grado aceptable de estructura química o función biológica después del almacenamiento bajo condiciones definidas. Una formulación puede ser estable, aunque el anticuerpo contenido en el mismo no mantenga 100% de su estructura química o función biológica después del almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo. Bajo ciertas circunstancias, la mantención de aproximadamente 90%, aproximadamente 95, aproximadamente 96%, aproximadamente 97%, aproximadamente 98% o aproximadamente 99% de una estructura o función del anticuerpo después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo puede ser considerada como “estable”.

La estabilidad puede ser medida, entre otros, determinando el porcentaje de anticuerpo nativo que permanece en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo a una temperatura definida. El porcentaje de anticuerpo nativo puede ser determinado por, entre otros, cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, cromatografía líquida de ultra rendimiento de exclusión por tamaño [SE-UPLC], de manera que nativo significa no agregado y no degradado. Un “grado aceptable de estabilidad”, como se usa esa frase en este documento, significa que al menos 90% de la forma nativa del anticuerpo puede ser detectada en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo a una temperatura dada. En ciertas realizaciones, al menos aproximadamente 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% ó 100% de la forma nativa del anticuerpo puede ser detectada en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo a una temperatura definida. La cantidad definida de tiempo después de la cual la estabilidad es medida puede ser al menos 14 días, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos

5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses o más. La temperatura definida en la cual la formulación farmacéutica puede ser almacenada cuando se evalúa la estabilidad puede ser cualquier temperatura desde aproximadamente -80°C a aproximadamente 45°C, por ejemplo, almacenamiento a aproximadamente -80°C, aproximadamente -30°C, aproximadamente -20°C, aproximadamente 0°C, aproximadamente 4° - 8°C, aproximadamente 5°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 37°C, o aproximadamente 45°C. Por ejemplo, una formulación farmacéutica puede ser considerada estable si después de 6 meses de almacenamiento a 5°C, más de aproximadamente 95%, 96%, 97% o 98% de anticuerpo nativo es detectado por SE-UPLC. Una formulación farmacéutica también puede ser considerada estable si después de 6 meses de almacenamiento de 25°C, más de aproximadamente 95%, 96%, 97% o 98% de anticuerpo nativo es detectado por SE-UPLC. Una formulación farmacéutica también puede ser considerada estable si después de 28 días de almacenamiento a 45°C, más de aproximadamente 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95% ó 96% de anticuerpo nativo es detectado por SE-UPLC. Una formulación farmacéutica también puede ser considerada estable si después de 12 meses de almacenamiento a -20°C, más de aproximadamente 96%, 97% o 98% de anticuerpo nativo es detectado por SE-UPLC. Una formulación farmacéutica también puede ser considerada estable si después de 12 meses de almacenamiento a -30°C, más de aproximadamente 96%, 97% o 98% de anticuerpo nativo es detectado por SE-UPLC. Una formulación farmacéutica también puede ser considerada estable si después de 12 meses de almacenamiento a -80°C, más de aproximadamente 96%, 97% o 98% de anticuerpo nativo es detectado por SE-UPLC.

La estabilidad puede ser medida, entre otros, determinando el porcentaje de anticuerpo que se forma en un agregado dentro de la formulación después del almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo a una temperatura definida, donde la estabilidad es inversamente proporcional al porcentaje agregado que se forma. El porcentaje de anticuerpo agregado puede ser determinado, entre otros, por cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, cromatografía líquida de ultra rendimiento de exclusión por tamaño [SE-UPLC]). Un “grado aceptable de estabilidad”, como se usa esa frase en este documento, significa que a lo sumo 5% del anticuerpo es en forma de agregado (también referido como la forma de alto peso molecular – HMW) detectado en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo a una temperatura dada. En ciertas realizaciones, un grado aceptable de estabilidad significa que a lo más aproximadamente 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% ó 0.1% del anticuerpo puede ser detectado en un agregado en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo a una temperatura dada. La cantidad definida de tiempo después de la cual se puede medir la estabilidad puede ser al menos 2 semanas, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al

menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses o más. La temperatura a la cual la formulación farmacéutica puede ser almacenada cuando se evalúa la estabilidad puede ser cualquier temperatura desde aproximadamente -80°C a aproximadamente 45°C, por ejemplo, almacenamiento a aproximadamente -80°C, aproximadamente -30°C, aproximadamente -20°C, aproximadamente 0°C, aproximadamente 4° - 8°C, aproximadamente 5°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 37°C, o aproximadamente 45°C. Por ejemplo, una formulación farmacéutica puede ser considerada estable si después de 12 meses de almacenamiento a 5°C, menos de aproximadamente 2%, 1%, 0.5% o 0.1% del anticuerpo es detectado en una forma agregada. Una formulación farmacéutica puede ser considerada estable si después de tres meses de almacenamiento a 25°C, menos de aproximadamente 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5%, 0.1% del anticuerpo es detectado en una forma agregada. Una formulación farmacéutica puede ser considerada estable si después de 28 días de almacenamiento a 45°C, menos de aproximadamente 10-5, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1% ó 0.5% del anticuerpo es detectado en una forma agregada. Una formulación farmacéutica también puede ser considerada estable si después de tres meses de almacenamiento a -20°C, -30°C, ó -80°C menos de aproximadamente 3%, 2%, 1%, 0.5% ó 0.1% del anticuerpo es detectado en una forma agregada.

La estabilidad se puede medir, entre otros, determinando el porcentaje de anticuerpo que migra en una fracción más ácida durante el intercambio iónico (“forma ácida”) que en la fracción principal del anticuerpo (“forma de carga principal”), donde la estabilidad es inversamente proporcional a la fracción de anticuerpo en la forma ácida. Si bien no desea limitarse a la teoría, la desamidación del anticuerpo puede causar que el anticuerpo se cargue más negativamente y, por lo tanto, sea más ácido en relación con el anticuerpo no desamidado (véase, por ejemplo, Robinson, N., Protein Deamidation, *PNAS*, Abril 16, 2002, 99(8): 5283-5288). El porcentaje de anticuerpo “acidificado” puede ser determinado por, entre otros, cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía líquida de ultra rendimiento de intercambio catiónico [CEX-UPLC]). Un “grado aceptable de estabilidad”, como se usa en este documento, significa que a lo sumo 45% del anticuerpo está en una forma más ácida detectada en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo a una temperatura definida. En ciertas realizaciones, un grado aceptable de estabilidad significa que a lo más aproximadamente 40%, 35%, 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% ó 0.1% del anticuerpo puede ser detectado en una forma ácida en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo a una temperatura dada. En una realización, un grado aceptable de estabilidad significa que menos del 30%, 25%, 20%, 15%, 10%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% ó 0.1% del anticuerpo puede ser detectado en una forma ácida en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad definida de tiempo a una temperatura dada. La cantidad definida de tiempo después del

cual la estabilidad es medida puede ser al menos 2 semanas, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses o más. La temperatura a la cual la formulación farmacéutica puede ser almacenada cuando se evalúa la estabilidad puede ser cualquier temperatura desde aproximadamente -80°C a aproximadamente 45°C , por ejemplo, almacenamiento a aproximadamente -80°C , aproximadamente -30°C , aproximadamente -20°C , aproximadamente 0°C , aproximadamente $4^{\circ} - 8^{\circ}\text{C}$, aproximadamente 5°C , aproximadamente 25°C , aproximadamente 35°C , aproximadamente 37°C , o aproximadamente 45°C . Por ejemplo, una formulación farmacéutica puede ser considerada estable si después de tres meses de almacenamiento a -80°C , -30°C , ó -20°C menos de aproximadamente 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% ó 0.1% del anticuerpo está en una forma ácida. Una formulación farmacéutica también puede ser considerada estable si después de seis meses de almacenamiento a 5°C , menos de aproximadamente 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% ó 0.1% del anticuerpo está en una forma ácida. Una formulación farmacéutica también puede ser considerada estable si después de seis meses de almacenamiento a 25°C , menos de aproximadamente 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% ó 0.1% del anticuerpo está en una forma ácida. Una formulación farmacéutica también puede ser considerada estable si después de 28 días de almacenamiento a 45°C , menos de aproximadamente 49%, 48%, 47%, 46%, 45%, 44%, 43%, 42%, 41%, 40%, 39%, 38%, 37%, 36%, 35%, 34%, 33%, 32%, 31%, 30%, 29%, 28%, 27%, 26%, 25%, 24%, 23%, 22%, 21%, 20%, 19%, 18%, 17%, 16%, 15%, 14%, 13%, 12%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2%, 1%, 0.5% ó 0.1% del anticuerpo está en una forma ácida.

Otros métodos pueden ser usados para evaluar la estabilidad de las formulaciones de la presente invención como, por ejemplo, calorimetría de barrido diferencia (DSC) para determinar la estabilidad térmica, agitación controlada para determinar la estabilidad mecánica, y absorbancia a aproximadamente 350 nm o aproximadamente 405 nm para determinar la turbiedad de la solución. Por ejemplo, una formulación de la presente invención puede ser considerada estable si, después de 6 o más meses de almacenamiento a aproximadamente 5°C a aproximadamente 25°C , el cambio en OD_{405} de la formulación es menor de aproximadamente 0.05 (por ejemplo, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01 o menos) de OD_{405} de la formulación al momento cero.

Medir la actividad biológica o afinidad de unión del anticuerpo a su objetivo también puede ser usado para evaluar la estabilidad. Por ejemplo, una formulación de la presente invención puede ser considerada como estable si, después del almacenamiento a, por ejemplo, 5°C, 25°C, 45°C, etc., durante una cantidad definida de tiempo por ejemplo, 1 a 12 meses), el anticuerpo anti-PD-1 contenido dentro de la formulación se une a PD-1 con una afinidad que es al menos 90%, 95% o más de la afinidad de unión del anticuerpo antes de dicho almacenamiento. La afinidad de unión puede ser determinada, por ejemplo, mediante ELISA o resonancia de plasmón de superficie. La actividad biológica puede ser determinada por un ensayo de actividad PD-1 como, por ejemplo, contactando una célula que expresa PD-1 con la formulación que comprende el anticuerpo anti-PD-1. La unión del anticuerpo a dicha célula puede ser medida directamente como, por ejemplo, mediante análisis FACS. De manera alternativa, la actividad aguas abajo del sistema PD-1 puede ser medida en la presencia del anticuerpo, y comparado con la actividad del sistema PD-1 en la ausencia del anticuerpo. En algunas realizaciones, el PD-1 puede ser endógeno a la célula. En otras realizaciones, el PD-1 puede expresado de manera ectópica en la célula.

Métodos adicionales para evaluar la estabilidad de un anticuerpo en formulación son demostrados en los Ejemplos que se presentan a continuación.

Las formulaciones farmacéuticas líquidas de la presente invención pueden, en ciertas realizaciones, mostrar bajos a moderados niveles de viscosidad. “Viscosidad” como se usa en este documento puede ser “viscosidad cinemática” o “viscosidad absoluta”. “Viscosidad cinemática” es una medida del flujo resistivo de un fluido bajo la influencia de la gravedad. Cuando dos fluidos de igual volumen son colocados en viscosímetros capilares idénticos y se les permite fluir por gravedad, un fluido viscoso tarda más que un fluido menos viscoso en fluir a través del capilar. Por ejemplo, si un fluido toma 200 segundos para completar su flujo y otro fluido toma 400 segundos, el segundo fluido es dos veces más viscoso que el primero en una escala de viscosidad cinemática. “Viscosidad absoluta” algunas veces llamada viscosidad dinámica o simple, es el producto de viscosidad cinemática y densidad de fluido ($\text{Viscosidad Absoluta} = \text{Viscosidad Cinemática} \times \text{Densidad}$). La dimensión de viscosidad cinemática es L^2/T donde L es una longitud y T es un tiempo. Comúnmente, la viscosidad cinemática se expresa en centistokes (cSt). La unidad de viscosidad cinemática es mm^2/s , el cual es 1 cSt. La viscosidad absoluta es expresada en unidades de centipose (cP). La unidad SI de viscosidad absoluta es miliPascal-segundo (mPa-s), donde 1 cP = 1 mPa-s.

Como se usa en este documento, un bajo nivel de viscosidad, en referencia a una formulación fluida de la presente invención, mostrará una viscosidad absoluta de menos de aproximadamente 20 cPoise (cP). Por ejemplo, se considerará que una formulación fluida de la

invención tiene "baja viscosidad" si, cuando se mide usando técnicas de medición de viscosidad estándar, la formulación exhibe una viscosidad absoluta de aproximadamente 20 cP, aproximadamente 19 cP, aproximadamente 18 cP, aproximadamente 15 cP, aproximadamente 12 cP, aproximadamente 10 cP, aproximadamente 9 cP, aproximadamente 8 cP, o menos. Como se usa en este documento, un nivel moderado de viscosidad, en referencia a una formulación fluida de la presente invención, mostrará una viscosidad absoluta de entre aproximadamente 35 cP y aproximadamente 20 cP. Por ejemplo, se considerará que una formulación fluida de la invención tiene "moderada viscosidad", si cuando se mide usando técnicas de medición de viscosidad estándar, la formulación exhibe una viscosidad absoluta de aproximadamente 34 cP, aproximadamente 33 cP, aproximadamente 32 cP, aproximadamente 31 cP, aproximadamente 30 cP, aproximadamente 29 cP; aproximadamente 28 cP, aproximadamente 27 cP, aproximadamente 26 cP, aproximadamente 25 cP, aproximadamente 24 cP, aproximadamente 23 cP, aproximadamente 22 cP; aproximadamente 21 cP, aproximadamente 20 cP, aproximadamente 19 cP, aproximadamente 18 cP, aproximadamente 17 cP, aproximadamente 16 cP; o aproximadamente 15.1 cP,

Como se ilustra en los ejemplos a continuación, los presentes inventores han hecho el sorprendente descubrimiento que las formulaciones líquidas de baja viscosidad que comprenden altas concentraciones de un anticuerpo anti-PD-1 (por ejemplo, desde aproximadamente 50 mg/ml hasta 250 mg/ml) se pueden obtener formulando el anticuerpo con prolina desde aproximadamente 1% a aproximadamente 5% y sacarosa a aproximadamente 5%. Dichas formulaciones son estables al estrés durante la manipulación y al almacenamiento a temperaturas en los rangos de 45°C a -80°C (mostrado en este documento) y tienen baja viscosidad (tienen viscosidad que varía desde 7 a 10 cP).

Formulaciones Ejemplares

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la formulación farmacéutica es una formulación líquida, estable, de baja viscosidad, generalmente fisiológicamente isotónica, que comprende: (i) un anticuerpo humano que se une específicamente a PD-1 human (por ejemplo, H4H7798N), en una concentración de hasta 250 mg/ml $\pm$ 45 mg/ml; (ii) un sistema de tampón de histidina que proporciona suficiente tamponamiento a aproximadamente un pH 6.0 $\pm$ 0.3; (iii) un cosolvente orgánico, que protege la integridad estructural del anticuerpo; (iv) un estabilizador térmico que es un azúcar; y (iv) un modificador de viscosidad que es un aminoácido, el cual sirve para mantener la viscosidad manejable para inyección en un volumen conveniente para administración subcutánea.

De acuerdo con una realización, la formulación farmacéutica, estable de baja viscosidad comprende: (i) un anticuerpo IgG4 humano que se une específicamente a PD-1 humano, y que comprende un HCDR1 de SEQ ID N°3, un HCDR2 de SEQ ID N°4, un HCDR3 de SEQ ID N°5, un LCDR1 de SEQ ID N°6, un LCDR2 de SEQ ID N°7, y un LCDR3 de SEQ ID N°8, en una concentración de hasta 200 mg/ml $\pm$ 30 mg/ml; (ii) un tampón de histidina a 10 mM $\pm$ 2 mM, que tampona a pH 6.0 $\pm$ 0.3; (iii) polisorbato 80 a 0.2% p/v $\pm$ 0.1% p/v; (iv) sacarosa a 5% $\pm$ 1% p/v; y (v) L-prolina a 1.5% (p/v) $\pm$ 0.3%.

De acuerdo con una realización, la formulación farmacéutica estable de baja viscosidad comprende: (i) un anticuerpo IgG4 humano que se une específicamente a PD-1 humano, y que comprende un HCDR1 de SEQ ID N°3, un HCDR2 de SEQ ID N°4, un HCDR3 de SEQ ID N°5, un LCDR1 de SEQ ID N°6, un LCDR2 de SEQ ID N°7, y un LCDR3 de SEQ ID N°8, en una concentración de 175 mg/ml $\pm$ 26.25 mg/ml; (ii) un tampón de histidina a 10 mM $\pm$ 2 mM, que tampona a pH 6.0 $\pm$ 0.3; (iii) polisorbato 80 a 0.2% p/v $\pm$ 0.1% p/v; (iv) sacarosa a 5% $\pm$ 1% p/v; y (v) L-prolina a 1.5% (p/v) $\pm$ 0.3%.

De acuerdo con una realización, la formulación farmacéutica estable de baja viscosidad comprende: (i) un anticuerpo IgG4 humano que se une específicamente a PD-1 humano, y que comprende un HCDR1 de SEQ ID N°3, un HCDR2 de SEQ ID N°4, un HCDR3 de SEQ ID N°5, un LCDR1 de SEQ ID N°6, un LCDR2 de SEQ ID N°7, y un LCDR3 de SEQ ID N°8, en una concentración de 150 mg/ml $\pm$ 22.5 mg/ml; (ii) un tampón de histidina a 10 mM $\pm$ 2 mM, que tampona a pH 6.0 $\pm$ 0.3; (iii) polisorbato 80 a 0.2% p/v $\pm$ 0.1% p/v; (iv) sacarosa a 5% $\pm$ 1% p/v; y (v) L-prolina a 1.5% (p/v) $\pm$ 0.3%.

De acuerdo con una realización, la formulación farmacéutica estable de baja viscosidad comprende: (i) un anticuerpo IgG4 humano que se une específicamente a PD-1 humano, y que comprende un HCDR1 de SEQ ID N°3, un HCDR2 de SEQ ID N°4, un HCDR3 de SEQ ID N°5, un LCDR1 de SEQ ID N°6, un LCDR2 de SEQ ID N°7, y un LCDR3 de SEQ ID N°8, en una concentración de 100 mg/ml $\pm$ 15 mg/ml; (ii) un tampón de histidina a 10 mM $\pm$ 2 mM, que tampona a pH 6.0 $\pm$ 0.3; (iii) polisorbato 80 a 0.2% p/v $\pm$ 0.1% p/v; (iv) sacarosa a 5% $\pm$ 1% p/v; y (v) L-prolina a 1.5% (p/v) $\pm$ 0.3%.

De acuerdo con una realización, la formulación farmacéutica estable de baja viscosidad comprende: (i) un anticuerpo IgG4 humano que se une específicamente a PD-1 humano, y que comprende un HCDR1 de SEQ ID N°3, un HCDR2 de SEQ ID N°4, un HCDR3 de SEQ ID N°5, un LCDR1 de SEQ ID N°6, un LCDR2 de SEQ ID N°7, y un LCDR3 de SEQ ID N°8, en una concentración de 50 mg/ml $\pm$ 7.5 mg/ml; (ii) un tampón de histidina a 10 mM $\pm$ 2 mM, que tampona

a pH 6.0 ± 0.3 ; (iii) polisorbato 80 a $0.2\% \text{ p/v} \pm 0.1\% \text{ p/v}$; (iv) sacarosa a $5\% \pm 1\% \text{ p/v}$; y (v) L-prolina a $1.5\% \text{ (p/v)} \pm 0.3\%$.

De acuerdo con una realización, la formulación farmacéutica estable de baja viscosidad comprende: (i) un anticuerpo IgG4 humano que se une específicamente a PD-1 humano, y que comprende un HCDR1 de SEQ ID N°3, un HCDR2 de SEQ ID N°4, un HCDR3 de SEQ ID N°5, un LCDR1 de SEQ ID N°6, un LCDR2 de SEQ ID N°7, y un LCDR3 de SEQ ID N°8, en una concentración de $25 \text{ mg/ml} \pm 3.75 \text{ mg/ml}$; (ii) un tampón de histidina a $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$, que tampona a pH 6.0 ± 0.3 ; (iii) polisorbato 80 a $0.2\% \text{ p/v} \pm 0.1\% \text{ p/v}$; (iv) sacarosa a $5\% \pm 1\% \text{ p/v}$; y (v) L-prolina a $1.5\% \text{ (p/v)} \pm 0.3\%$.

Ejemplos adicionales no limitantes de formulaciones farmacéuticas abarcadas por la presente invención se exponen en otra parte de este documento, incluyendo los ejemplos de trabajo presentados a continuación.

Contenedores y Métodos de Administración

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar contenidas dentro de cualquier contenedor adecuado para almacenamiento de medicinas y otras composiciones terapéuticas. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas pueden estar contenidas dentro de un contenedor de vidrio o plástico esterilizado y sellado que tiene un volumen definido como un frasco, ampolla, jeringa, cartucho o botella. Diferentes tipos de frascos pueden ser usados para contener las formulaciones de la presente invención incluyendo, por ejemplo, frascos de vidrio o plástico transparente y opaco (por ejemplo, ámbar). Asimismo, cualquier tipo de jeringa puede ser usada para contener o administrar las formulaciones farmacéuticas de la presente invención.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar contenidas dentro de jeringas de “tungsteno normal” o jeringas de “bajo contenido de tungsteno”. Como lo apreciarán los expertos en la técnica, el proceso de hacer jeringas de vidrio generalmente implica el uso de una barra de tungsteno caliente que funciona para perforar el vidrio creando así un agujero desde el cual se pueden extraer y expulsar líquidos de la jeringa. Este proceso resulta en el depósito de pequeñas cantidades de tungsteno en la superficie interior de la jeringa. El posterior lavado y otras etapas de procesamiento pueden usarse para reducir la cantidad de tungsteno en la jeringa. Como se usa en este documento, el término “tungsteno normal” significa que la jeringa contiene más de o igual a 500 partes por billón (ppb) de tungsteno. El término “bajo contenido de tungsteno” significa que la jeringa contiene menos de 500 ppb de tungsteno. Por ejemplo, una jeringa con bajo

contenido de tungsteno, de acuerdo con la presente invención, puede contener menos de aproximadamente 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 390, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 o menos ppb de tungsteno.

Los émbolos de goma usados en jeringas, y los tapones de goma usados para cerrar las aberturas de los frascos, pueden ser recubiertos para evitar la contaminación de los contenidos medicinales de la jeringa o frasco, o para conservar su estabilidad. Por tanto, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, de acuerdo con ciertas realizaciones, pueden estar contenidas dentro de una jeringa que comprende un émbolo recubierto, o dentro de un frasco que está sellado con un tapón de goma recubierto. Por ejemplo, el émbolo o tapón puede estar recubierto con una película de flurocarbano. Ejemplos de tapones o émbolos recubiertos adecuados para uso con frascos y jeringas que contienen las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se mencionan en, por ejemplo, Patente U.S. N°s 4.997.423; 5.908.686; 6.645.635; y 7.226.554, cuyos contenidos se incorporan por referencia en este documento en su totalidad. Tapones y émbolos de goma recubiertos particularmente ejemplares que pueden ser usados en el contexto de la presente invención están disponibles comercialmente bajo la marca “FluroTec®”, disponibles en West Pharmaceutical Services, Inc. (Lionville, PA). FluroTec® es un ejemplo de un recubrimiento de flurocarbano usado para minimizar o prevenir que el producto farmacológico se adhiera a las superficies de goma.

De acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención, las formulaciones farmacéuticas pueden estar contenidas dentro una jeringa con bajo contenido de tungsteno que comprende un émbolo recubierto de flurocarbano.

Las formulaciones farmacéuticas pueden ser administradas a un paciente mediante rutas parenterales como inyección (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, etc.) o administración percutánea, mucosa, nasal, pulmonar u oral. Numerosos dispositivos de suministro de pluma o autoinyector reutilizables pueden ser usados para administrar por vía subcutánea las formulaciones farmacéuticas de la presente invención. Ejemplos incluyen, pero no están limitados a, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, UK), DISETRONIC™ pen (Disetronic Medical Systems, Bergdorf, Suiza), HUMALOG MIX 75/25™ pen, HUMAGO™ pen, HUMALIN 70/30™ pen (Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II and III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), BD™ pen (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™, y OPTICLICK™ (Sanofi Aventis, Frankfurt, Alemania). Ejemplos de dispositivos de suministro de pluma o autoinyector que tienen aplicaciones en suministro subcutánea de una composición farmacéutica de la presente invención incluye, pero no está

limitado a SOLOSTAR™ pen (Sanofi Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk), y KWIKPEN™ (Eli Lilly), SURECLICK™ Autoinjector (Amgen, Thousand Oaks, CA); PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), EPIPEN (Dey L.P.) y HUMIRA™ Pen (Abbott Labs, Abbott Park, IL).

El uso de un microinfusor para suministrar las formulaciones farmacéuticas de la presente invención también se contempla en este documento. Como se usa en este documento, el término “microinfusor” significa un dispositivo de suministro subcutáneo diseñado para administrar grandes volúmenes lentamente (por ejemplo, hasta aproximadamente 2.5 mL o más) de una formulación durante un período prolongado de tiempo (por ejemplo, aproximadamente 10, 15, 20, 25, 30 o más minutos). Véase, por ejemplo, U.S. 6.629.949; US 6.659.982, y Meehan *et al.*, *J. Controlled Release* 46:107-116 (1996). Los microinfusores son particularmente útiles para el suministro de grandes dosis de proteínas terapéuticas contenidas dentro de soluciones en alta concentración (por ejemplo, aproximadamente 100, 125, 150, 175, 200 o más mg/mL) o soluciones viscosas.

En ciertas realizaciones, la formulación farmacéutica líquida estable de cualquiera de los aspectos anteriores es contenida en un frasco de vidrio estéril y es administrada como una infusión IV.

En una realización, el contenedor es un frasco de vidrio de borosilicato transparente tipo 1. En ciertas realizaciones, el contenedor es un frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2mL, 5mL o 10 mL con un tapón de clorobutilo, con un recubrimiento de Fluro Tec®.

En una realización, la formulación farmacéutica líquida de la presente invención que comprende aproximadamente 25 mg/mL o 50 mg/mL de mAb1 es administrada intravenosamente y puede estar contenida en un frasco de vidrio.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona un autoinyector que comprende cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en este documento. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona un autoinyector que comprende una formulación líquida estable que comprende aproximadamente 50 mg/mL, aproximadamente 100 mg/mL, aproximadamente 150 mg/mL, o aproximadamente 175 mg/mL de mAb1, aproximadamente 10mM de histidina, a un pH de aproximadamente 6.0, aproximadamente 5% de sacarosa, aproximadamente 1.5% de prolina y aproximadamente 0.2% de polisorbato 80.

En ciertas realizaciones, la presente invención proporciona una jeringa precargada que comprende cualquiera de las formulaciones líquidas descritas en este documento. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona una jeringa precargada que comprende una formulación líquida estable que comprende aproximadamente 50 mg/mL, aproximadamente 100 mg/mL, aproximadamente 150 mg/mL, o aproximadamente 175 mg/mL de mAb1, aproximadamente 10mM de histidina, a un pH de aproximadamente 6.0, aproximadamente 5% de sacarosa, aproximadamente 1.5% de prolina y aproximadamente 0.2% de polisorbato 80. En ciertas realizaciones, la jeringa es una jeringa de vidrio de 1 ml o 2.25 ml de largo llena con una aguja de pared delgada de calibre 27, un émbolo de goma recubierto de fluorocarbono y un protector de aguja de goma.

En una realización, la formulación farmacéutica líquida que contiene aproximadamente 175 mg/mL, $\pm$ 26.25 mg/mL mAb1 es administrada en un volumen de aproximadamente hasta 2 mL en una jeringa precargada. En ciertas realizaciones, la jeringa es una jeringa de vidrio de 1 ml o 2.25 ml de largo llena con una aguja de pared delgada de calibre 27, un émbolo de goma recubierto de fluorocarbono y un protector de aguja de goma. En una realización, la jeringa es una jeringa de vidrio de 1 mL de largo OMPI con una aguja de calibre 27, un protector de aguja de goma FM27 y un émbolo de goma 4023/50 recubierto con FLUROTEC®.

En una realización, la formulación farmacéutica líquida que contiene aproximadamente 150 mg/mL, $\pm$ 22.5 mg/mL de anticuerpo anti-PD-1 es administrada en un volumen de aproximadamente hasta 2 mL en una jeringa precargada. En una realización, la jeringa es una jeringa de vidrio de 1 ml o 2.25 ml de largo llena con una aguja de pared delgada de calibre 27, un émbolo de goma recubierto de fluorocarbono y un protector de aguja de goma. En una realización, la jeringa es una jeringa de vidrio de 1 mL de largo OMPI con una aguja de calibre 27, un protector de aguja de goma FM27 y un émbolo de goma 4023/50 recubierto con FLUROTEC®.

Usos terapéuticos de las formulaciones farmacéuticas

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención son útiles, entre otros, para el tratamiento, prevención o mejoría de cualquier enfermedad o trastorno asociado con la actividad de PD-1, incluyendo enfermedades o trastornos mediados por PD-1. Enfermedades y trastornos ejemplares, no limitantes que pueden ser tratados o evitados mediante la administración de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen infecciones virales, enfermedades autoinmunes, y diversos cánceres como, por ejemplo, cáncer cerebral, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer colorrectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de piel, diversos cánceres de sangre y cánceres de endometrio.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos son presentados de manera de proporcionar a los expertos en la técnica con una completa revelación y descripción de cómo hacer y usar los métodos y composiciones de la invención, y no pretende limitar el alcance de lo que los inventores consideran como su invención. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados (por ejemplo, cantidades, temperatura, etc.), pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales. A menos que se indique lo contrario, las partes son partes en moles, el peso molecular es el peso molecular promedio, la temperatura está en grados centígrados y la presión es igual o cercana a la presión atmosférica.

Ejemplos 1: Desarrollo de una formulación de anticuerpo anti-PD-1

Los objetivos de las actividades de formulación fueron desarrollar una formulación con los siguientes atributos:

- una formulación líquida con una concentración de anticuerpo anti-PD-1 suficiente para suministrar una dosis de 250 mg o más mediante infusión intravenosa;
- una formulación casi iso-osmolar que es estable tras la dilución con diluyentes comúnmente utilizados, por ejemplo, inyección de cloruro de sodio al 0.9% o inyección de dextrosa al 5%, para infusión intravenosa;
- una formulación que sea compatible y estable en un frasco de vidrio transparente tipo 1 y un tapón de suero estándar como envase; y
- una solución de producto farmacéutico estéril (DP) que respalda la estabilidad a largo plazo:
 - una formulación que minimiza las especies de anticuerpos de alto peso molecular (HMW) cuando son sometidas a manipulación y estrés térmico;
 - una formulación que minimiza los cambios en la distribución relativa de especies cargadas de anticuerpos cuando son sometidas a estrés térmico; y
 - una formulación que mantiene la actividad biológica cuando es sometida a manipulación y estrés térmico.

A lo largo del desarrollo de la formulación, se emplearon tres condiciones de estrés primario (que representan condiciones extremas de manipulación más allá de las cuales el producto

farmacológico del anticuerpo no estaría sujeto durante la manipulación, fabricación, envío, almacenamiento y etiquetado) para desarrollar y optimizar las formulaciones de anticuerpos y evaluar los efectos potenciales de tensiones en el mundo real sobre la estabilidad del medicamento. Estas condiciones de estrés incluyen:

- Agitación (vórtice) de la solución de proteína a temperatura ambiente. El vórtice en frascos de vidrio excede la agitación que ocurre durante el manejo y la fabricación de la proteína.
- Incubar la solución de proteína a temperatura elevada (37°C, 40°C o 45°C) en relación con la condición de almacenamiento DP propuesta (2°C-8°C).
- Someter la proteína a múltiples ciclos de congelación y descongelación. Como la proteína sufrirá al menos un ciclo de congelación y descongelación durante la fabricación de DP, múltiples ciclos de congelación y descongelación simulan y exceden el estrés real que se espera que experimente la proteína.

Había cuatro objetivos principales del trabajo de desarrollo de formulación inicial:

1. Selección del tampón y pH: La elección del tampón y el pH puede tener un gran efecto sobre la estabilidad de las proteínas, por lo tanto, decidir sobre las especies de tampón y el pH óptimos es un proceso importante. Los estudios se presentan en estas secciones que demuestran la justificación de la elección del tampón óptimo y el pH del anticuerpo.
2. La selección del surfactante o cosolvente orgánico: Un surfactante o cosolvente orgánico, como polisorbato, es requerido normalmente para prevenir la precipitación o agregación de proteínas cuando son agitadas. La proteína soluble puede ser sometida a agitación cuando es manipulada, filtrada, mezclada, fabricada, embarcada y administrada. La sustancia farmacológica del anticuerpo en una solución tamponada simple puede volverse visiblemente turbia con un exceso de agitación. Por lo tanto, se determinó que era importante estabilizar la proteína para su manipulación y agitación.
3. Identificación/selección de excipientes estabilizantes/tonificantes: la adición de azúcares, sales y aminoácidos fue examinada para su capacidad de mejorar la estabilidad del anticuerpo al estrés térmico y aumentar la vida útil del DP. La justificación para incluir estos estabilizadores térmicos, como también estudios que identifican las concentraciones óptimas en la formulación final son presentadas en este documento.
4. Selección de concentración de anticuerpo: se examinó el efecto de la concentración de anticuerpo en la estabilidad del producto farmacológico con los excipientes seleccionados.

Las actividades de desarrollo de la formulación inicial fueron realizadas usando 5 – 50 mg/mL del anticuerpo anti-PD-1 e implicó la detección de cosolventes orgánicos, estabilizadores térmicos y tampones en formulaciones líquidas de anticuerpos anti-PD-1 para identificar los excipientes que son compatibles con la proteína y mejorar su estabilidad, mientras se mantiene una osmolalidad fisiológica cercana y baja viscosidad para inyección intravenosa y subcutánea. Las condiciones del tampón también fueron examinadas para determinar el pH óptimo para una máxima estabilidad de proteína (descrito en Ejemplo 4, 6 y 7 en este documento).

Los resultados de este trabajo de desarrollo de la formulación inicial fueron usados para desarrollar una formulación inicial que fue adecuada para los estudios clínicos de Fase 1. La formulación de fase 1 también proporcionó una referencia para optimizar las formulaciones clínicas y comerciales de fase tardía.

Con el conocimiento adquirido a partir del desarrollo de la formulación inicial, las actividades de desarrollo de la formulación de fase tardía implicaron optimizar el pH, concentración de surfactante, y estabilizadores para identificar excipientes que mejoren la estabilidad de proteína tanto en concentraciones de proteína baja como alta (hasta 175 mg/mL mAb1) (descrito en Ejemplos 5, 8, 9 y 10).

A lo largo del desarrollo de la formulación, las formulaciones fueron evaluadas para estrés y estabilidad de almacenamiento. Los métodos usados para evaluar la estabilidad en los estudios del desarrollo de la formulación se describen en Ejemplo 3 en este documento. Los ejemplos 11 y 12 describen el almacenamiento y estabilidad del estrés de las formulaciones.

Ejemplo 13 describe la estabilidad de las formulaciones cuando los excipientes variaron dentro de rangos específicos.

Los resultados generados a partir de estos estudios fueron usados para desarrollar formulaciones líquidas estables adecuadas para uso clínico, ya sea para administración intravenosa (IV) o subcutánea. Ejemplo 14 describe contenedores usados para las formulaciones en este documento. Los Ejemplos 15, 16 y 17 describen la compatibilidad y estabilidad de las formulaciones en frascos de vidrio, jeringas precargadas y dispositivos de administración intravenosos. Dichas formulaciones reúnen los objetivos definidos para el desarrollo de la formulación:

- Las formulaciones desarrolladas son adecuadas para las dosis desarrolladas;
- Una tonicidad que es iso-osmolar a condiciones fisiológicas;

- La osmolalidad de la formulación de 50 mg/mL es aproximadamente 318 mOsm/kg;
- La solución DP estéril que soporta la estabilidad a largo plazo en estado líquido;
 - Formación mínima de especies de anticuerpo HMW se produce tras un almacenamiento a largo plazo a 2-8°C;
 - Poco o casi nada de cambio en la distribución relativa de especies cargadas de anticuerpos se produce tras un almacenamiento a largo plazo a 2-8°C; y
 - Formación mínima de partículas subvisibles se observó en anticuerpo DP bajo almacenamiento acelerado y condiciones de estrés, y tras almacenamiento a 5°C durante 12 meses.

Otros atributos de las formulaciones serán evidentes a partir de la descripción en este documento.

Anticuerpos anti-PD-1: Los anticuerpos anti-PD-1 se describen en US20150203579, incorporado en este documento en su totalidad. El anticuerpo ejemplar usado en los Ejemplos a continuación es un anticuerpo anti-PD-1 H4H7798N completamente humano (como se revela en US20150203579, conocido como “REGN2810” o “cemiplimab”) que comprende una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 9 y una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácido de SEQ ID N°10; un par de secuencia de aminoácidos HCVR/LCVR que comprende la SEQ ID N° 1/2; y secuencias de CDR de cadena pesada y ligera que comprende SEQ ID N° 3-8; y referidos en este documento como “mAb1”.

Ejemplo 2: Formulaciones Ejemplares

En ciertas realizaciones, mAb1 es formulada como una formulación tamponada acuosa que contiene desde 5 mg/ml $\pm$ 0.75 mg/ml a 250 mg/ml $\pm$ 45.0 mg/ml de mAb1, 10 mM $\pm$ 2mM de tampón de histidina, 0.2% $\pm$ 0.1% p/v polisorbato, 1% $\pm$ 0.2% a 10% $\pm$ 2% p/v sacarosa, y 1% $\pm$ 0.02% a 5% $\pm$ 1% p/v de prolina, a un pH de 6.0 $\pm$ 0.3.

Formulaciones ejemplares incluyen:

- Una formulación farmacéutica estable de baja viscosidad que comprende: 25 mg/ml $\pm$ 3.75 mg/mL de mAb1, 10 mM $\pm$ 2mM de tampón de histidina, 0.2% $\pm$ 0.1% p/v polisorbato 80, 5% $\pm$ 1% p/v sacarosa, y 1.5% $\pm$ 0.3% p/v de L-prolina, a un pH de 6.0 $\pm$ 0.3.
- Una formulación farmacéutica estable de baja viscosidad que comprende: 50 mg/ml $\pm$ 7.5 mg/mL de mAb1, 10 mM $\pm$ 2mM de tampón de histidina, 0.2% $\pm$ 0.1% p/v

polisorbato 80, $5\% \pm 1\%$ p/v sacarosa, y $1.5\% \pm 0.3\%$ p/v de L-prolina, a un pH de 6.0 ± 0.3 .

- Una formulación farmacéutica estable de baja viscosidad que comprende: 150 mg/ml $\pm$ 23 mg/mL de mAb1, 10 mM $\pm$ 2mM de tampón de histidina, $0.2\% \pm 0.1\%$ p/v polisorbato 80, $5\% \pm 1\%$ p/v sacarosa, y $1.5\% \pm 0.3\%$ p/v de L-prolina, a un pH de 6.0 ± 0.3 .
- Una formulación farmacéutica estable de baja viscosidad que comprende: 175 mg/ml $\pm$ 27 mg/mL de mAb1, 10 mM $\pm$ 2mM de tampón de histidina, $0.2\% \pm 0.1\%$ p/v polisorbato 80, $5\% \pm 1\%$ p/v sacarosa, y $1.5\% \pm 0.3\%$ p/v de L-prolina, a un pH de 6.0 ± 0.3 .

Ejemplo 3: Métodos usados para evaluar la estabilidad de la formulación

Los siguientes ensayos fueron aplicados para evaluar la estabilidad de la formulación:

- Color y apariencia mediante inspección visual
- pH
- Turbiedad medida mediante el aumento en OD a 405nm, o por nefelometría.
- Análisis de material particulado realizado por imagen de microflujo (MFI) (reportado como recuentos de partículas obtenidos tal cual), y oscurecimiento de luz (HIAC).
- Concentración de proteína mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento de fase inversa (RP-UPLC).
- Pureza mediante exclusión por tamaño – cromatografía líquida de ultra rendimiento (SE-UPLC) o por electroforesis capilar microchip reducida y no reducida dodecil sulfato de sodio (MCE-SDS) PAGE
- Análisis de la variante de carga por cromatografía de intercambio catiónico-cromatografía líquida de rendimiento ultra (CEX-UPLC) o por enfoque isoeléctrico capilar captado por imágenes (iCIEF).
- Potencia por bioensayo: la potencia relativa de cada muestra se determina mediante un bioensayo y se define como: (muestra de referencia IC₅₀/muestra IC₅₀)*100%. La potencia medida de las muestras de estabilidad de almacenamiento debe estar dentro del 50% al 150% de la potencia medida del estándar de referencia.

La estabilidad física de una formulación se refiere a las propiedades como color, apariencia, pH, turbiedad, y concentración de proteínas. La presencia de particulados visibles en la solución pueden ser detectados mediante inspección visual. Una solución pasa la inspección visual si es transparente a ligeramente opalescente, esencialmente libre de particulados visibles, e incolora a amarillo pálido. Además, la turbiedad, medida por OD a 405 nm, también puede ser usada para detectar los particulados en solución. Un aumento en OD a 405 nm puede indicar la presencia de particulados, un aumento en la opalescencia, o cambio de color de los artículos de prueba. MFI es usado para medir los particulados subvisibles que son $\geq 2\mu\text{m}$ en tamaño. La concentración de proteína de mAb1 es medida mediante un ensayo RP-UPLC e informado como porcentaje de recuperación de proteína relativa respecto al material inicial. En el ensayo RP-UPLC, mAb1 se eluye de la columna RP como un solo pico. La concentración de proteína es determinada a partir del pico total de mAb1 comparándola con una curva de calibración generada usando los estándares de mAb1. El porcentaje de recuperación es calculado en base a la concentración de proteína medida respecto a la concentración de la proteína inicial.

La estabilidad química se refiere a la formación de formas modificadas de manera covalente (por ejemplo, agregados covalentes, productos de escisión, o formas variantes de carga) y formas modificadas de manera no covalente (por ejemplo, agregados no covalentes) de proteína. Los productos de degradación de alto y bajo peso molecular pueden ser separados del mAb1 nativo mediante los métodos de SE-UPLC y MCE-SDS. El porcentaje de mAb1 degradado en los métodos SE-UPLC y MCE-SDS es calculado a partir de la relación del área de todos los picos no nativos del área total de todos los picos de mAb1. Las formas variantes de carga de mAb1 son resueltas usando CEX-UPLC e iCIEF. En el método CEX-UPLC. Los picos con un tiempo de retención posterior al del pico principal son etiquetados como picos "básicos". En el método iCIEF, los picos enfocados a un pI más bajo que el del pico principal son etiquetados como picos "ácidos", mientras que aquellos enfocados a un pI más alto que el pico principal son etiquetados como picos "básicos".

Ejemplo 4: Efecto de diferentes tampones y pH

El efecto del tampón y pH en la estabilidad térmica en mAb1 fue examinada en las formulaciones líquidas incubando 5 mg/mL mAb1 a 45°C durante 28 días en una serie de sistemas de tampones en rangos de pH variables. Se estudiaron los siguientes pH y sistemas de tampón: acetato (pH 4.5, 5.0, 5.5), histidina (pH 5.5, 6.0, 6.5) y fosfato (pH 6.0, 6.5, 7.0). Basados en los resultados del análisis SE-UPLC, la estabilidad máxima de proteína se observó cuando mAb1 fue formulada entre pH 6.0 y 6.5 en tampón de histidina (Tabla 1).

Tabla 1: Efecto de tampón y pH en la estabilidad de 5mg/mL mAb1 incubado a 45°C durante 28 días.

Formulación	5 mg/mL mAb1, 10 mM Tampón								
Volumen de llenado	0.4 mL								
Contenedor	Frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con un tapón de goma butílico 4432/50 recubierto con Fluro Tec®								
pH/Tampón	Color y apariencia	Turbiedad (aumento en OD a 405nm)	% proteína recuperada por RP-UPLC	Cambio en Pureza por SE-UPLC ^{a)}			Cambio en variante de carga por CEX-UPLC ^{a)}		
				% HMW	% Nativo	% LMW	% Acido	% Principal	% Básico
pH 4.5, acetato	Pasa	0.00	87	5.2	-7.2	2.0	22.1	-15.4	4.3
pH 5.0 Acetato	Pasa	0.00	82	5.0	-5.9	0.9	7.5	-10.9	3.4
pH 5.5 Acetato	Pasa	0.00	90	4.7	-5.4	0.7	12.8	-13.7	0.9
pH 5.5 histidina	Pasa	0.00	97	5.6	-6.4	0.8	10.8	-12.4	1.6
pH 6.0 Histidina	Pasa	0.00	86	1.9	-2.4	0.6	13.4	-12.6	-0.7
pH 6.5 Histidina	Pasa	0.00	84	1.2	-1.8	0.7	25.4	-21.3	-4.1
pH 6.0 fosfato	Pasa	0.01	92	3.7	-4.3	0.6	24.8	-21.8	-3.0
pH 6.5 fosfato	Pasa	0.03	91	4.9	-5.8	0.9	49.6	-40.3	-9.3
pH 7.0 fosfato	Pasa	0.03	95	10.4	-11.6	1.2	56.5	-42.2	-14.3

a) Informado como un cambio relativo en la pureza respecto al material inicial. El material inicial (sin incubación) contiene ≥ 97.2% de pico nativo mediante SE-UPLC y ≥ 49.0% de pico principal mediante CEX-UPLC en todas las formulaciones.
CEX = Intercambio catiónico; DS = sustancia farmacológica; HMW = alto peso molecular; LMW = bajo peso molecular; OD = densidad óptica; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía líquida de ultra rendimiento.

Basado en los resultados del análisis de CEX-UPLC, se observó la estabilidad máxima de la proteína cuando mAb1 fue formulada entre pH 5.5 y 6.0 en tampón de histidina o entre pH 5.0 y 5.5 en tampón de acetato. Estos análisis también revelaron que la agregación (es decir, formación de especies de HMW), fragmentación (es decir, formación de especies de LMW), y formación de variantes de carga fueron las principales rutas de degradación. El tampón de histidina fue

seleccionado como el tampón de formulación porque proporcionó el mejor nivel total de estabilización de proteína con respecto a la formación de especies de HMW y LMW y formación de variantes de carga. Se escogió un pH de 6.0 para la formulación porque la formación de especies de HMW y variantes de carga, las cuales son las mayores rutas de degradación, fueron minimizadas en este pH. Basado en estos resultados, se escogió 10mM de tampón de histidina a un pH de 6.0 para la formulación de mAb1.

Ejemplo 5: Detección de pH en tampones de histidina

El efecto del tampón y pH en la estabilidad térmica en mAb1 fue examinada en las formulaciones líquidas de alta concentración. Se incubaron 150 mg/mL mAb1 a 45°C durante 28 días en una serie de tampones de histidina clasificados en un pH de 5.3, 5.5, 5.8, 5.0 y 6.3, con y sin estabilizadores térmicos. Con 9% de sacarosa, basado en los resultados del análisis SE-UPLC, se observó la máxima estabilidad de proteína cuando mAb1 fue formulada entre pH 5.8 y 6.3 en tampón de histidina (Figura 1). Basado en los resultados del análisis CEX-UPLC, la máxima estabilidad de proteína se observó cuando mAb1 fue formulada entre pH 5.3 y 6.0 en tampón de histidina (Tabla 2).

Tabla 2: Efecto de pH en la estabilidad de 150 mg/mL mAb1 incubado a 45°C durante 28 días.

Formulación	150 mg/mL mAb1, 10 mM histidina								
Volumen de llenado	0.4 mL								
Contenedor	Frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con un tapón de goma butílico 4432/50 recubierto con Fluro Tec®								
pH/estabilizador	Color y apariencia	Turbiedad (aumento en OD a 405nm)	% proteína recuperada por RP-UPLC	Cambio en Pureza por SE-UPLC ^{a)}			Cambio en variante de carga por CEX-UPLC ^{a)}		
				% HMW	% Nativo	% LMW	% Acido	% Principal	% Básico
pH 5.3/ninguno	Falla ^{b)}	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
pH 5.5/ninguno	Falla ^{b)}	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
pH 5.8/ninguno	Falla	0.40	95	46.2	-46.4	0.3	6.4	-10.2	3.9
pH 6.0/ninguno	Falla	0.51	99	41.2	-41.5	0.3	10.6	-7.3	-3.3
pH 6.3/ninguno	Falla	0.65	98	35.0	-35.4	0.4	19.6	-14.3	-5.3
pH 5.3/9% p/v sacarosa	Pasa	0.14	95	41.9	-42.1	0.3	7.9	-11.1	3.2

pH 5.5/9% p/v sacarosa	Pasa	0.16	99	30.8	-31.2	0.4	9.5	-12.5	2.9
pH 5.8/9% p/v sacarosa	Pasa	0.13	100	22.8	-23.3	0.5	9.7	-11.8	2.1
pH 6.0/9% p/v sacarosa	Pasa	0.14	99	19.4	-19.9	0.5	13.5	-14.5	1.0
pH 6.3/9% p/v sacarosa	Pasa	0.15	98	16.9	-17.4	0.5	22.4	-22.1	-0.4

a) Informado como un cambio relativo en la pureza respecto al material inicial. El material inicial (sin incubación) contiene $\geq 94.0\%$ de pico nativo mediante SE-UPLC y $\geq 48.7\%$ de pico principal mediante CEX-UPLC en todas las formulaciones.

b) Muestra gelificada. No se realizó ningún análisis adicional. NA = no aplicable
CEX = Intercambio catiónico; HMW = alto peso molecular; LMW = bajo peso molecular; OD = densidad óptica; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía líquida de ultra rendimiento.

Estos análisis también revelaron que la agregación (es decir, formación de especies HMW), y la formación de variantes de carga fueron las principales rutas de degradación. Un pH de 6.0 fue escogido para la formulación DP porque la formación de especies HMW y variantes de carga, que son las mayores rutas de degradación, fueron minimizadas a este pH. Basado en estos resultados, se escogió 10 mM de tampón de histidina a un pH de 6.0 para la formulación de mAb1 DP de alta concentración.

Ejemplo 6: Selección de protectores contra el estrés por agitación

Los estabilizadores como surfactantes y cosolventes orgánicos son agregados a menudo a las formulaciones de anticuerpos para proteger la proteína de la agregación inducida por agitación. El efecto de los cosolventes orgánicos y surfactante en la estabilidad de estrés por agitación y estabilidad térmica de 5 mg/mL mAb1 fue examinada en formulaciones líquidas. Se evaluaron los siguientes cosolventes y surfactantes: 0.1% polisorbato 20, 0.1% polisorbato 80 y 1.0% PEG3350. Los resultados de los estudios de estabilidad al estrés por agitación se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3: Efecto de cosolventes orgánicos y surfactantes en la estabilidad de 5 mg/mL mAb1 después de agitación (120 min de agitación)

Formulación	5 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0					
Volumen de llenado	0.4 mL					
Contenedor	Frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con un tapón de goma butílico 4432/50 recubierto con Fluro Tec®					
Cosolvente/Surfactante	Color y apariencia		pH	% proteína recuperada	Cambio en Pureza por SE-UPLC ^{a)}	Cambio en variante de carga por CEX-UPLC ^{a)}

		Turbiedad (aumento en OD a 405nm)		por RP- UPLC	% HMW	% Nativo	% LMW	% Acido	% Principal	% Bási co
Sin cosolvente/surfactante	Falla	1.69	6.0	76	15.3	-23.7	-8.4	-2.3	-1.7	3.9
5% (p/v) sacarosa	Falla	1.75	6.0	64	9.4	-12.8	3.4	-1.7	-0.1	1.8
0.1% (p/v) polisorbato 20 ^{b)}	Pasa	0.00	6.0	102	-0.1	-0.8	0.8	0.2	0.2	-0.3
0.1% (p/v) polisorbato 80 ^{b)}	Pasa	0.00	6.0	100	-0.2	-0.5	0.4	0.2	-0.1	-0.1
1% (p/v) PEG3350 ^{b)}	Falla	0.20	6.0	93	0.3	-0.5	0.2	-0.2	-0.3	0.4

a) Informado como un cambio relativo en la pureza respecto al material inicial. El material inicial (sin incubación) contiene ≥ 98.2% de pico nativo mediante SE-UPLC y ≥ 49.1% de pico principal mediante CEX-UPLC en todas las formulaciones.

b) La formulación también contiene 5% sacarosa.
CEX = Intercambio catiónico; HMW = alto peso molecular; LMW = bajo peso molecular; OD = densidad óptica; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía líquida de ultra rendimiento.

El mAb1 era inestable cuando se agitaba mediante vórtice durante 120 minutos en ausencia de un solvente o surfactante orgánico. Después de la agitación mediante vórtice en ausencia de cosolvente o surfactante, la solución se volvió turbia, exhibió un aumento sustancial en la turbiedad y tuvo un aumento del 15.3% en los agregados según lo determinado por SE-UPLC, así como una pérdida del 24% en la recuperación de proteínas por RP-UPLC (Tabla 3). El 1% de PEG3350 no proporcionó suficiente estabilización de mAb1 después de 120 minutos de agitación de vórtice. En presencia de PEG3350 al 1%, la solución se volvió turbia y exhibió un aumento en la turbiedad (Tabla 3). En contraste, 0.1% de polisorbato 20 y 0.1% de polisorbato 80 protegieron a mAb1 de la inestabilidad inducida por la agitación en la misma medida (Tabla 3).

Sin embargo, la formulación conteniendo 0.1% de polisorbato 80 exhibió una cantidad disminuida de agregados en comparación con la formulación que contenía 0.1% polisorbato 20 cuando fue incubado a 45°C (Tabla 4). El 0.1% de polisorbato 80 fue escogido como el surfactante para la formulación de mAb1 DP porque estabilizó la proteína al estrés de agitación, tuvo menos efecto negativo en la estabilidad térmica de proteína que el polisorbato 20 (según lo determinado por ambos análisis de SE-UPLC y CEX-UPLC), y tiene una historia segura de uso en formulaciones de anticuerpos monoclonales.

Ejemplo 7: Selección de protectores contra estrés térmico

Los estabilizadores como sacarosa son agregados a menudo a las formulaciones de anticuerpos para aumentar la estabilidad térmica de la proteína en formulaciones líquidas. Cinco

(5) mg/mL mAb1 en una formulación líquida exhibe una estabilidad mejorada cuando es formulada con 5% de sacarosa e incubada bajo condiciones aceleradas (Tabla 4).

Tabla 4: Efecto en cosolventes orgánicos y surfactantes en la estabilidad de 5 mg/mL mAb1 incubado a 45°C durante 29 días

Formulación	5 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0									
Volumen de llenado	0.4 mL									
Contenedor	Frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con un tapón de goma butílico 4432/50 recubierto con Fluro Tec®									
Cosolvente/Surfactante	Color y apariencia	Turbiedad (aumento en OD a 405nm)	pH	% proteína recuperada por RP-UPLC	Cambio en Pureza por SE-UPLC ^{a)}			Cambio en variante de carga por CEX-UPLC ^{a)}		
					% HMW	% Nativo	% LMW	% Acido	% Principal	% Básico
Sin cosolvente/surfactante	Pasa	0.00	6.1	96	2.8	-3.2	0.5	10.8	-10.7	-0.2
5% (p/v) sacarosa	Pasa	0.01	6.1	99	1.6	-2.0	0.3	12.6	-11.7	-0.9
0.1% (p/v) polisorbato 20 ^{b)}	Pasa	0.00	6.0	92	27.6	-28.4	0.7	0.1	-24.0	23.9
0.1% (p/v) polisorbato 80 ^{b)}	Pasa	0.00	6.1	96	12.8	-14.1	0.9	4.4	-20.4	15.9
1% (p/v) PEG3350 ^{b)}	Pasa	0.00	6.1	90	8.4	-8.0	-0.4	0.4	-25.0	24.5

a) Informado como un cambio relativo en la pureza respecto al material inicial. El material inicial (sin incubación) contiene ≥ 98.2% de pico nativo mediante SE-UPLC y ≥ 49.1% de pico principal mediante CEX-UPLC en las 5 formulaciones.

b) La formulación también contiene 5% sacarosa.
CEX = Intercambio catiónico; HMW = alto peso molecular; LMW = bajo peso molecular; OD = densidad óptica; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía líquida de ultra rendimiento.

Después de la incubación a 45°C durante 29 días, la cantidad relativa de especies de HMW aumentó en 1.7% en la formulación que contiene 5% de sacarosa comparado con un 2.8% de aumento en la formulación de control sin sacarosa. Por esta razón, la sacarosa fue escogida como el estabilizador térmico. Para hacer la formulación isotónica y para maximizar la estabilidad térmica, la concentración de sacarosa aumentó en 10% para la formulación de mAb1.

Ejemplo 8: Optimización de estabilizadores

El objetivo de optimizar los estabilizadores térmicos es identificar los componentes estabilizadores que podrían usarse para desarrollar una formulación DP que soporte una concentración de anticuerpos de hasta 200 mg/ml. 10% de sacarosa fue seleccionado en la formulación inicial. Se encontró que con 10% de sacarosa, la viscosidad de mAb1 fue de

Contenedor /Cierre	Frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con un tapón de goma butílico 4432/50 recubierto con Fluro Tec®									
Material inicial ^{a)}	Pasa	0.00	6.1	100	2.3	97.4	0.4	24.9	50.2	24.9
9% sacarosa, 0.1% PS 80	Pasa	0.00	6.1	101	3.7	95.7	0.7	28.4	47.7	23.9
3% Prolina, 0.1% PS 80	Pasa	0.00	6.1	101	3.7	95.7	0.7	26.5	47.7	25.8

^{a)}pH, los resultados de "Material inicial" de SE-UPLC y CEX-UPLC son los valores promedio de las formulaciones de partida.

Sin embargo, basado en la estabilidad de almacenamiento a -20°C, -30°C y -80°C, se encontró que la formulación con 3% de prolina no era tan estable como las formulaciones con sacarosa (Figura 2). Como se muestra en Figura 2, la formulación F3 (con 5% de sacarosa), fue estable a -20°C, -30°C y -80°C con ≤3% de especies HMW.

El efecto de L-prolina para estabilizar mAb1 fue examinado con la formulación de 50 mg/mL. Después de la incubación a 45°C durante 28 días, la formulación con L-prolina mostró niveles inferiores de especies de HMW respecto a la formulación sin L-prolina, mostrando que L-prolina estabiliza el anticuerpo en una concentración de 50 mg/mL (Tabla 6). Además, el impacto de L-prolina en la estructura de proteína del anticuerpo fue examinada mediante técnicas biofísicas (espectroscopía infrarroja transformada de Fourier, espectroscopía de CD, espectroscopía de emisión de fluorescencia y calorimetría diferencial de barrido). Los resultados mostraron que L-prolina no alteró la estructura secundaria y terciaria del anticuerpo.

Tabla 6: Efecto de los estabilizadores en la estabilidad de 50 mg/mL de mAb1 después de incubación a 45°C durante 28 días.

Formulación	50mg/mL mAb1, 10 mM L-histidina, 5 % sacarosa, pH 6.0, 0.2% polisorbato 80									
Volumen de llenado	0.6 mL									
Contenedor/Cierre	Frasco de vidrio tipo 1 de 2 ml con un tapón de clorobutilo 4432/50 recubierto con Fluor Tec®									
Estabilizador (% p/v)	Color y apariencia	Turbiedad (aumento en OD a 405nm)	pH	% proteína recuperada por RP-UPLC	Cambio de Pureza por SE-UPLC ^{a)}			Cambio en Variantes cargadas por CEX-UPLC ^{a)}		
					% HMW	% Monómero	% LMW	% Acido	% Principal	% Básico
--	Pasa	0.02	6.0	96	12.1	-12.7	0.6	10.8	-11.9	1.0
1.5% L-prolina	Pasa	0.02	6.1	96	11.3	-11.9	0.6	11.0	-11.8	0.8
3% L-prolina	Pasa	0.01	6.0	96	10.9	-11.5	0.6	12.8	-12.9	0.1

Estabilizador (% p/v)	Concentración mAb1 (mg/mL)	Color y apariencia	Turbiedad (aumento en OD a 405nm)	pH	% proteína recuperada por RP-UPLC	Cambio de Pureza por SE-UPLC ^{a)}			Cambio en Variantes cargadas por CEX-UPLC ^{a)}		
						% HMW	% Nativo	% LMW	% Acido	% Principal	% Básico
9% Sacarosa	150	Pasa	0.04	6.1	102	6.9	-7.5	0.5	9.4	-9.7	0.3
3% L-prolina	175	Pasa	0.03	6.2	103	11.7	-12.3	0.6	12.1	-10.7	-1.4
5% Sacarosa, 1.5% L-prolina	175	Pasa	0.03	6.1	103	8.8	-9.4	0.7	11.4	-10.2	-1.2

a) Informado como un cambio en la pureza respecto al material inicial. El material inicial (sin incubación) contiene $\geq 97.3\%$ de pico nativo mediante SE-UPLC y $\geq 49.6\%$ de pico principal mediante CEX-UPLC en las 3 formulaciones.
CEX = Intercambio catiónico; DS = sustancia farmacológica, HMW = alto peso molecular; LMW = bajo peso molecular; OD = densidad óptica; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía líquida de ultra rendimiento.

Después de la incubación a 40°C durante 28 días, 9% de sacarosa proporcionó la mejor estabilización y tuvo la mayor viscosidad entre las formulaciones de alta concentración. La formulación del 5% de sacarosa/1.5% L-prolina ocupó el segundo lugar para estabilidad después de 28 días a 40°C. Después de la incubación a 25°C durante tres meses, la estabilidad de mAb1 fue casi la misma en todas las formulaciones examinadas; sin embargo, la formulación con 5% de sacarosa/1.5% L-prolina fue ligeramente mejor que las otras dos formulaciones. Sin embargo, tras incubación a -20°C, -30° y -80°C, la sacarosa a 5% y a 9% proporcionó mejor estabilidad que 3% de prolina (Figura 3). La viscosidad de 175mg/mL mAb1 son 5% de sacarosa/1.5% L-prolina tiene una viscosidad de 14 cP a 20°C. Para proporcionar una formulación que rinda una solución isotónica y logre el mejor equilibrio entre estabilidad y viscosidad, se seleccionó 5% de sacarosa/1.5% L-prolina para el desarrollo de una formulación de DP de fase tardía de anticuerpos.

Ejemplo 9: Selección de modificadores de viscosidad

La viscosidad de las formulaciones de proteína aumenta exponencialmente a medida que aumenta la concentración de proteína. Cuando la viscosidad empieza a exceder aproximadamente 10 a 15 cP a 20°C, la viscosidad de la formulación debe ser tomada en consideración cuando se desarrolla una formulación: esto es simplemente porque la viscosidad se correlaciona con la facilidad de inyección a través de una jeringa precargada (PFS) u otro dispositivo de administración basado en agujas; más importante manteniendo una razonablemente baja viscosidad es crítica para el desarrollo de un dispositivo de administración, como un autoinyector. El efecto de los

excipientes en la viscosidad de la formulación fue examinado en formulación líquida con los siguientes potenciales modificadores de viscosidad, prolina, arginina HCl, histidina HCl, acetato de magnesio y NaCl. Figura 4 resume la viscosidad de 150 mg/mL mAb1 con los modificadores de viscosidad. Arginina HCl, histidina HCl, acetato de magnesio y NaCl a 25-100 mM disminuyen la viscosidad de 150 mg/mL de formulaciones de mAb1.

El impacto de los modificadores de viscosidad en la estabilidad de la formulación de mAb1 también fue examinado. 150 mg/mL de formulaciones de mAb1 con modificadores de viscosidad como arginina HCl, histidina HCl, acetato de magnesio y NaCl fueron preparadas e incubadas a 45°C durante 28 días. Los resultados se muestran en Figura 5. Se encontró que la máxima estabilidad de la proteína se observó cuando mAb1 fue formulada sin los modificadores de viscosidad; todas estas sales modificadoras de viscosidad impactaron negativamente la estabilidad de mAb1. Por lo tanto, las sales no se incluyeron en la formulación final.

L-prolina, como un estabilizador, minimizó la viscosidad de la solución para concentraciones de anticuerpos en o aproximadamente 50 mg/mL. Los resultados de los estudios de estabilidad acelerada para anticuerpos de alta concentración con cantidades variables de L-prolina, con y sin sacarosa, se resumen en la Tabla 7. Después de la incubación a 25°C durante 3 meses, la formulación con 5% de sacarosa/1.5% L-prolina proporcionó una estabilidad ligeramente mejorada con respecto a las otras dos formulaciones con respecto a la formación de especies de HMW. Después de la incubación a 40°C durante 28 días, la formulación que contiene 9% de sacarosa proporcionó la mejor estabilización, y la formulación con 5% de sacarosa/1.5% L-prolina ocupó el segundo lugar. La formulación con sacarosa al 9% tiene una viscosidad de 20 cP a 175 mg/mL de anticuerpo, mientras que la viscosidad de la formulación a 175 mg/mL con sacarosa al 5%/1.5% L-prolina tiene una viscosidad de 14 cP a 20°C. Agregar L-prolina a la formulación fue importante para disminuir la viscosidad en elevadas concentraciones de proteína como también estabilizar el anticuerpo.

En resumen, 5% sacarosa/1.5 L-prolina fue seleccionada para la formulación de anticuerpos de alta concentración y 50 mg /mL. Esta combinación de excipientes logró una formulación isotónica con estabilidad y viscosidad aceptable en todas las concentraciones de anticuerpos probados (hasta 175 mg/mL).

Ejemplo 10: Optimización de concentración de polisorbato (PS)

Durante el desarrollo de la formulación, se observó una formación de especies de mayor peso molecular y un aumento en la turbiedad cuando la formulación de mAb1 fue agitada sin

surfactante. La proteína fue estabilizada para agitación mediante la adición de polisorbato 80 (PS 80). Durante el desarrollo de la formulación líquida de mAb1 de alta concentración, se observó inestabilidad a la agitación como un aumento en las especies de mayor peso molecular. Se llevó a cabo un estudio para determinar la cantidad mínima de polisorbato 80 necesario para proteger hasta 175 mg/mL mAb1 de la inestabilidad inducida por agitación. Las formulaciones en este estudio contenían 5% sacarosa y 1.5% L-prolina de manera que el efecto de polisorbato 80 pudiera ser estudiado con una composición de formulaciones que fuera más representativa de la formulación final. Las concentraciones nominales de polisorbato 80 incluidas en el estudio fueron 0%, 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08%, 0.1%, 0.15% y 0.2% (p/v). En ausencia de polisorbato 80, la solución se volvió turbia y exhibió un aumento sustancial en la turbiedad después de la agitación por vórtice. Se observó una reducción dependiente de la concentración de polisorbato 80 en la cantidad de % HMW después de 120 minutos de agitación. Se encontró que una concentración de 0.15 – 0.2% de polisorbato 80 era suficiente para estabilizar 150 mg/mL y 175 mg/mL mAb1 a la agregación inducida por agitación (Tabla 8). La adición de 0.2% (p/v) (valor nominal) de polisorbato 80 evitó completamente la formación de especies HMW después de la agitación durante 120 minutos.

Tabla 8: Estabilidad de 150 mg/mL y 175 mg/mL mAb1 con PS 80 después de 120 minutos de agitación

Volumen de llenado	0.4 mL					
Contenedor/cierre	Frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con tapón de goma butílico 4432/50 recubierto con Fluor Tec®					
Formulación	[PS80]	Color y apariencia	Turbiedad (Aumento en OD a 405nm)	pH	% mAb1 recuperado por RP-UPLC	Aumento en % HMW por SE-UPLC
150 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 9% sacarosa	0.00	Falla	0.38	6.0	No aplicable	
	0.02	Pasa	0.00	6.0	97	4.7
	0.04	Pasa	0.00	6.0	100	0.3
	0.06	Pasa	0.00	6.0	102	0.3
	0.08	Pasa	0.04	6.0	99	0.0
	0.10	Pasa	0.01	6.0	101	0.1
	0.15	Pasa	0.00	6.0	98	0.1
	0.20	Pasa	0.00	6.0	106	0.1
175 mg/mL mAb1, 10mM histidina, pH 6.0, 3% prolina	0.00	Falla	0.38	6.0	No aplicable	
	0.02	Pasa	0.06	6.1	100	7.0
	0.04	Pasa	0.00	6.0	97	2.4
	0.06	Pasa	0.01	6.1	700	2.3
	0.08	Pasa	0.03	6.1	98	0.9
	0.10	Pasa	0.00	6.1	102	0.4
	0.15	Pasa	0.00	6.1	102	0.1
	0.20	Pasa	0.00	6.1	101	0.1
	0.00	Falla	0.36	6.1	No aplicable	

175 mg/mL mAb1, 10mM histidina, pH 6.0, 5% sacarosa, 1.5% prolina	0.02	Pasa	0.01	6.1	97	3.5
	0.04	Pasa	0.01	6.1	98	2.0
	0.06	Pasa	0.01	6.1	100	1.3
	0.08	Pasa	0.01	6.1	99	1.0
	0.10	Pasa	0.01	6.0	102	0.3
	0.15	Pasa	0.00	6.1	101	0.2
	0.20	Pasa	0.00	6.1	98	0.0

Tabla 9 detalla el efecto de concentración de polisorbato 80 en la estabilidad de 175 mg/mL mAb1 después de agitación (120 minutos de vórtice).

Tabla 9: Efecto de Concentración de polisorbato 80 en la estabilidad de 175 mg/mL mAb1 después de agitación (120 minutos de vórtice).

Formulación	175 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 5 % /p/v) sacarosa, 1.5 % (p/v) L-prolina									
Volumen de llenado	0.4 mL									
Contenedor /Cierre	Frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con un tapón de goma butílico 4432/50 recubierto con Fluro Tec®									
Conc. Nominal PS 80 (% p/v)	Color y apariencia	Turbiedad (aumento en OD a 405nm)	pH	% proteína recuperada por RP-UPLC	Cambio en Pureza por SE-UPLC ^{a)}			Cambio en variante de carga por CEX-UPLC ^{a)}		
					% HMW	% Nativo	% LMW	% Acido	% Principal	% Básico
0.00%	Falla	0.36	6.0	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
0.02%	Pasa	0.01	6.0	97	3.5	-3.5	0.0	-0.6	0.8	-0.1
0.04%	Pasa	0.01	6.0	98	2.0	-2.0	0.0	0.1	-0.2	-0.2
0.06%	Pasa	0.01	6.0	100	1.3	-1.3	0.0	-0.2	0.3	-0.1
0.08%	Pasa	0.01	6.0	99	1.0	-1.0	0.0	-0.2	0.0	0.0
0.10%	Pasa	0.02	6.0	102	0.3	-0.3	0.0	0.2	0.0	0.0
0.15%	Pasa	0.00	6.1	101	0.2	-0.2	0.0	0.2	-0.3	0.1
0.20%	Pasa	0.00	6.1	98	0.0	0.0	0.0	0.0	-0.1	0.2

a) Informado como un cambio relativo en la pureza respecto al material inicial. El material inicial (sin incubación) contiene ≥ 97.4% de pico nativo mediante SE-UPLC y ≥ 48.2% de pico principal mediante CEX-UPLC en todas las formulaciones.
CEX = Intercambio catiónico; HMW = alto peso molecular; LMW = bajo peso molecular; NA = no disponible; OD = densidad óptica; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía líquida de ultra rendimiento.

La capacidad de 0.2% (p/v) de polisorbato 80 para proteger mAb1 de la inestabilidad basada en agitación fue confirmada por otro estudio con la formulación final a 50 mg/mL (Tabla 10).

Tabla 10: Efecto de Concentración de PS80 en la estabilidad de 50 mg/mL mAb1 después de agitación (120 minutos de vórtice)

Formulación	50 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 5% (p/v) sacarosa, 1.5 % (p/v) L-prolina									
Volumen de llenado	0.6 mL									
Contenedor /Cierre	Frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con un tapón de goma butílico 4432/50 recubierto con Fluro Tec®									
Conc. Nominal PS 80 (% p/v)	Color y apariencia	Turbiedad (aumento en OD a 405nm)	pH	% proteína recuperada por RP-UPLC	Cambio en Pureza por SE-UPLC ^{a)}			Cambio en variante de carga por CEX-UPLC ^{a)}		
					% HMW	% Monómero	% LMW	% Acido	% Principal	% Básico
0.00%	Pasa	0.01	6.1	99	8.0	-8.0	0.0	1.7	-1.8	-0.3
0.02%	Pasa	0.00	6.1	99	0.0	0.1	-0.1	-0.2	0.1	-0.2

a) Informado como un cambio relativo en la pureza respecto al material inicial. El material inicial (sin incubación) contiene ≥ 98.5% de pico monómero mediante SE-UPLC y ≥ 52.8% de pico principal mediante CEX-UPLC en las cinco formulaciones.
CEX = Intercambio catiónico; DS = sustancia farmacológica; HMW = alto peso molecular; LMW = bajo peso molecular; NA = no disponible; OD = densidad óptica; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía líquida de ultra rendimiento.

En base a estos resultados, 0.2% (p/v) de polisorbato 80 fue seleccionado como el surfactante porque proporciona suficiente estabilización para evitar la formación de especies de HMW bajo estrés de agitación.

Ejemplo 11: Almacenamiento y estabilidad al estrés de formulaciones ejemplares.

La estabilidad de almacenamiento de formulaciones de mAb1 de 50 mg/mL y 175 mg/mL en frascos de vidrio se muestran en la Tabla 11 y Tabla 12, y los datos de estabilidad acelerada y al estrés de las dos formulaciones se muestran en la Tabla 13 y Tabla 14, respectivamente. Los estudios de estabilidad de la investigación demostraron que las formulaciones de mAb1 de 50 mg/mL y 175 mg/mL en frascos de vidrio son estables durante al menos 24 meses cuando son almacenados entre 2°C y 8°C. Además, la formulación de mAb1 de 50 mg/mL también exhibió una excelente estabilidad en condiciones aceleradas y de estrés. La formulación es estable cuando es almacenada a 25°C durante al menos 3 meses y a 40°C durante al menos 7 días, lo que demuestra la compatibilidad de la formulación de 50 mg/mL con los componentes de cierre del contenedor primario. No se observaron cambios apreciables en el color o apariencia, turbiedad, material particulado, pH, concentración de proteínas, pureza medida por SE-UPLC o CEX-UPLC e iCIEF, y la potencia se mantuvo en estas condiciones.

Tabla 11: Estudio de estabilidad de la formulación de 50 mg/mL almacenada a 2-8°C.

Formulación		50 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 5% (p/v) sacarosa, 1.5% (p/v) L-prolina y 0.2% (p/v) polisorbato 80								
Volumen de llenado		1.2 mL								
Contenedor /Cierre		Frasco de vidrio tipo 1 de 3 ml con un tapón de clorobutilo 4432/50 recubierto con Fluro Tec (R) de 13 mm								
Ensayo		Longitud de almacenamiento a 2-8°C (meses)								
		0	1	3	6	9	12	18	24	36
Color y Apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	--
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	--
Turbiedad (NTU mediante nefelometría)		7.41	6.01	6.15	6.61	6.03	6.48	6.29	5.83	--
pH		6.0	6.0	6.0	6.1	6.0	6.0	6.0	6.0	--
Análisis particulado o subvisible por HIAC (N/mL)	≥10µm	2	NR	21	8	NR	11	15	21	--
	≥25µm	0	NR	2	0	NR	1	1	1	--
Análisis particulado o subvisible por MFI (N/mL)	2 a 10 µm	248	NR	887	187	NR	607	125	776	--
	≥10µm	15	NR	26	44	NR	15	19	8	--
	≥25µm	4	NR	3	17	NR	1	3	1	--
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	100	98	103	101	105	98	98	--

Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.2	NR	NR	98.7	NR	98.9	99.2	99.2	--
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	NR	100	NR	99.6	99.8	99.9	--
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.5	0.3	0.4	0.4	0.4	0.5	0.5	0.5	--
	% Monómero	99.2	99.1	99.2	99.2	99.1	99.2	99.2	99.1	--
	% LMW	0.4	0.5	0.4	0.4	0.5	0.3	0.4	0.4	--
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	18.9	19.0	18.7	19.1	19.4	19.1	20.7	20.5	--
	% Principal	53.9	53.5	54.5	53.7	53.6	55.8	53.8	53.4	--
	% Básico	27.3	27.6	26.8	27.2	27.1	25.1	25.5	26.0	--
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	31.9	NR	NR	32.3	NR	33.9	33.1	34.0	--
	% Principal	54.7	NR	NR	54.2	NR	54.0	54.0	53.9	--
	% Básico	13.5	NR	NR	13.5	NR	12.1	12.9	12.1	--
% potencia relativa (bioensayo)		126	NR	NR	127	NR	125	110	104	--

CEX = Intercambio catiónico; DS = sustancia farmacológica; HMW = alto peso molecular; iCIEF: enfoque isoelectrico capilar con imágenes; LMW = bajo peso molecular; MFI: imágenes de microflujo; Monómero, anticuerpo intacto; NR: No requerido; OD = densidad óptica; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía liquida de ultra rendimiento.

Tabla 12: Estudio de estabilidad de la formulación de 175 mg/ml almacenada a 2-8°C.

Formulación		175mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 5% (p/v) sacarosa, 1.5% (p/v) L-prolina y 0.2% (p/v) polisorbato 80								
Volumen de llenado		1.2 mL								
Contenedor /Cierre		Frasco de vidrio tipo 1 de 3 ml con un tapón de clorobutilo 4432/50 recubierto con Fluro Tec (R) de 13 mm								
Ensayo		Longitud de almacenamiento a 5°C (meses)								
		0	1	3	6	9	12	18	24	36
Color y Apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	--
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	--
Turbiedad (NTU mediante nefelometría)		6.72	6.95	6.57	6.54	6.62	7.01	6.67	6.87	--
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.1	--
Análisis partícula do subvisibl e por HIAC (N/mL)	≥10µm	10	NR	28	131	NR	30	35	55	--
	≥25µm	0	NR	11	56	NR	1	2	3	--

Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Turbiedad (NTU mediante nefelometría)		7.41	6.05	6.54	6.90	6.10	6.60	6.93
pH		6.0	6.0	6.0	6.1	6.0	6.0	6.0
Análisis partícula do subvisible por HIAC (#/mL)	≥10µm	2	NR	17	21	NR	NR	18
	≥25µm	0	NR	0	1	NR	NR	1
Análisis partícula do subvisible por MFI (#/mL)	2 a 10 µm	248	NR	1618	1531	NR	NR	1543
	≥10µm	15	NR	29	47	NR	NR	41
	≥25µm	4	NR	2	15	NR	NR	15
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	100	100	103	103	102	98
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.2	NR	99.1	98.8	NR	NR	98.9
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	99.5	100	NR	NR	99.5
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.5	0.4	0.6	0.7	0.7	0.9	1.4
	% Monómero	99.2	99.0	99.1	98.8	98.9	98.5	97.9
	% LMW	0.4	0.5	0.3	0.5	0.5	0.6	0.7
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	18.9	19.3	21.8	27.0	19.9	22.5	27.2
	% Principal	53.9	53.4	52.1	48.3	52.3	50.1	46.8
	% Básico	27.3	27.4	26.1	24.8	27.8	27.4	26.0
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	31.9	NR	38.1	43.7	NR	NR	45.4
	% Principal	54.7	NR	48.6	44.3	NR	NR	42.1
	% Básico	13.5	NR	13.3	12.0	NR	NR	12.5
% potencia relativa (bioensayo)		126	NR	NR	120	NR	NR	99

CEX = Intercambio catiónico; DS = sustancia farmacológica; HMW = alto peso molecular; iCIEF: enfoque isoeléctrico capilar con imágenes; LMW = bajo peso molecular; MFI: imágenes de microflujo; Monómero, anticuerpo intacto; NR: No requerido; OD = densidad óptica; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía líquida de ultra rendimiento.

Tabla 14: Estudio de estabilidad de la formulación de 175 mg/mL almacenada en condiciones aceleradas y de estrés

Formulación	175 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 5% (p/v) sacarosa, 1.5% (p/v) L-prolina y 0.2 % /p/v) polisorbato 80
-------------	---

Volumen de llenado		1.2 mL						
Contenedor /Cierre		Frasco de vidrio tipo 1 de 3 ml con un tapón de clorobutilo 4432/50 recubierto con Fluro Tec (R) de 13 mm						
			Almacenamiento 25°C/60% HR (Meses)			Almacenamiento 40°C (días)		
Ensayo		0	1	3	6	7	14	28
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
Turbiedad (NTU mediante nefelometría)		6.72	6.77	6.82	6.99	6.90	7.30	7.56
pH		6.0	6.0	6.0	6.1	6.0	5.9	6.0
Análisis partícula subvisible por HIAC (#/mL)	≥10µm	10	NR	28	58	NR	NR	97
	≥25µm	0	NR	13	16	NR	NR	44
Análisis partícula subvisible por MFI (#/mL)	2 a 10 µm	144	NR	623	277	NR	NR	1131
	≥10µm	22	NR	25	8	NR	NR	531
	≥25µm	1	NR	3	2	NR	NR	3
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	95	97	99	98	99	95
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	97.9	NR	NR	97.4	NR	NR	97.5
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	NR	99.7	NR	NR	99.4
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.6	0.9	1.2	1.5	1.7	2.6	3.9
	% Monómero	99.1	98.6	98.5	98.0	97.7	96.8	95.5
	% LMW	0.4	0.5	0.3	0.6	0.6	0.7	0.6
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	18.7	18.9	21.3	26.2	19.7	22.0	23.9
	% Principal	53.6	54.4	52.3	48.3	51.7	50.1	49.4
	% Básico	27.8	26.7	26.4	25.5	28.6	27.9	26.7
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	31.8	NR	37.0	45.0	NR	NR	47.3
	% Principal	54.6	NR	50.3	43.3	NR	NR	39.2
	% Básico	13.6	NR	12.7	11.7	NR	NR	13.5
% potencia relativa (bioensayo)		102	NR	NR	123	NR	NR	60

CEX = Intercambio catiónico; DS = sustancia farmacológica; HMW = alto peso molecular; iCIEF: enfoque isoelectrico capilar con imágenes; LMW = bajo peso molecular; MFI: imágenes de microflujo; Monómero, anticuerpo intacto; NR: No requerido; OD = densidad óptica; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía líquida de ultra rendimiento.

Ejemplo 12: Estabilidad de formulaciones de mAb1 que comprenden tampón de histidina, sacarosa y polisorbato.

Las Tablas 15 a 24 resumen la estabilidad de almacenamiento de las formulaciones mAb1 ejemplares que comprenden 10 mM de tampón de histidina, a un pH de 6.0, sacarosa y polisorbato.

Tabla 15: Estudio de estabilidad de la formulación mAb1 almacenada a -80°C.

Formulación		72.2 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 5 % (p/v) sacarosa					
Volumen de llenado		1.0 mL					
Contenedor /Cierre		Frasco de policarbonato de 5 ml con un tapón de rosca de polipropileno recubierto de silicona.					
Ensayo		Longitud de almacenamiento a -80C (meses)					
		0	1	3	6	9	12
Color y Apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pH		6.2	6.3	6.2	6.1	6.2	6.1
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	94	95	98	95	94
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.5	NR	NR	99.5	NR	99.2
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	NR	100	NR	99.8
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.7	0.7	0.6	0.6	0.7	0.6
	% Nativo	98.7	98.8	98.9	98.7	98.9	98.8
	% LMW	0.6	0.6	0.5	0.6	0.4	0.6
Análisis de variante de carga por	% Acido	22.2	22.2	22.6	23.2	24.1	23.5
	% Principal	49.7	49.8	48.9	46.8	45.2	44.1
	% Básico	28.1	28.0	28.5	30.0	30.7	32.4

CEX-UPLC							
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	38.9	NR	NR	39.1	NR	37.5
	% Principal	56.5	NR	NR	56.2	NR	57.2
	% Básico	4.6	NR	NR	4.7	NR	5.3
% potencia relativa (bioensayo)		95	NR	NR	81	NR	120

CEX = Intercambio catiónico; HMW = alto peso molecular; iCIEF: enfoque isoeléctrico capilar con imágenes; LMW = bajo peso molecular; MCE-SDS = microchip electroforesis capilar-dodecil sulfato de sodio; MFI: imágenes de microflujo; NR: No requerido; OD = densidad óptica; HR = Humedad relativa; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía líquida de ultra rendimiento.

Tabla 16: Estudio de estabilidad de la formulación mAb1 almacenada a -30°C.

Formulación		72.2 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 5 % (p/v) sacarosa					
Volumen de llenado		1.0 mL					
Contenedor /Cierre		Frasco de policarbonato de 5 ml con un tapón de rosca de polipropileno recubierto de silicona.					
Ensayo		Longitud de almacenamiento a -30C (meses)					
		0	1	3	6	9	12
Color y Apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
pH		6.2	6.3	6.2	6.1	6.2	6.1
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	93	95	100	96	96
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.5	NR	NR	99.1	NR	99.2
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	NR	100	NR	99.8
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.7	0.7	0.6	0.7	0.7	0.6
	% Nativo	98.7	98.8	99.0	98.7	98.9	98.8
	% LMW	0.6	0.5	0.4	0.6	0.4	0.6
Análisis de variante de carga por	% Acido	22.2	22.2	22.5	23.4	24.2	23.4
	% Principal	49.7	49.6	48.9	46.6	45.6	44.1
	% Básico	28.1	28.0	28.6	30.0	30.2	32.5

CEX-UPLC							
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	38.9	NR	NR	38.2	NR	37.8
	% Principal	56.5	NR	NR	56.3	NR	56.6
	% Básico	4.6	NR	NR	5.5	NR	5.7

Tabla 17: Estudio de estabilidad de la formulación mAb1 almacenada a -20°C.

Formulación		72.2 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 5% (p/v) sacarosa					
Volumen de llenado		1.0 mL					
Contenedor /Cierre		Frasco de policarbonato de 5 ml con un tapón de rosca de polipropileno recubierto de silicona.					
Ensayo		Longitud de almacenamiento a -20C (meses)					
		0	1	3	6	9	12
Color y Apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01
pH		6.2	6.3	6.2	6.1	6.1	6.2
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	95	97	101	98	98
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.5	NR	NR	99.5	NR	99.3
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	NR	100	NR	99.9
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.7	0.7	07	0.7	0.8	0.7
	% Nativo	98.7	98.8	98.9	98.6	98.8	98.8
	% LMW	0.6	0.5	0.5	0.7	0.4	0.6
Análisis de variante	% Acido	22.2	22.4	22.3	22.4	24.6	23.4
	% Principal	49.7	49.7	49.2	47.6	45.5	44.2

de carga por CEX-UPLC	% Básico	28.1	27.9	28.5	30.0	30.0	32.5
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	38.9	NR	NR	38.6	NR	38.6
	% Principal	56.5	NR	NR	56.8	NR	56.2
	% Básico	4.6	NR	NR	4.6	NR	5.3
% potencia relativa (bioensayo)		95	NR	NR	96	NR	111

Tabla 18: Estudio de estabilidad de la formulación mAb1 – Efecto de Condiciones aceleradas

Formulación		72.2 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 5% (p/v) sacarosa						
Volumen de llenado		1.0 mL						
Contenedor /Cierre		Frasco de polycarbonato de 5 ml con un tapón de rosca de polipropileno recubierto de silicona.						
Ensayo			Almacenamiento 5°C (días)		Almacenamiento 25°C/60% HR (días)		Almacenamiento 40°C/75% HR (días)	
		T = 0	28	56	14	28	14	28
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.01	0.01	0.02	0.01	0.03	0.05
pH		6.2	6.2	6.1	6.2	6.2	6.2	6.1
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	96	100	97	100	105	113
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.5	NR	99.1	NR	99.5	NR	99.1
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	100	NR	99.2	NR	98.7
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.7	0.9	1.1	1.4	1.7	3.1	4.6
	% Nativo	98.7	98.5	98.4	98.0	97.7	96.1	94.6

	% LMW	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.8	0.9
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	22.2	22.2	22.3	22.0	22.6	25.6	30.8
	% Principal	49.7	49.8	48.9	49.6	49.1	46.0	41.7
	% Básico	28.1	28.1	28.8	28.4	28.3	28.3	27.5
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	38.9	NR	39.0	NR	41.1	NR	58.2
	% Principal	56.5	NR	56.8	NR	53.8	NR	36.3
	% Básico	4.6	NR	4.2	NR	5.1	NR	5.5
% potencia relativa (bioensayo)		95	NR	95	NR	84	NR	87

Tabla 19: Estudio de estabilidad de la formulación mAb1 almacenada a -80°C.

Formulación		25 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 10 % (p/v) sacarosa, 0.1 % polisorbato 80					
Volumen de llenado		1.0 mL					
Contenedor /Cierre		Frasco de policarbonato de 5 ml con un tapón de rosca de polipropileno recubierto de silicona.					
Ensayo		Longitud de almacenamiento a -80C (meses)					
		0	1	3	6	9	12
Color y Apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
pH		6.1	6.1	6.1	6.0	6.0	6.0
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	100	97	95	100	99
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.5	NR	NR	99.4	NR	99.5
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	NR	100	NR	100
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
	% Nativo	98.6	98.7	98.6	98.6	98.8	98.7
	% LMW	0.6	0.5	0.6	0.6	0.5	0.5

Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	22.8	23.0	23.3	23.5	23.9	25.4
	% Principal	47.3	47.3	46.2	45.3	44.2	44.2
	% Básico	30.0	29.8	30.6	31.2	31.9	30.4
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	40.1	NR	NR	38.1	NR	41.3
	% Principal	56.1	NR	NR	57.4	NR	54.1
	% Básico	3.8	NR	NR	4.6	NR	4.6
% potencia relativa (bioensayo)		112	NR	NR	130	NR	107

Tabla 20: Estudio de estabilidad de la formulación mAb1 almacenada a -30°C.

Formulación		25 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 10 % (p/v) sacarosa, 0.1 % polisorbato 80					
Volumen de llenado		1.0 mL					
Contenedor /Cierre		Frasco de policarbonato de 5 ml con un tapón de rosca de polipropileno recubierto de silicona.					
Ensayo		Longitud de almacenamiento a -30C (meses)					
		0	1	3	6	9	12
Color y Apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.01
pH		6.1	6.1	6.1	6.0	6.1	6.0
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	100	102	97	100	102
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.5	NR	NR	99.1	NR	99.5
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	NR	100	NR	100
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
	% Nativo	98.6	98.7	98.6	98.7	98.8	98.7
	% LMW	0.6	0.5	06	0.6	0.4	0.6

Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	22.8	23.1	22.9	23.5	23.7	25.1
	% Principal	47.3	47.1	46.5	45.3	44.4	44.4
	% Básico	30.0	29.8	30.6	31.2	31.9	30.5
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	40.1	NR	NR	38.0	NR	41.3
	% Principal	56.1	NR	NR	57.3	NR	53.3
	% Básico	3.8	NR	NR	4.7	NR	5.4

Tabla 21: Estudio de estabilidad de la formulación mAb1 almacenada a -20°C.

Formulación		25 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 10 % (p/v) sacarosa, 0.1 % polisorbato 80					
Volumen de llenado		1.0 mL					
Contenedor /Cierre		Frasco de polycarbonato de 5 ml con un tapón de rosca de polipropileno recubierto de silicona.					
Ensayo		Longitud de almacenamiento a -20C (meses)					
		0	1	3	6	9	12
Color y Apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00
pH		6.1	6.1	6.1	6.0	6.1	6.0
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	99	102	97	106	102
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.5	NR	NR	99.4	NR	99.4
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	NR	100	NR	99.0
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.8	0.8	0.8	0.8	0.7	0.8
	% Nativo	98.6	98.7	98.6	98.7	98.8	98.7
	% LMW	0.6	0.5	0.6	0.6	0.4	0.6

Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	22.8	22.9	23.5	23.6	24.3	25.2
	% Principal	47.3	47.3	46.0	45.2	43.8	43.9
	% Básico	30.0	29.8	30.6	31.2	31.9	30.8
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	40.1	NR	NR	38.4	NR	41.6
	% Principal	56.1	NR	NR	57.9	NR	53.3
	% Básico	3.8	NR	NR	3.7	NR	5.1
% potencia relativa (bioensayo)		112	NR	NR	120	NR	131

Tabla 22: Estudio de estabilidad de la formulación mAb1 – Efecto de Condiciones aceleradas

Formulación		25 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 10 % (p/v) sacarosa, 0.1 % polisorbato 80						
Volumen de llenado		1.0 mL						
Contenedor /Cierre		Frasco de policarbonato de 5 ml con un tapón de rosca de polipropileno recubierto de silicona.						
Ensayo		Sin almacenamiento	Almacenamiento 5°C (días)		Almacenamiento 25°C/60 % HR (días)		Almacenamiento 40°C/75 % HR (días)	
		T = 0	28	56	14	28	14	28
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.03
pH		6.1	6.1	6.0	6.1	6.1	6.0	6.0
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	101	102	106	107	113	114
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.5	NR	99.1	NR	99.5	NR	99.3
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	100	NR	100	NR	99.1
	% HMW	0.8	0.7	0.7	0.9	0.9	3.4	5.0

Pureza por SE-UPLC	% Nativo	98.6	98.8	98.7	98.6	98.6	95.7	93.7
	% LMW	0.6	0.5	0.6	0.5	0.6	0.9	1.3
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	22.8	22.8	23.3	22.6	22.8	29.6	32.5
	% Principal	47.3	47.3	46.1	47.2	47.0	39.5	36.4
	% Básico	30.0	29.9	30.6	30.2	30.2	30.9	31.1
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	40.1	NR	39.8	NR	40.2	NR	53.7
	% Principal	56.1	NR	57.0	NR	55.9	NR	42.2
	% Básico	3.8	NR	3.2	NR	3.9	NR	4.0
% potencia relativa (bioensayo)		112	NR	103	NR	91	NR	79

Tabla 23: Estudio de estabilidad de la formulación mAb1 almacenada a 5°C.

Formulación		25 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, 10 % (p/v) sacarosa, 0.1 % (p/v) polisorbato 80, pH 6.0					
Volumen de llenado		1.0 mL					
Contenedor /Cierre		Frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con tapones West S2-451 4432/50 GRY B2-40 recubiertos con Fluro Tec (R) de 13 mm					
		Longitud de almacenamiento a 5°C (meses)					
Ensayo		0	1	3	6	9	12
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.01	0.01	0.00
pH		6.2	6.1	6.1	6.1	6.0	6.1
Análisis particulado por MFI (partículas/mL)	2 a 10 µm	823	NR	NR	2169	NR	29331
	≥10µm	15	NR	NR	10	NR	56
	≥25µm	0	NR	NR	3	NR	5
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	100	98	101	102	90
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.4	NR	NR	99.5	NR	99.2
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	NR	100	NR	100

Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.7	0.7	0.7	0.8	0.9	0.9
	% Nativo	98.7	98.8	98.7	98.6	98.6	98.5
	% LMW	0.6	0.5	0.6	0.6	0.5	0.6
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	23.0	22.8	23.5	22.4	24.1	22.4
	% Principal	48.5	48.6	46.2	47.2	44.4	45.5
	% Básico	28.6	28.6	30.4	30.4	31.5	32.1
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	39.8	NR	NR	39.2	NR	40.1
	% Principal	56.7	NR	NR	56.5	NR	55.7
	% Básico	3.4	NR	NR	4.3	NR	4.1
% potencia relativa (bioensayo)		111	NR	NR	132	NR	124

Tabla 24: Estudio de estabilidad de la formulación mAb1 almacenada en condiciones aceleradas.

Formulación		25 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, 10 % (p/v) sacarosa, 0.1 % (p/v) polisorbato 80, pH 6.0						
Volumen de llenado		1.0 mL						
Contenedor /Cierre		Frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con tapones West S2-451 4432/50 GRY B2-40 recubiertos con Fluro Tec (R) de 13 mm						
			Almacenamiento 25°C/60 % HR (meses)			Almacenamiento 45°C (días)		
Ensayo		0	0.5	1	3	7	14	28
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.01	0.01	0.00	0.01	0.00	0.02
pH		6.2	6.1	6.1	6.1	6.2	6.1	6.1
Análisis particulado por MFI (partículas/mL)	2 a 10 µm	823	NR	NR	1056	NR	NR	521
	≥10µm	15	NR	NR	23	NR	NR	83
	≥25µm	0	NR	NR	3	NR	NR	4
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	99	100	99	99	100	99
Pureza por	No reducido; % pico principal	99.4	NR	NR	99.4	NR	NR	99.2

MCE-SDS	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	NR	100	NR	NR	98.6
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.7	0.8	0.9	1.1	1.6	3.2	8.5
	% Nativo	98.7	98.6	98.5	98.1	97.6	95.9	89.7
	% LMW	0.6	0.6	0.6	0.8	0.8	1.0	1.8
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	23.0	22.6	23.1	25.8	24.7	27.3	34.0
	% Principal	48.5	48.7	48.1	44.5	46.2	44.1	35.9
	% Básico	28.6	28.8	28.9	29.8	29.1	28.6	30.2
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	39.8	NR	NR	47.1	NR	NR	66.9
	% Principal	56.7	NR	NR	49.5	NR	NR	30.2
	% Básico	3.4	NR	NR	3.5	NR	NR	3.0
% potencia relativa (bioensayo)		111	NR	NR	94	NR	NR	63

Las Tablas 25 – 27 resumen la estabilidad al estrés de formulaciones ejemplares.

Tabla 25: Estudio de estabilidad de la formulación mAb1 – Efecto de Condiciones de estrés

Formulación		72.2 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 5% (p/v) sacarosa				
Volumen de llenado		1.0 mL				
Contenedor /Cierre		Frasco de policarbonato de 5mL con tapa rosca de polipropileno recubierto de silicona				
			Agitación (min)		Congelar / Descongelar (ciclos)	
		T = 0	10	15	4	8
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.01	0.09	0.01	0.00
pH		6.2	6.2	6.2	6.3	6.3
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	101	99	95	95
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.5	NR	99.2	NR	99.4
	Reducido; % cadena	100	NR	100	NR	100

	pesada + ligera					
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.7	0.8	4.6	0.6	0.7
	% Nativo	98.7	98.7	94.9	98.9	98.8
	% LMW	0.6	0.5	0.5	0.5	0.5
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	22.2	22.2	21.9	22.0	22.2
	% Principal	49.7	49.6	49.9	49.7	49.6
	% Básico	28.1	28.2	28.2	28.3	28.2
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	38.9	NR	40.8	NR	39.0
	% Principal	56.5	NR	54.7	NR	56.5
	% Básico	4.6	NR	4.6	NR	4.5
% potencia relativa (bioensayo)		95	NR	87	NR	89

Tabla 26: Estudio de estabilidad de la formulación mAb1 – Efecto de Condiciones de estrés

Formulación		25mg/mL, mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 10% (p/v) sacarosa, 0.1 % (p/v) polisorbato 80				
Volumen de llenado		1.0 mL				
Contenedor /Cierre		Frasco de policarbonato de 5 ml con tapón de rosca de polipropileno recubierto de silicona				
		Sin estrés	Agitación (min)		Congelar / Descongelar (ciclos)	
		T = 0	60	120	4	8
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pH		6.1	6.1	6.1	6.1	6.1
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	101	100	99	100
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.5	NR	99.5	NR	99.6
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	100	NR	100

Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.8	0.8	0.7	0.8	0.8
	% Nativo	98.6	98.7	98.7	98.7	98.6
	% LMW	0.6	0.6	0.6	0.5	0.6
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	22.8	22.8	22.8	22.9	22.7
	% Principal	47.3	47.2	47.3	47.1	47.2
	% Básico	30.0	30.0	29.2	30.1	30.1
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	40.1	NR	39.6	NR	40.0
	% Principal	56.1	NR	56.9	NR	56.3
	% Básico	3.8	NR	3.5	NR	3.6
% potencia relativa (bioensayo)		112	NR	106	NR	137

Tabla 27: Estudio de estabilidad de la formulación mAb1 – Efecto de Condiciones de estrés

Formulación		25mg/mL, mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 10 % (p/v) sacarosa, 0.1 % (p/v) polisorbato 80				
Volumen de llenado		1.0 mL				
Contenedor /Cierre		Frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con tapones West S2-451 4432/50 GRY B2-40 recubiertos con Fluro Tec (R) de 13 mm				
			Agitación (min)			
Ensayo		T = 0	60	120	4	8
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pH		6.2	6.2	6.2	6.2	6.2
Análisis particulado por MFI (partículas/mL)	2 a 10 µm	823	NR	1170	NR	1404
	≥10µm	15	NR	38	NR	67
	≥25µm	0	NR	0	NR	2
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	100	101	101	101
Pureza por	No reducido; % pico principal	99.4	NR	99.4	NR	99.3

MCE-SDS	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	100	NR	100
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7
	% Nativo	98.7	98.8	98.7	98.7	98.6
	% LMW	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	23.0	22.9	22.8	22.8	22.7
	% Principal	48.5	48.3	48.4	48.4	48.5
	% Básico	28.6	28.8	28.8	28.8	28.8
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	39.8	NR	39.6	NR	39.6
	% Principal	56.7	NR	56.9	NR	56.9
	% Básico	3.4	NR	3.4	NR	3.6
% potencia relativa (bioensayo)		111	NR	90	NR	129

Tabla 28: Estabilidad acelerada y de estrés de 50 mg/ml y 25 mg/ml de formulaciones de mAb1

Formulación		50 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, 10% (p/v) sacarosa, 0.1% (p/v) polisorbato 80, pH 6.0			25 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, 10% (p/v) sacarosa, 0.1% (p/v) polisorbato 80, pH 6.0		
Volumen de llenado		1.0 mL			1.0 mL		
Contenedor /Cierre		Frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con tapones West S2-451 4432/50 GRY B2-40 recubiertos con Fluro Tec (R) de 13 mm			Frasco de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con tapones West S2-451 4432/50 GRY B2-40 recubiertos con Fluro Tec (R) de 13 mm		
Ensayo		T = 0	25°C/60% HR 1 mes	45°C 28 días	T = 0	25°C/60% HR 1 mes	45°C 28 días
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.01	0.02	0.00	0.01	0.02
pH		6.0	6.0	6.1	6.2	6.1	6.1
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	103	113	100	100	99
Pureza por SE-UPLC	% HMW	1.9	4.0	10.8	0.7	0.9	8.5
	% Monómero	97.5	95.2	88.0	98.7	98.5	89.7
	% LMW	0.6	0.8	1.2	0.6	0.6	1.8

Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	24.6	29.0	37.1	23.0	23.1	34.0
	% Principal	49.9	42.5	33.2	48.5	48.1	35.9
	% Básico	25.6	28.5	29.7	28.6	28.9	30.2

Ejemplo 13: Estudio de Rango Probado Aceptable (PAR)

Durante la fabricación del producto farmacológico mAb1 (DP), pueden ocurrir variaciones en la composición del DP. Estas variaciones pueden incluir la concentración del ingrediente activo, la concentración de los excipientes, y/o el pH de la formulación. Dado que los cambios en cualquiera de estos parámetros podría impactar potencialmente la estabilidad o potencia del producto farmacológico, se han realizados estudios de rango probado aceptable (PAR) para evaluar si las variaciones en la composición del DP, dentro de los rangos definidos, podría impactar la estabilidad o potencia del DP mAb1.

Se utilizaron dos estudios de diseño de experimentos (DOE) para evaluar el efecto de cada parámetro de formulación, así como las interacciones sobre la estabilidad de la formulación:

- un estudio factorial fraccionado de diseño Pre-PAR con evaluación acelerada y de estabilidad del estrés para identificar parámetros críticos de formulación que pueden afectar la estabilidad de DP mAb1;
- un estudio PAR de diseño factorial completo que incluye parámetros críticos de formulación identificados a partir del estudio Pre-PAR, con estabilidad de vida útil a largo plazo para demostrar los rangos aceptables de los parámetros de formulación.

Diseño de estudio Pre-PAR

Para evaluar los parámetros de formulación críticos y/o interactivos en la composición de DP que podrían ser importantes para la calidad del producto, se aplicó un DOE factorial fraccional para examinar la estabilidad acelerada y al estrés de las formulaciones variando todos los parámetros de formulación, incluyendo la concentración de proteínas ($\pm 10\%$), concentraciones de tampón y estabilizador ($\pm 20\%$), concentración de surfactante ($\pm 50\%$) y pH (± 0.3 unidad). Los rangos de parámetros de formulación probados se definieron como iguales o más amplios que los criterios de aceptación de especificaciones y la experiencia de fabricación. El estudio fue diseñado con un software estadístico que utiliza un experimento factorial fraccional IV de resolución $2^{(6-2)}$. Junto con cuatro formulaciones objetivo como puntos centrales, el estudio incluyó 20 ejecuciones, como se muestra en la Tabla 29.

Tabla 29: Formulaciones probadas en el estudio Pre-PAR

Formulación	[mAb1] mg/mL	[histidina] mM	% sacarosa (p/v)	% L- prolina (p/v)	% polisorbato 80 (p/v)	pH
1	45	12	4	1.2	0.3	6.3
2	45	12	4	1.8	0.3	5.7
3	45	8	6	1.8	0.3	6.3
4	50	10	5	1.5	0.2	6.0
5	45	8	4	1.8	0.1	6.3
6	55	8	6	1.2	0.1	6.3
7	55	8	4	1.2	0.3	6.3
8	50	10	5	1.5	0.2	6.0
9	55	12	6	1.8	0.3	6.3
10	45	12	6	1.2	0.1	6.3
11	55	8	4	1.8	0.3	5.7
12	55	8	6	1.8	0.1	5.7
13	45	12	6	1.8	0.1	5.7
14	55	12	6	1.2	0.3	5.7
15	50	10	5	11.5	0.2	6.0
16	45	8	6	1.2	0.3	5.7
17	55	12	4	1.8	0.1	6.3
18	45	8	4	1.2	0.1	5.7
19	50	10	5	1.5	0.2	6.0
20	55	12	4	1.2	0.1	5.7

Todas las formulaciones en las condiciones aceleradas y condiciones de estrés (25°C, 37°C, congelar/descongelar [F/T] y agitación) fueron caracterizadas y evaluadas para propiedades físicas/químicas y estabilidad, incluyendo inspección visual, pH, turbiedad, osmolalidad, conductividad, pureza, concentración y recuperación de proteínas, análisis de variante de carga y análisis particulado sub-visible.

Resultados del Estudio Pre-PAR

Las 20 formulaciones no mostraron cambios después de la agitación o el estrés F/T. Los resultados de la incubación a 25°C y 37°C fueron analizados mediante un modelo de regresión (modelo de ajuste JMP con personalidad estándar de mínimos cuadrados y énfasis en el efecto

palanca). El análisis estadístico de las variables principales e interactivas de todas las formulaciones experimentales contra los atributos críticos de calidad reveló que el pH, la concentración de proteínas y la concentración de sacarosa eran importantes para la calidad del producto. Los dos atributos de calidad del producto afectados fueron especies HMW y variantes de carga ácida. Se encontró que otros parámetros de formulación, incluyendo las concentraciones de histidina, prolina o polisorbato 80 dentro de los rangos probados, no tienen un impacto estadísticamente significativo en la calidad del producto. Bajo condiciones aceleradas, no hubo interacciones secundarias o superiores que impactaran la estabilidad de la formulación. Los resultados del estudio pre-PAR indicaron que el pH, la concentración de mAb1 y la concentración de sacarosa fueron críticos para la estabilidad de la formulación de mAb1, y fueron considerados como los parámetros críticos de formulación para la formulación de 50 mg/mL de mAb1.

Aunque el pH, la concentración de mAb1 y concentración de sacarosa fueron identificados como los parámetros críticos de la formulación, el impacto de estos factores en los atributos de calidad fue mínimo. Basado en el análisis estadístico, el cambio en el rango de pH de 5.7 – 6.3, 45 – 55 mg/mL de mAb1, y/o 4-6% de sacarosa tuvo probablemente <15% de impacto en la formación de especies HMW y las variantes de carga ácida.

Para confirmar el impacto en la estabilidad de almacenamiento a largo plazo en una condición de almacenamiento de DP recomendada, los siguientes tres parámetros críticos de la formulación: pH, concentración de mAb1, y concentración de sacarosa, fueron además evaluados en un estudio PAR con estabilidad de almacenamiento a largo plazo.

Diseño de estudio PAR

Se aplicó un diseño factorial completo del DOE para examinar la estabilidad de almacenamiento de las formulaciones a largo plazo con un pH variable (± 0.3 unidad), concentración de proteína ($\pm 10\%$) y concentración de sacarosa ($\pm 20\%$), dando como resultado ocho ejecuciones experimentales (Tabla 30); una formulación de referencia (formulación 3, la formulación objetivo en Tabla 30) fue incluida como la formulación del punto central.

Tabla 30: Formulaciones probadas en estudios PAR

Formulación	[mAb1] mg/mL	[histidina] mM	% sacarosa (p/v)	% L- prolina (p/v)	% polisorbato 80 (p/v)	pH
1	55	10	6	1.5	0.2	5.7

2	45	10	6	1.5	0.2	5.7
3	50	10	5	1.5	0.2	6.0
4	55	10	6	1.5	0.2	6.3
5	55	10	4	1.5	0.2	6.3
6	55	10	4	1.5	0.2	5.7
7	45	10	4	1.5	0.2	6.3
8	45	10	4	1.5	0.2	5.7
9	45	10	6	1.5	0.2	6.3

El diseño completo del estudio factorial permite la estimación de todos los términos de efectos principales, así como los términos de interacción. Los rangos de parámetros de formulación probados, definidos como iguales o más amplios que los criterios de aceptación de especificación y la experiencia de fabricación, permanecieron igual que en el estudio Pre-PAR.

La estabilidad de las formulaciones experimentales fue comparada con la estabilidad de una formulación de referencia a un pH 6.0 conteniendo todos los componentes de la formulación en sus concentraciones nominales (F3). Los estudios PAR utilizaron un lote DS fabricado con el proceso de fabricación comercial representativo. Las formulaciones DP fueron introducidas en frascos de vidrio de borosilicato tipo 1 Schott de 10 mL, con tapones West S2-451 4432/50 GRY B2-40 recubiertos con Fluro Tec® de 20mm (representación comercial DP) y se evaluó la estabilidad de almacenamiento a largo plazo a 2-8°C. Las formulaciones fueron estudiadas de acuerdo con el plan de análisis de la Tabla 31.

Tabla 31: Plan de análisis para estudio PAR

Prueba	Muestras Analizadas	Atributos de Calidad
Apariencia	Todas	Color, partículas visibles
Turbiedad (Aumento en OD a 405 nm)	Todas	Color, partículas, claridad
Turbiedad por Nefelometría	t = 0, 6, 12, 18, 24 y 36 meses a 5°C	Claridad (precipitación de solución, particulados, opalescencia)
pH	Todas	pH
Contenido total de proteína por RP-UPLC	t = 0	Concentración de proteína
Osmolalidad	t = 0	Concentración de soluto
Conductividad	t = 0	Propiedad conductiva

Pureza mediante SE-UPLC	Todas	Variantes de peso molecular: % HMW, % Monómero, % LMW
Análisis de variante de carga mediante cIEF	t = 0, 6, 12, 18, 24 y 36 meses a 5°C.	Carga isoformas; % ácido, % principal, % básico
Material particulado (oscurecimiento de luz)	t = 0, 6, 12, 18, 24 y 36 meses a 5°C	Particulados subvisibles. Criterio de aceptación establecido en USP <788> (<6000 partículas/contenedor para partículas ≥10 m y < 600 partículas/contenedor para partículas ≥25m)
Material particulado (Imagen de MicroFlujo, MFI)	t = 0, 6, 12, 18, 24 y 36 meses a 5°C	Particulados subvisible (Sólo para información)
Bioensayo	t = 0, 6, 12, 18, 24 y 36 meses a 5°C	Potencia Criterio de aceptación: 50-150% de estándar de referencia.

Resultados del Estudio PAR

Efecto en la formación de especies HMW

No hubo un aumento significativo en el % HMW medido por SE-UPLC hasta 12 meses a 2-8°C para las 9 formulaciones. Todos los valores estuvieron muy por debajo de la especificación superior, y no se observó un aumento significativo en % HMW con el tiempo.

Se encontró que la formación de especies HMW para 50 mg/mL de mAb1 DP a 2-8°C era extremadamente lenta. Hasta 12 meses, el cambio máximo de la cantidad relativa en % HMW en las 9 formulaciones fue de ~0.2%. Dado que el cambio en % HMW fue mínimo, y la concentración de monómero podría ser considerada como una constante, la agregación de monómeros a especies HMW podría simplificarse como una reacción de orden cero. Por lo tanto, se utilizó un modelo lineal simplificado para analizar los datos de estabilidad % HMW. Al ajustar linealmente el % HMW a lo largo del tiempo, se obtuvo la tasa de formación de especies HMW para cada formulación.

La tasa fue analizada en función de los factores principales, así como de todos los términos de interacción, utilizando un modelo de regresión (modelo de ajuste JMP con personalidad estándar de mínimos cuadrados y énfasis en el efecto palanca). El modelo de regresión resultante fue

estadísticamente significativo con un R^2 de 0.74. La concentración de mAb1, el pH y el tiempo fueron estadísticamente significativos, pero el efecto sobre el % de formación de especies HMW fue estadísticamente insignificante, solo contribuyendo hasta 0.1%.

Por lo tanto, estos factores, pH a 5.7 – 6.3, concentración de mAb1 a 45-55 mg/mL, y concentración de sacarosa a 4-6%, no tuvo relevancia práctica para el % de estabilidad de HMW a 2-8°C.

El % HMW en las 9 formulaciones de hasta 12 meses estuvo muy por debajo del límite de criterios de aceptación definido del 4% y, por lo tanto, dentro de las especificaciones de liberación y finalización de la vida útil. Además, los modelos lineales predijeron que después de 24 meses de almacenamiento a 2-8°C, el % HMW, que varía entre 0.6% y 0.8%, también estaría muy por debajo del límite de especificación.

Basado en los datos de estabilidad de almacenamiento a largo plazo, se encontró que las variaciones de los parámetros críticos de formulación dentro de los rangos estudiados no tuvieron impacto significativo en la estabilidad de la formulación de mAb1. La formulación de 50 mg/mL de mAb1 fue robusta con respecto a la formación de especies de HMW dentro del rango de composición de la formulación probada.

Efecto en la formación de variantes de carga ácida

No hubo un aumento significativo en el % de las variantes de carga ácida medidas hasta 12 meses a 2-8°C para las 9 formulaciones. Todos los valores estuvieron por debajo la especificación superior, y no se observó un aumento significativo en el % de variantes de carga ácida.

Se consideró que la formulación de mAb1 era robusta con respecto a la formación de variantes de carga ácida dentro del rango de la composición de la formulación probada.

Efecto en atributos de calidad general

Se estudió el efecto de pH, concentración de mAb1, y sacarosa, como también el tiempo de almacenamiento en otros atributos de calidad general de DP, incluyendo la apariencia, turbiedad, particulados subvisibles, recuperación de proteína, % monómero y % LMW mediante SEC, y variantes de carga del % principal y % básico mediante iCIEF, y bioactividad. Todos los valores estaban dentro de la especificación, y no se observó un cambio significativo durante el tiempo o diferencia entre las formulaciones PAR:

- No se detectó precipitado ni partículas visibles por inspección visual o mediciones de turbiedad (OD a 405 nm y nefelometría);
- No se observaron cambios estadísticamente significativos en la recuperación de proteínas (RP-UPLC);
- El pH de la formulación fue estable;
- No hubo aumentos significativos en partículas subvisibles, y se observaron diferencias significativas en los recuentos de partículas subvisibles entre las formulaciones de estudio PAR.
 - Para las partículas subvisibles medidas por HIAC, todos los valores estaban por debajo de los límites aceptables establecidos por USP <788>, y no se observó variación significativa en las partículas subvisibles entre las formulaciones.
 - Además, las partículas subvisibles también fueron medidas por MFI. No se observó variación significativa en partículas subvisibles entre formulaciones.
- Los resultados del bioensayo estuvieron dentro del límite de especificación para todas las formulaciones durante el almacenamiento.

Los resultados demuestran que las variaciones en los parámetros críticos de formulación (pH, concentración de mAb1, y concentración de sacarosa) dentro de los rangos estudiados no tienen un impacto significativo en la estabilidad de la formulación de mAb1. La formulación de 50 mg/mL de mAb1 es robusta con respecto a los atributos de calidad general dentro del rango de la composición de formulación probada.

Efecto de congelar y descongelar en la estabilidad de las formulaciones PAR.

La estabilidad física y química de 50 mg/mL de formulación de mAb1, examinada a continuación de dos ciclos de congelación y descongelación, no fue afectada por la variación en los parámetros críticos de formulación, es decir, un cambio de unidad de pH de ± 0.3 en relación con el mAb1 de referencia, una variación de $\pm 10\%$ en la concentración de mAb1 y/o una variación de $\pm 20\%$ en sacarosa.

Se observaron los siguientes efectos:

- No se detectó precipitado ni por inspección visual ni por mediciones de turbidez (DO a 405 nm);
- No se observó pérdida de proteína (RP-UPLC);
- El pH de la formulación permaneció constante;

- No se observaron diferencias significativas en los recuentos de partículas subvisibles, determinados por oscurecimiento de la luz (HIAC) o imágenes de micro flujo (MFI) entre las formulaciones del estudio. Hubo un ligero aumento en las partículas subvisibles después de 2 ciclos de F/T, que se pudieron eliminar al filtrar a través de un filtro de 0.22 μm antes de llenar el DP;
- No se observaron cambios apreciables en la pureza, según lo determinado por SE-UPLC, en todas las formulaciones después de dos ciclos de congelación y descongelación;
- No se observó ningún cambio apreciable en la distribución de las variantes de carga, según lo determinado por iCIEF, en todas las formulaciones después de dos ciclos de congelación y descongelación;
- Los resultados del bioensayo demostraron que la actividad de mAb1 se mantuvo en todas las formulaciones sometidas a 2 ciclos de congelación y descongelación.

Conclusiones

Los estudios pre-PAR y PAR basados en el diseño del experimento (DOE) se utilizaron para evaluar el efecto de los parámetros de formulación, así como las interacciones sobre la estabilidad de la formulación. El estudio previo al PAR con estabilidad acelerada y al estrés identificó el pH, la concentración de mAb1 y la concentración de sacarosa como los parámetros críticos de la formulación. Un estudio factorial completo de PAR con estabilidad de vida útil a largo plazo demostró que la variación en los parámetros críticos de formulación, dentro de los estudios de rango, no afectó la calidad de mAb1 DP.

Específicamente, la estabilidad y la potencia de 50 mg/mL de mAb1 DP almacenado a 5°C durante 12 meses no se vieron afectadas por una variación de $\pm 10\%$ en la concentración de proteína, una variación de $\pm 20\%$ en la concentración de sacarosa, L-prolina y/o histidina, y/o variación de $\pm 50\%$ en la concentración de polisorbato 80, y/o variación de unidad de pH de ± 0.3 .

El estudio PAR demostró la robustez de la formulación de mAb1. En general, los resultados del estudio pre-PAR y PAR respaldaron que la variabilidad en las composiciones de la formulación de mAb1 dentro de los rangos estudiados no afectaría negativamente la estabilidad del mAb1 DP en las condiciones de almacenamiento recomendadas (2 a 8°C).

Las muestras de 50 mg/mL de mAb1 FDS fueron estables después de dos ciclos de congelación y descongelación (congelación a -30°C y descongelación a temperatura ambiente). La

estabilidad de mAb1 FDS al estrés de congelar/descongelar no se vio afectada por un cambio de $\pm 10\%$ en la concentración de mAb1, un cambio de $\pm 20\%$ en sacarosa y/o un cambio de unidad de $\pm 0.3\text{pH}$ en relación con el control de mAb1 FDS (50 mg/mL). Los resultados de estos estudios de congelación/descongelación respaldan que 50 mg/mL de mAb1 FDS puede congelarse y descongelarse durante la fabricación de mAb1 DP sin afectar negativamente la estabilidad de FDS.

Ejemplo 14: Contenedores

Las formulaciones de mAb1 fueron desarrolladas en frascos de vidrio (para administración mediante infusión intravenosa). El contenedor para el producto farmacológico mAb1 destinado al desarrollo clínico posterior y comercialización del producto también es una jeringa precargada, la cual se presenta como una jeringa independiente para auto inyección o incorporada en un dispositivo de auto inyección para auto administración.

Ejemplo 15: Estabilidad de formulación mAb1 en frascos de vidrio

Las Tablas 32 a 35 resumen la estabilidad de formulaciones de mAb1 ejemplares en frascos de vidrio de 10 mL.

Tabla 32: Estudio de estabilidad de formulación de mAb1 almacenada a 2 – 8°C.

Formulación		50 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, 5 % (p/v) sacarosa, 1.5 % (p/v) L-prolina y 0.2 % (p/v) polisorbato 80 pH 6.0							
Volumen de llenado		5.5 mL							
Contenedor /Cierre		Frasco de vidrio tipo 1 de 10 ml con un tapón de clorobutilo 4432/50 recubierto de Fluro Tec ® de 20 mm							
		Longitud de almacenamiento a 5°C (meses)							
Ensayo		0	1	3	6	9	12	18	24
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	--
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	--
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	--
Análisis partícula do subvisibl e por MFI (N/mL)	2 a 10 µm	175	NR	62	772	NR	1730	NR	--
	≥10µm	8	NR	3	144	NR	18	NR	--
	≥25µm	0	NR	1	19	NR	4	NR	--
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	102	103	101	105	103	104	--
Pureza por	No reducido; % pico principal	99.1	NR	NR	99.1	NR	99.2	NR	--

MCE-SDS	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	NR	100	NR	100	NR	--
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.3	0.3	0.3	0.4	0.4	0.4	0.4	--
	% Monómero	99.1	99.3	99.3	99.3	99.2	99.2	99.2	--
	% LMW	0.6	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	--
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	18.9	18.9	18.9	19.8	20.5	19.8	18.9	--
	% Principal	53.5	53.3	53.4	54.7	54.3	54.0	52.9	--
	% Básico	27.5	27.8	27.7	25.6	25.2	26.2	28.2	--
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	33.8	NR	34.3	34.2	NR	34.9	NR	--
	% Principal	54.8	NR	54.2	54.3	NR	54.3	NR	--
	% Básico	11.4	NR	11.4	11.4	NR	10.8	NR	--
% potencia relativa (bioensayo)		92	NR	NR	122	NR	112	NR	--

CEX = Intercambio catiónico; DS = sustancia farmacológica; HMW = alto peso molecular; iCIEF: enfoque isoelectrico capilar con imágenes; LMW = bajo peso molecular; MFI: imágenes de microflujo; NR: No requerido; OD = densidad óptica; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía liquida de ultra rendimiento.

Tabla 33. Estudio de estabilidad de formulación de mAb1 en condiciones aceleradas y estrés.

Formulación		50 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 5 % (p/v) sacarosa, 1.5 % (p/v) L-prolina y 0.2 % /p/v) polisorbato 80, pH 6.0						
Volumen de llenado		5.5 mL						
Contenedor /Cierre		Frasco de vidrio tipo 1 de 10ml con un tapón de clorobutilo 4432/50 recubierto con Fluro Tec (R) de 20 mm						
			Almacenamiento 25°C/60% HR (Meses)			Almacenamiento 40°C (días)		
Ensayo		0	1	3	6	7	14	28
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Análisis partícula do subvisibl e por MFI (#/mL)	2 a 10 µm	175	NR	326	2083	NR	NR	288
	≥10µm	8	NR	4	109	NR	NR	14
	≥25µm	0	NR	3	3	NR	NR	1
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	102	104	101	100	101	102
Pureza por	No reducido; % pico principal	99.1	NR	NR	98.8	NR	NR	98.6

MCE-SDS	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	NR	99.7	NR	NR	99.7
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.3	0.4	0.5	0.6	0.5	0.8	1.2
	% Monómero	99.1	99.1	99.1	99.0	98.7	98.5	98.1
	% LMW	0.6	0.5	0.4	0.4	0.7	0.7	0.7
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	18.9	19.4	22.1	28.3	20.0	22.0	27.1
	% Principal	53.5	52.7	51.2	48.6	51.9	50.2	46.7
	% Básico	27.5	27.9	26.8	23.2	27.1	27.7	26.2
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	33.8	NR	NR	41.9	NR	NR	46.4
	% Principal	54.8	NR	NR	46.5	NR	NR	40.9
	% Básico	11.4	NR	NR	11.6	NR	NR	12.7
% potencia relativa (bioensayo)		92	NR	NR	91	NR	NR	83

CEX = Intercambio catiónico; DS = sustancia farmacológica; HMW = alto peso molecular; iCIEF: enfoque isoelectrico capilar con imágenes; LMW = bajo peso molecular; MFI: imágenes de microflujo; NR: No requerido; OD = densidad óptica; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía liquida de ultra rendimiento.

Tabla 34: Estudio de estabilidad de formulación de mAb1 almacenada a 2-8°C

Formulación		50 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, 5 % (p/v) sacarosa, 1.5 % (p/v) L-prolina y 0.2 % (p/v) polisorbato 80 pH 6.0							
Volumen de llenado		7.44 mL							
Contenedor /Cierre		Frasco de vidrio tipo 1 de 10 ml con un tapón de clorobutilo 4432/50 recubierto de Fluro Tec ® de 20 mm							
		Longitud de almacenamiento a 2- 8° C (meses)							
Ensayo		0	1	3	6	9	12	18	24
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	--	--	--
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	--	--	--
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	--	--	--
Análisis partícula do subvisibl e por HIAC (N/mL)	≥10 μm	3	NR	2	4	NR	--	--	--
	≥25μm	0	NR	0	1	NR	--	--	--
Análisis partícula do subvisibl e por MFI (N/mL)	2 a ≥10μm	183	NR	207	1044	NR	--	--	--
	≥10μm	3	NR	7	19	NR	--	--	--
	≥25μm	1	NR	3	5	NR	--	--	--
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	99	102	102	94	--	--	--

Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.2	NR	99.4	99.2	NR	--	--	--
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	100	100	NR	--	--	--
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.7	0.6	0.5	0.5	0.6	--	--	--
	% Monómero	98.8	98.8	98.9	99.0	98.9	--	--	--
	% LMW	0.6	0.6	0.5	0.4	0.5	--	--	--
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	21.2	21.2	22.3	19.6	21.5	--	--	--
	% Principal	52.0	52.1	52.0	51.9	52.0	--	--	--
	% Básico	26.8	26.8	25.7	28.6	26.6	--	--	--
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	34.3	NR	34.7	34.6	NR	--	--	--
	% Principal	52.1	NR	51.9	51.9	NR	--	--	--
	% Básico	13.7	NR	13.4	13.4	NR	--	--	--
% potencia relativa (bioensayo)		113	NR	105	128	NR	--	--	--

CEX = Intercambio catiónico; DS = sustancia farmacológica; HMW = alto peso molecular; iCIEF: enfoque isoelectrico capilar con imágenes; LMW = bajo peso molecular; MFI: imágenes de microflujo; NR: No requerido; OD = densidad óptica; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía liquida de ultra rendimiento.

Tabla 35. Estudio de estabilidad de formulación de mAb1 en condiciones aceleradas y estrés.

Formulación		50 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, pH 6.0, 5 % (p/v) sacarosa, 1.5 % (p/v) L-prolina y 0.2 % /p/v) polisorbato 80, pH 6.0						
Volumen de llenado		7.44 mL						
Contenedor /Cierre		Frasco de vidrio tipo 1 de 10ml con un tapón de clorobutilo 4432/50 recubierto con Fluro Tec (R) de 20 mm						
			Almacenamiento 25°C/60 % HR (Meses)				Almacenamiento 40°C (días)	
Ensayo		0	1	3	6	7	14	28
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Análisis partícula do subvisibl e por HIAC (N/mL)	≥10 µm	3	NR	4	11	NR	NR	5
	≥25µm	0	NR	0	2	NR	NR	0
Análisis partícula do subvisibl e por MFI (N/mL)	2-10 µm	183	NR	540	1439	NR	NR	799
	≥10µm	3	NR	18	16	NR	NR	92
	≥25µm	1	NR	1	1	NR	NR	1

% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	100	101	101	101	99	100
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	99.2	NR	99.3	98.7	NR	NR	98.6
	Reducido; % cadena pesada + ligera	100	NR	100	100	NR	NR	99.5
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.7	0.6	0.7	0.8	0.6	0.8	1.3
	% Monómero	98.8	98.8	98.8	98.7	98.7	98.5	97.9
	% LMW	0.6	0.7	0.6	0.6	0.7	0.8	0.8
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	21.2	21.7	25.3	24.4	20.5	23.2	25.8
	% Principal	52.0	52.1	51.4	50.5	52.4	51.0	49.7
	% Básico	26.8	26.2	23.3	25.1	27.0	25.9	24.6
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	34.3	NR	40.0	45.4	NR	NR	46.9
	% Principal	52.1	NR	47.1	43.7	NR	NR	39.7
	% Básico	13.7	NR	12.9	11.0	NR	NR	13.3
% potencia relativa (bioensayo)		113	NR	143	99	NR	NR	88

CEX = Intercambio catiónico; DS = sustancia farmacológica; HMW = alto peso molecular; iCIEF: enfoque isoelectrico capilar con imágenes; LMW = bajo peso molecular; MFI: imágenes de microflujo; NR: No requerido; OD = densidad óptica; RP = fase inversa; SE = exclusión por tamaño; UPLC = cromatografía liquida de ultra rendimiento.

Se encontró que las dos formulaciones a diferentes volúmenes de llenado eran estables al estrés (40°C/75% HR) (datos no mostrados).

Ejemplo 16: Estabilidad de formulación de mAb1 en jeringas precargadas

Las Tablas 36 – 38 resumen la estabilidad de formulaciones de mAb1 en altas concentraciones en jeringas precargadas.

Tabla 36: Estudio de estabilidad de Producto farmacológico mAb1 en Jeringas precargadas (PFS) almacenadas a 5°C.

Formulación	175 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, 5 % (p/v) sacarosa, 1.5 % (p/v) L-prolina, 0.2 % (p/v) polisorbato 80, pH 6.0
Volumen de llenado	1.2 mL
Contenedor /Cierre	Jeringa de vidrio Nuova Ompi EZ Fill de 2.25 mL con una aguja de pared delgada 27G 1/2 y protector de aguja FM30 cerrado con un émbolo de goma 4023/50 recubierto con FluroTec (R)
	Longitud de almacenamiento a 5°C (meses)

Ensayo		0	1	3	6	9	12
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Análisis particulado subvisible por HIAC (#/mL)	≥10 μm	35	NR	17	59	NR	13
	≥ 25 μm	0	NR	4	1	NR	1
Análisis particulado por MFI (partículas/mL)	2 a 10 μm	21326	NR	8613	NA	NR	NA
	≥10μm	82	NR	303	NA	NR	NA
	≥25μm	3	NR	2	NA	NR	NA
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	96	97	100	98	100
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	97.6	NR	NR	97.7	97.1	NA
	Reducido; % cadena pesada + ligera	99.6	NR	NR	99.8	99.8	NA
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.6	0.6	0.7	0.7	0.8	0.9
	% Nativo	99.1	98.9	99.1	98.7	98.7	98.6
	% LMW	0.3	0.5	0.2	0.5	0.5	0.5
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	18.6	18.5	18.2	18.6	19.3	18.8
	% Principal	53.4	54.8	54.3	53.2	53.5	55.5
	% Básico	27.9	26.8	27.5	25.3	25.6	24.3
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	30.2	NR	30.2	32.9	NR	NA
	% Principal	55.9	NR	55.9	53.4	NR	NA
	% Básico	13.9	NR	13.9	13.7	NR	NA
% potencia relativa (bioensayo)		87	NR	NR	141	NR	NA

Tabla 37: Estudio de estabilidad de Producto farmacológico mAb1 en Jeringas precargadas (PFS) almacenadas en condiciones aceleradas.

Formulación	175 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, 5 % (p/v) sacarosa, 1.5 % (p/v) L-prolina, 0.2 % (p/v) polisorbato 80, pH 6.0
Volumen de llenado	1.2 mL
Contenedor /Cierre	Jeringa de vidrio Nuova Ompi EZ Fill de 2.25 mL con una aguja de pared delgada 27G 1/2 y protector de aguja FM30 cerrado con un émbolo de goma 4023/50 recubierto con FluroTec (R)

			Almacenamiento a 25°C/60 % HR			Almacenamiento a 40°C (días)		
Ensayo		0	1	3	6	7	14	28
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pH		6.0	6.0	6.0	6.1	6.0	6.0	6.0
Análisis particulado subvisible por HIAC (#/mL)	≥10 µm	3	NR	13	30	NR	NR	14
	≥ 25 µm	1	NR	1	1	NR	NR	3
Análisis particulado subvisible por MFI (partículas/m L)	2 a 10 µm	21326	NR	4605	NA	NR	NR	3717
	≥10µm	82	NR	225	NA	NR	NR	51
	≥25µm	3	NR	2	NA	NR	NR	8
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	98	98	100	100	100	98
Pureza por MCE- SDS	No reducido; % pico principal	97.6	NR	97.7	96.5	NR	NR	96.8
	Reducido; % cadena pesada + ligera	99.6	NR	99.2	99.7	NR	NR	99.4
Pureza por SE- UPLC	% HMW	0.6	0.9	1.2	1.6	1.6	2.5	3.9
	% Nativo	99.1	98.6	98.5	97.7	97.8	96.9	95.5
	% LMW	0.3	0.5	0.3	0.6	0.6	0.7	0.6
Análisis de variante de carga por CEX- UPLC	% Acido	18.6	19.0	21.3	25.5	20.0	22.1	24.3
	% Principal	53.4	54.3	52.0	46.5	51.8	49.8	48.9
	% Básico	27.9	26.8	26.6	28.1	28.3	28.1	26.8
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	30.2	NR	36.8	44.9	NR	NR	45.6
	% Principal	55.9	NR	49.6	42.8	NR	NR	40.5
	% Básico	13.9	NR	13.6	12.3	NR	NR	13.9
% potencia relativa (bioensayo)		87	NR	NR	137	NR	NR	83

Tabla 37: Estudio de estabilidad de Producto farmacológico mAb1 en Jeringas precargadas (PFS) – Condiciones de estrés.

Formulación	175 mg/mL mAb1, 10 mM histidina, 5% (p/v) sacarosa, 1.5% (p/v) L-prolina, 0.2 % (p/v) polisorbato 80, pH 6.0
Volumen de llenado	1.2 mL

Contenedor /Cierre		Jeringa de vidrio Nuova Ompi EZ Fill de 2.25 mL con una aguja de pared delgada 27G 1/2 y protector de aguja FM30 cerrado con un émbolo de goma 4023/50 recubierto con FluroTec (R)		
			Agitación (min)	
Ensayo		0	60	120
Color y apariencia		Pasa	Pasa	Pasa
Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)		0.00	0.00	0.00
pH		6.0	6.0	6.0
Análisis particulado subvisible por HIAC (#/mL)	≥10 µm	3	NR	5
	≥ 25 µm	1	NR	5
Análisis particulado subvisible por MFI (partículas/mL)	2 a 10 µm	21326	NR	13896
	≥10µm	82	NR	55
	≥25µm	3	NR	3
% Proteína recuperada por RP-UPLC		100	100	100
Pureza por MCE-SDS	No reducido; % pico principal	97.6	NR	97.9
	Reducido; % cadena pesada + ligera	99.6	NR	99.5
Pureza por SE-UPLC	% HMW	0.6	0.6	0.6
	% Nativo	99.1	989	98.8
	% LMW	0.3	0.6	0.6
Análisis de variante de carga por CEX-UPLC	% Acido	18.6	18.8	19.0
	% Principal	53.4	53.2	53.5
	% Básico	27.9	28.1	27.5
Análisis de variante de carga por iCIEF	% Acido	30.2	NR	30.4
	% Principal	55.9	NR	55.5
	% Básico	13.9	NR	14.1
% potencia relativa (bioensayo)		87	NR	100

Ejemplo 17: Compatibilidad de formulaciones mAb1 en dispositivos de administración intravenosa (IV)

Para la evaluación de compatibilidad, 50 mg/mL de formulaciones mAb1 fue agregado a una bolsa IV de 100 mL conteniendo ya sea 0.9% de Inyección de cloruro de sodio o 5% de inyección de dextrosa, para evaluar si mAb1 es estable cuando es administrada de manera

intravenosa. Para respaldar la variabilidad en los pesos de los pacientes, dos concentraciones de mezcla, 1.0 mg/mL de mAb1 y 25 mg/mL de mAb1, fueron examinadas en este estudio para reflejar las condiciones de dosificación alta y baja. Los siguientes componentes de aditivos IV fueron usados durante los estudios de compatibilidad:

- Producto farmacológico
 - 50 mg/mL mAb1 DP
- Disolventes
 - 0.9% Inyección de cloruro de sodio
 - 5% Inyección de dextrosa
- Bolsas IV
 - Bolsas IV hechas de cloruro de polivinilo (PVC) con di-(2-etilhexil)ftalato (DEHP) precargadas con 0.9% de inyección de cloruro de sodio,
 - Bolsas IV hechas de cloruro de polivinilo (PVC) con DEHP precargadas con 5% de inyección de dextrosa,
 - Bolsas IV hechas de poliolefina (PO) precargadas con 0.9% de inyección de cloruro de sodio,
 - Bolsas IV hechas de poliolefina (PO) precargadas con 5% de inyección de dextrosa,
 - Bolsas IV hechas de polipropileno precargadas con 0.9% de inyección de cloruro de sodio,
 - Botellas IV hechas de polipropileno precargadas con 0.9% inyección de cloruro de sodio.
- Bombas IV
 - Bomba peristáltica
 - Bomba de desplazamiento de fluido
- Conjuntos de infusión IV
 - Conjunto IV hecho de PVC con DEHP
 - Conjunto IV hecho con diociltireftalato (DEHT)
 - Conjunto IV hecho con triocil trimelitato (TOTM)
 - Conjunto IV hecho de PVC recubierto con polietileno
 - Conjunto IV hecho de poliuretano
- Filtros

- Filtro en línea de poliétersulfona de 0.2 μm
- Filtro en línea de poliétersulfona de 1.2 μm
- Filtro en línea de poliétersulfona de 5 μm
- Filtro en línea de poliétersulfona de 15 μm

Los DP utilizados en este estudio fueron fabricados con GMP utilizando un proceso de fabricación comercial DP representativo. Las bolsas IV que contenían la mezcla fueron mantenidos inicialmente durante 24 horas a 5°C; las bolsas fueron incubadas durante al menos 8 horas a 25°C. Después de estas incubaciones, cada uno de los conjuntos de infusión se conectó a la bolsa IV, cebado con la mezcla y mantenido durante 1 hora a temperatura ambiente. Cada mezcla fue bombeada luego a través de los conjuntos de infusión respectivos a velocidades de 25mL/h y 500 mL/h.

Métodos usados para evaluar la compatibilidad de la mezcla:

La compatibilidad de la mezcla de mAb1 con materiales usados en el dispositivo de administración IV fue evaluada usando los siguientes ensayos:

- Color y apariencia mediante inspección visual
- pH
- turbiedad medida mediante el aumento de Densidad Optica (OD) a 405 nm.
- Análisis de partículas subvisibles en la mezcla por oscurecimiento de luz (HIAC)
- Concentración de proteína de mAb1 mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento de fase inversa (RP-UPLC).
- Pureza por SE-UPLC
- Análisis de variante de carga por CEX-UPLC
- Potencia, mediante bioensayo: La potencia relativa de cada muestra es determinada usando el bioensayo y es definido como: (Muestra de referencia IC_{50} /Muestra IC_{50})*100%. La potencia medida de las muestras de estabilidad de almacenamiento debe estar dentro del 50-150% de la potencia medida del estándar de referencia.

Resultados y Conclusiones:

La formulación de 50 mg/mL de mAb1, diluida en 0.9% de una inyección de cloruro de sodio o en 5% de una inyección de dextrosa en concentraciones de 1.0 mg/mL o 25 mg/mL fue física y químicamente estable en todas las condiciones probadas dentro de los rangos de dosis propuestos y las condiciones de administración. Estos datos respaldan las siguientes conclusiones relacionadas con la preparación de dosis y la administración IV de mAb1 DP:

- Bolsas IV con 0.9% de inyección de cloruro de sodio y 5% de inyección de dextrosa hechas de PVC con DEHP, PO, y polipropileno son compatibles con la administración IV de mAb1.
- mAb1 DP puede ser diluida a concentraciones tan bajas como 1.0 mg/mL en bolsas IV de PVC, PO o polipropileno conteniendo ya sea 0.9% de Cloruro de sodio o 5% de dextrosa para administración IV.
- mAb1 DP puede ser diluida a concentraciones tan altas como 25.0 mg/mL en bolsas IV de PVC, PO o polipropileno conteniendo ya sea 0.9% de Cloruro de sodio o 5% de dextrosa para administración IV.
- La mezcla de mAb1 ya sea en 0.9% de cloruro de sodio o 5% dextrosa fue estable después de la incubación en una bolsa IV de PVC, PO o polipropileno durante períodos de hasta 24 horas a 5°C y 8 horas a 25°C. El mAb1 DP diluido puede ser administrado dentro de 6 horas de preparación.
- mAb1 diluido puede ser administrado usando una bomba de infusión estándar.
- mAb1 diluido puede ser administrado con un conjunto de infusión compuesto de ya sea DEHP conteniendo PVC, TOTM conteniendo PVC, polietileno o poliuretano.
- mAb1 es compatible con el uso de un filtro de polietersulfona en línea de 0.2µm - 5µm.
- mAb1 diluido puede ser administrado a una tasa que varía desde 25 a 500 mL/hora.

La presente invención no está limitada en su alcance por las realizaciones específicas descritas en este documento. De hecho, diversas modificaciones de la invención además de las descritas en este documento resultarán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior y las figuras adjuntas. Dichas modificaciones están destinadas a caer dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica líquida, CARACTERIZADA porque comprende:
 - (a) un anticuerpo que se une específicamente a muerte programada 1 humano (PD-1), donde el anticuerpo comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (CDR) (HCDR1, HCDR2, y HCDR3) contenidas en una región variable de cadena pesada (HCVR) de SEQ ID N°1 y tres cadenas ligeras CDR (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas en una región variables de cadena ligera (LCVR) de SEQ ID N° 2;
 - (b) un tampón que comprende histidina;
 - (c) un solvente orgánico que comprende polisorbato;
 - (d) un estabilizador que comprende un azúcar; y
 - (e) un modificador de viscosidad que comprende un aminoácido;
 donde la formulación tiene un pH de 6.0 ± 0.3 .
2. La formulación farmacéutica de la reivindicación 1, CARACTERIZADA porque la concentración de anticuerpo es desde $5\text{mg/mL} \pm 0.75 \text{ mg/mL}$ a $250 \text{ mg/mL} \pm 37.5 \text{ mg/mL}$.
3. La formulación farmacéutica de la reivindicación 2, CARACTERIZADA porque la concentración de anticuerpo es $25\text{mg/mL} \pm 3.75 \text{ mg/mL}$.
4. La formulación farmacéutica de la reivindicación 2, CARACTERIZADA porque la concentración de anticuerpo es $50\text{mg/mL} \pm 7.5 \text{ mg/mL}$.
5. La formulación farmacéutica de la reivindicación 2, CARACTERIZADA porque la concentración de anticuerpo es $150\text{mg/mL} \pm 22.5 \text{ mg/mL}$.
6. La formulación farmacéutica de la reivindicación 2, CARACTERIZADA porque la concentración de anticuerpo es $175\text{mg/mL} \pm 26.25 \text{ mg/mL}$.
7. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 6, CARACTERIZADA porque la concentración del tampón de histidina es desde $5 \text{ mM} \pm 1\text{mM}$ a $20\text{mM} \pm 4\text{mM}$.
8. La formulación farmacéutica de la reivindicación 7, CARACTERIZADA porque la concentración del tampón de histidina es $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$.
9. La formulación farmacéutica de la reivindicación 7 u 8, CARACTERIZADA porque el tampón de histidina comprende L-histidina y monohidrocloruro L-histidina monohidrato.

10. La formulación farmacéutica de la reivindicación 9, CARACTERIZADA porque la concentración de L-histidina es $4.8 \text{ mM} \pm 0.96 \text{ mM}$ y la concentración de monohidrocloruro L-histidina monohidrato es $5.2 \text{ mM} \pm 1.04 \text{ mM}$.
11. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 10, CARACTERIZADA porque la concentración de polisorbato es desde $0.01\% \pm 0.005\%$ a $0.5\% \pm 0.25\%$ p/v.
12. La formulación farmacéutica de la reivindicación 11, CARACTERIZADA porque la concentración de polisorbato es $0.1\% \pm 0.05\%$ p/v.
13. La formulación farmacéutica de la reivindicación 11, CARACTERIZADA porque la concentración de polisorbato es $0.2\% \pm 0.1\%$ p/v.
14. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 11 – 13, CARACTERIZADA porque el solvente orgánico es polisorbato 80.
15. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 14, CARACTERIZADA porque el estabilizador es sacarosa y la concentración de sacarosa es desde 0% a $20\% \pm 4\%$ p/v.
16. La formulación farmacéutica de la reivindicación 15, CARACTERIZADA porque la concentración de sacarosa es desde $1\% \pm 0.2\%$ a $10\% \pm 2\%$ p/v.
17. La formulación farmacéutica de la reivindicación 16, CARACTERIZADA porque la concentración de sacarosa es $5\% \pm 1\%$ p/v.
18. La formulación farmacéutica de la reivindicación 17, CARACTERIZADA porque el modificador de viscosidad es prolina.
19. La formulación farmacéutica de la reivindicación 18, CARACTERIZADA porque la concentración de prolina es desde 0 a $5\% \pm 1\%$ p/v.
20. La formulación farmacéutica de la reivindicación 19, CARACTERIZADA porque la concentración de prolina es $1.5\% \pm 0.3\%$ p/v.
21. La formulación farmacéutica de la reivindicación 18, CARACTERIZADA porque comprende:
 - (a) $175 \text{ mg/mL} \pm 26.25 \text{ mg/mL}$ de anticuerpo;
 - (b) desde $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ a $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$ de tampón de histidina;
 - (c) desde $0.1\% \pm 0.05\%$ a $0.5\% \pm 0.25\%$ p/v polisorbato;
 - (d) desde $1\% \pm 0.2\%$ a $10\% \pm 2\%$ p/v de sacarosa; y
 - (e) desde $1\% \pm 0.2\%$ a $5\% \pm 1\%$ p/v prolina;
 a un pH de 6.0 ± 0.3 .
22. La formulación farmacéutica de la reivindicación 21, CARACTERIZADA porque comprende:
 - (a) $175 \text{ mg/mL} \pm 26.25 \text{ mg/mL}$ de anticuerpo;
 - (b) $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ de tampón de histidina;

- (c) $0.2\% \pm 0.1\%$ p/v polisorbato;
 - (d) $5\% \pm 1\%$ p/v de sacarosa; y
 - (e) $1.5\% \pm 0.3\%$ p/v prolina;
a un pH de 6.0 ± 0.3 .
23. La formulación farmacéutica de la reivindicación 22, CARACTERIZADA porque comprende:
- (a) $175 \text{ mg/mL} \pm 26.25 \text{ mg/mL}$ de anticuerpo;
 - (b) $4.8 \text{ mM} \pm 0.96 \text{ mM}$ de L-histidina;
 - (c) $5.2 \text{ mM} \pm 1.04 \text{ mM}$ monohidrocloreto L-histidina monohidrato;
 - (d) $0.2\% \pm 0.1\%$ p/v polisorbato;
 - (e) $5\% \pm 1\%$ p/v de sacarosa; y
 - (f) $1.5\% \pm 0.3\%$ p/v prolina;
a un pH de 6.0 ± 0.3 .
24. La formulación farmacéutica de la reivindicación 18, CARACTERIZADA porque comprende:
- (a) $150 \text{ mg/mL} \pm 22.5 \text{ mg/mL}$ de anticuerpo,
 - (b) desde $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ a $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$ de tampón de histidina,
 - (c) desde $0.1\% \pm 0.05\%$ a $0.5\% \pm 0.25\%$ p/v polisorbato,
 - (d) desde $1\% \pm 0.2\%$ a $10\% \pm 2\%$ sacarosa; y
 - (e) desde $1\% \pm 0.2\%$ a $5\% \pm 1\%$ p/v prolina;
a un pH de 6.0 ± 0.3 .
25. La formulación farmacéutica de la reivindicación 24, CARACTERIZADA porque comprende:
- (a) $150 \text{ mg/mL} \pm 22.5 \text{ mg/mL}$ de anticuerpo;
 - (b) $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ tampón de histidina;
 - (c) $0.2\% \pm 0.1\%$ p/v polisorbato,
 - (d) $5\% \pm 1\%$ p/v sacarosa, y
 - (e) $1.5\% \pm 0.3\%$ p/v prolina;
a un pH de 6.0 ± 0.3 .
26. La formulación farmacéutica de la reivindicación 25, CARACTERIZADA porque comprende:
- (a) $150 \text{ mg/mL} \pm 22.5 \text{ mg/mL}$ de anticuerpo;
 - (b) $4.8 \text{ mM} \pm 0.96 \text{ mM}$ de L-histidina;
 - (c) $5.2 \text{ mM} \pm 1.04 \text{ mM}$ monohidrocloreto L-histidina monohidrato;
 - (d) $0.2\% \pm 0.1\%$ p/v polisorbato;
 - (e) $5\% \pm 1\%$ p/v de sacarosa; y
 - (f) $1.5\% \pm 0.3\%$ p/v prolina;

a un pH de 6.0 ± 0.3 .

27. La formulación farmacéutica de la reivindicación 18, CARACTERIZADA porque comprende:

- (a) $50 \text{ mg/mL} \pm 7.5 \text{ mg/mL}$ de anticuerpo;
- (b) desde $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ a $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$ de tampón de histidina,
- (c) desde $0.1\% \pm 0.05\%$ a $0.5\% \pm 0.25\%$ p/v polisorbato,
- (d) desde $1\% \pm 0.2\%$ a $10\% \pm 2\%$ sacarosa; y
- (e) desde $1\% \pm 0.2\%$ a $5\% \pm 1\%$ p/v prolina;

a un pH 6.0 ± 0.3 .

28. La formulación farmacéutica de la reivindicación 27, CARACTERIZADA porque comprende:

- (a) $50 \text{ mg/mL} \pm 7.5 \text{ mg/mL}$ de anticuerpo,
- (b) $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ tampón de histidina;
- (c) $0.2\% \pm 0.1\%$ p/v polisorbato,
- (d) $5\% \pm 1\%$ p/v sacarosa; y
- (e) $1.5\% \pm 0.3\%$ /v prolina;

a un pH 6.0 ± 0.3 .

29. La formulación farmacéutica de la reivindicación 28, CARACTERIZADA porque comprende:

- (a) $50 \text{ mg/mL} \pm 7,5 \text{ mg/mL}$ anticuerpo;
- (b) $4.8 \text{ mM} \pm 0.96 \text{ mL}$ L- histidina
- (c) $5.2 \text{ mM} \pm 1.04 \text{ mM}$ monohidrocloreuro L-histidina monohidrato,
- (d) $0.2\% \pm 0.1\%$ p/v polisorbato;
- (e) $5\% \pm 1\%$ p/v sacarosa, y
- (f) $1.5\% \pm 0.3\%$ p/v prolina;

a un pH 6.0 ± 0.3 .

30. La formulación farmacéutica de la reivindicación 18, CARACTERIZADA porque comprende:

- (a) $25 \text{ mg/mL} \pm 7.5 \text{ mg/mL}$ de anticuerpo;
- (b) desde $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ a $20 \text{ mM} \pm 4 \text{ mM}$ de tampón de histidina,
- (c) desde $0.1\% \pm 0.05\%$ a $0.5\% \pm 0.25\%$ p/v polisorbato,
- (d) desde $1\% \pm 0.2\%$ a $10\% \pm 2\%$ sacarosa; y
- (e) desde $1\% \pm 0.2\%$ a $5\% \pm 1\%$ p/v prolina;

a un pH 6.0 ± 0.3 .

31. La formulación farmacéutica de la reivindicación 30, CARACTERIZADA porque comprende:

- (a) $25 \text{ mg/mL} \pm 3.75 \text{ mg/mL}$ de anticuerpo,

- (b) $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ tampón de histidina;
 - (c) $0.2\% \pm 0.1\%$ p/v polisorbato,
 - (d) $5\% \pm 1\%$ p/v sacarosa; y
 - (e) $1.5\% \pm 0.3\%$ /v prolina;
 - a un $\text{pH } 6.0 \pm 0.3$.
32. La formulación farmacéutica de la reivindicación 31, CARACTERIZADA porque comprende:
- (a) $25 \text{ mg/mL} \pm 7.5 \text{ mg/mL}$ anticuerpo;
 - (b) $4.8 \text{ mM} \pm 0.96 \text{ mM}$ L- histidina
 - (c) $5.2 \text{ mM} \pm 1.04 \text{ mM}$ monohidrocloreto L-histidina monohidrato,
 - (d) $0.2\% \pm 0.1\%$ p/v polisorbato;
 - (e) $5\% \pm 1\%$ p/v sacarosa, y
 - (f) $1.5\% \pm 0.3\%$ p/v prolina;
 - a un $\text{pH } 6.0 \pm 0.3$.
33. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 32, CARACTERIZADA porque la formulación tiene una viscosidad de menos de 20 cP.
34. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 33, CARACTERIZADA porque al menos 90% del anticuerpo tiene una conformación nativa después de 28 días a 45°C .
35. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 34, CARACTERIZADA porque al menos 35% del anticuerpo es la variante de carga principal del anticuerpo después de 28 días a 45°C .
36. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 35, CARACTERIZADA porque al menos 94% del anticuerpo tiene conformación nativa después de tres meses a 25°C .
37. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 36, CARACTERIZADA porque al menos 44% del anticuerpo es la variante de carga principal del anticuerpo después de tres meses a 25°C .
38. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 37, CARACTERIZADA porque al menos 96% del anticuerpo tiene conformación nativa después de 12 meses a 5°C .
39. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 38, CARACTERIZADA porque al menos 45% del anticuerpo es la variante de carga principal del anticuerpo después de 12 meses a 5°C .
40. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 39, CARACTERIZADA porque al menos 90% del anticuerpo tiene conformación nativa después de 12 meses a -20°C , -30°C , y/o -80°C .

41. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 40, CARACTERIZADA porque al menos 40% del anticuerpo es la variante de carga principal del anticuerpo después de 12 meses a -20°C, -30°C, y/o -80°C.
42. Una formulación farmacéutica, CARACTERIZADA porque comprende:
- (a) 175 mg/mL $\pm$ 26.25 mg/mL de un anticuerpo que se une específicamente a PD-1, donde el anticuerpo comprende un HCVR de SEQ ID N° 1 y un LCVR de SEQ ID N° 2,
 - (b) 10 mM $\pm$ 2 mM de tampón de histidina, pH 6.0 $\pm$ 0.3,
 - (c) 0.2% $\pm$ 0.1% p/v polisorbato 80,
 - (d) 5% $\pm$ 1% p/v sacarosa; y
 - (e) 1.5% $\pm$ 0.3% p/v prolina; donde:
 - (i) $\geq$ 90% de los anticuerpos tienen un peso molecular de 143 kDa $\pm$ 1 kDa;
 - (ii) la formulación farmacéutica tiene una viscosidad de menos de 20 cP; y
 - (iii) al menos 97% o más de los anticuerpos tiene una conformación nativa tras el almacenamiento a -80°C, -30°C y/o -20°C durante 6 meses.
43. La formulación farmacéutica de la reivindicación 42, CARACTERIZADA porque consiste de: (a) 175 mg/mL $\pm$ 26.25 mg/mL de un anticuerpo, (b) 4.8 mM $\pm$ 0.96 mL de L-histidina; (c) 5.2 mM $\pm$ 1.04 mM monohidrocloreto L-histidina monohidrato, (d) 0.2% $\pm$ 0.1% p/v polisorbato 80, (e) 5% $\pm$ 1% p/v sacarosa; y (f) 1.5% $\pm$ 0.3% p/v prolina en agua a pH 6.0 $\pm$ 0.3.
44. Una formulación farmacéutica, CARACTERIZADA porque comprende:
- (a) 150 mg/mL $\pm$ 22.5 mg/mL de un anticuerpo que se une específicamente a PD-1, donde el anticuerpo comprende un HCVR de SEQ ID N° 1 y un LCVR de SEQ ID N° 2,
 - (b) 10 mM $\pm$ 2 mM de tampón de histidina, pH 6.0 $\pm$ 0.3,
 - (c) 0.2% $\pm$ 0.1% p/v polisorbato 80,
 - (d) 5% $\pm$ 1% p/v sacarosa; y
 - (e) 1.5% $\pm$ 0.3% p/v prolina; donde:
 - (iv) $\geq$ 90% de los anticuerpos tienen un peso molecular de 143 kDa $\pm$ 1 kDa;
 - (v) la formulación farmacéutica tiene una viscosidad de menos de 15 cP; y
 - (vi) al menos 97% o más de los anticuerpos tiene una conformación nativa tras el almacenamiento a -80°C, -30°C y/o -20°C durante 6 meses.
45. La formulación farmacéutica de la reivindicación 44, CARACTERIZADA porque consiste de: (a) 150 mg/mL $\pm$ 22.5 mg/mL de un anticuerpo, (b) 4.8 mM $\pm$ 0.96 mL de L-histidina; (c) 5.2 mM $\pm$ 1.04 mM monohidrocloreto L-histidina monohidrato, (d) 0.2% $\pm$ 0.1% p/v polisorbato 80, (e) 5% $\pm$ 1% p/v sacarosa; y (f) 1.5% $\pm$ 0.3% p/v prolina en agua a pH 6.0 $\pm$ 0.3.
46. Una formulación farmacéutica, CARACTERIZADA porque comprende:

- (a) 50 mg/mL $\pm$ 7.5 mg/mL de un anticuerpo que se une específicamente a PD-1, donde el anticuerpo comprende un HCVR de SEQ ID N° 1 y un LCVR de SEQ ID N° 2,
 - (b) 10 mM $\pm$ 2 mM de tampón de histidina, pH 6.0 $\pm$ 0.3,
 - (c) 0.2% $\pm$ 0.1% p/v polisorbato 80,
 - (d) 5% $\pm$ 1% p/v sacarosa; y
 - (e) 1.5% $\pm$ 0.3% p/v prolina; donde:
 - (i) $\geq$ 90% de los anticuerpos tienen un peso molecular de 143 kDa $\pm$ 1 kDa;
 - (ii) la formulación farmacéutica tiene una viscosidad de menos de 15 cP; y
 - (iii) al menos 97% o más de los anticuerpos tiene una conformación nativa tras el almacenamiento a -80°C, -30°C y/o -20°C durante 6 meses.
47. La formulación farmacéutica de la reivindicación 46, CARACTERIZADA porque consiste de: (a) 50 mg/mL $\pm$ 7.5 mg/mL de un anticuerpo, (b) 4.8 mM $\pm$ 0.96 mM de L-histidina; (c) 5.2 mM $\pm$ 1.04 mM monohidrócloruro L-histidina monohidrato, (d) 0.2% $\pm$ 0.1% p/v polisorbato 80, (e) 5% $\pm$ 1% p/v sacarosa; y (f) 1.5% $\pm$ 0.3% p/v prolina en agua a pH 6.0 $\pm$ 0.3.
48. Una formulación farmacéutica, CARACTERIZADA porque comprende:
- (a) 25 mg/mL $\pm$ 3.75 mg/mL de un anticuerpo que se une específicamente a PD-1, donde el anticuerpo comprende un HCVR de SEQ ID N° 1 y un LCVR de SEQ ID N°2,
 - (b) 10 mM $\pm$ 2 mM de tampón de histidina, pH 6.0 $\pm$ 0.3,
 - (c) 0.2% $\pm$ 0.1% p/v polisorbato 80,
 - (d) 5% $\pm$ 1% p/v sacarosa; y
 - (e) 1.5% $\pm$ 0.3% p/v prolina; donde
 - (i) $\geq$ 90% de los anticuerpos tienen un peso molecular de 143 kDa $\pm$ 1 kDa;
 - (ii) la formulación farmacéutica tiene una viscosidad de menos de 10 cP; y
 - (iii) al menos 96% o más de los anticuerpos tiene una conformación nativa tras el almacenamiento durante 12 meses a 5°C.
49. La formulación farmacéutica de la reivindicación 48, CARACTERIZADA porque consiste de: (a) 25 mg/mL $\pm$ 3.75 mg/mL del anticuerpo; (b) 4.8mM $\pm$ 0.96 mM L-histidina; (c) 5.2 mM $\pm$ 1.04 mM monohidrócloruro L-histidina monohidrato, (d) 0.2% p/v $\pm$ 0.1% polisorbato 80, (e) 5% p/v $\pm$ 1% sacarosa; y (f) 1.5% p/v $\pm$ 0.3% prolina, en agua a pH 6.0 $\pm$ 0.3.
50. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 49, CARACTERIZADA porque el anticuerpo comprende un HCDR1 de SEQ ID N°3, un HCDR2 de SEQ ID N° 4, un HCDR3 de SEQ ID N° 5, un LCDR1 de SEQ ID N° 6, un LCDR2 de SEQ ID N° 7 y un LCDR3 de SEQ ID N° 8.
51. La formulación farmacéutica de la reivindicación 50, CARACTERIZADA porque el anticuerpo comprende un HCVR de SEQ ID N°1 y un LCVR de SEQ ID N° 2.

52. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 51, CARACTERIZADA porque el anticuerpo comprende un HCVR que tiene 90% de identidad de secuencia con SEQ ID N° 1.
53. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 51, CARACTERIZADA porque el anticuerpo comprende un LCVR que tiene 90% de identidad de secuencia con SEQ ID N° 2.
54. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 51, CARACTERIZADA porque el anticuerpo comprende un HCVR que tiene 90% de identidad de secuencia con SEQ ID N° 1 y un LCVR que tiene un 90% de identidad de secuencia con SEQ ID N°2.
55. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 51, CARACTERIZADA porque el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácido seleccionada del grupo que consiste de SEQ ID N° 9 y 11.
56. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 51, CARACTERIZADA porque el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 9.
57. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 51, CARACTERIZADA porque el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena pesada comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 11.
58. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 51, CARACTERIZADA porque el anticuerpo comprende una cadena pesada y una cadena ligera, donde la cadena ligera comprende una secuencia de aminoácido de SEQ ID N° 10.
59. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 51, CARACTERIZADA porque el anticuerpo comprende una cadena pesada/una cadena ligera, que comprende las secuencias de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de SEQ ID N°s 9/10 y 11/10.
60. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 51, CARACTERIZADA porque el anticuerpo comprende una cadena pesada/una cadena ligera, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°s: 9/10.
61. La formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 51, CARACTERIZADA porque el anticuerpo comprende una cadena pesada/una cadena ligera, que comprende las secuencias de aminoácidos de SEQ ID N°s: 11/10.
62. Una formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 – 61, CARACTERIZADA porque dicha formulación está contenida en un contenedor.
63. La formulación farmacéutica de la reivindicación 62, CARACTERIZADA porque el contenedor es un frasco.

64. La formulación farmacéutica de la reivindicación 63, CARACTERIZADA porque el frasco es un frasco de vidrio transparente tipo 1 de 10 mL.
65. La formulación farmacéutica de la reivindicación 62, CARACTERIZADA porque el contenedor es una jeringa.
66. La formulación farmacéutica de la reivindicación 65, CARACTERIZADA porque la jeringa es vidrio de bajo contenido de tungsteno.
67. La formulación farmacéutica de la reivindicación 62, CARACTERIZADA porque el contenedor es una jeringa precargada.
68. La formulación farmacéutica de la reivindicación 62, CARACTERIZADA porque está contenida en un autoinyector.
69. Un kit que comprende una formulación farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 1 - 61, CARACTERIZADO porque comprende un contenedor, e instrucciones.
70. El kit de la reivindicación 69, CARACTERIZADO porque el contenedor es un frasco de vidrio.
71. El kit de la reivindicación 69, CARACTERIZADO porque el contenedor es una jeringa precargada.
72. El kit de la reivindicación 69, CARACTERIZADO porque el contenedor es un autoinyector.

RESUMEN

La presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas estables que comprenden un anticuerpo humano que se une específicamente a la proteína de muerte programada 1 humana (PD-1). En ciertas realizaciones, las formulaciones contienen, además de un anticuerpo anti-PD-1, un tampón, un aminoácido, un surfactante no iónico y un azúcar. Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención exhiben un grado sustancial de estabilidad del anticuerpo tras estrés y almacenamiento.

TITULO

FORMULACION ESTABLE DE ANTICUERPOS

Formulación		150 mg/mL mAb1, 10 mM histidina									
Volumen de llenado		0.4 mL									
Contenedor/Cierre		Frasco de vidrio borosilicato Tipo 1 de 2 mL con un tampon de goma butilo recubierto 4432/50 con EluroTec(R)									
Excipientes	pH	Color y Apariencia	Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)	pH	% mAb1 recuperado por RP-UPLC	Pureza por SE-UPLC			Variantes Cargadas por CEX-UPLC		
						% HMW	% Nativo	% LMW	% acido	% principal	% básico
Material Inicial(a1)	-	Aprueba	0.00	-	100	3.4	96.1	0.5	26.2	48.9	24.9
-	5.3	Reprueba	Muestra Gelificada								
	5.6	Reprueba	Muestra Gelificada								
	5.9	Reprueba	0.40	5.8	95	49.3	49.9	0.8	32.5	39.1	28.4
	6.0	Reprueba	0.51	6.0	99	44.1	55.0	0.9	36.9	41.9	21.3
	6.4	Reprueba	0.65	6.3	98	38.1	61.0	0.9	45.9	34.8	19.4
9% Sacarosa	5.3	Aprueba	0.14	5.3	95	46.9	52.4	0.7	33.7	37.6	28.6
	5.5	Aprueba	0.16	5.5	99	34.9	64.2	0.9	35.7	36.3	28.0
	5.9	Aprueba	0.13	5.8	100	25.5	73.6	1.0	36.0	37.2	26.8
	6.0	Aprueba	0.14	6.0	99	21.9	77.1	1.0	40.0	34.5	25.5
	6.4	Aprueba	0.15	6.3	98	19.6	79.4	1.0	48.9	26.7	24.4
5% Sacarosa 70 mM Arginina	5.4	Reprueba	Muestra Gelificada								
	5.6	Reprueba	Muestra Gelificada								
	5.9	Reprueba	Muestra Gelificada								
	6.0	Reprueba	Muestra Gelificada								
	6.4	Reprueba	0.46	6.3	100	45.8	53.1	1.0	46.6	31.1	22.3

FIGURA 1

Formulación		175 mg/mL mAb1, 10 mM histidina (excepto F9 con 20 mM), 0.1% polisorbato 80									
Volumen de llenado		0.4 mL									
Contenedor/Cierre		Frasco de vidrio borosilicato Tipo 1 de 2 mL con un tapon de goma butilo 4432/50 recubierto con FluroTec(R)									
Excipientes	Formulación N°	Color y Apariencia	Turbiedad (aumento en OD a 405 nm)	pH	% mAb1 recuperado por RP-UPLC	Pureza por SE-UPLC			Variantes cargadas por CEX-UPLC		
						% HMW	% Nativo	% LMW	% ácido	% principal	% Básico
Material Inicial	-	Aprueba	0.00	6.1	100	2.3	97.1	0.6	26.1	46.8	27.1
-	F1	Aprueba	0.20	6.1	72	51.4	48.0	0.6	28.1	44.9	27.0
9% sacarosa	F2	Aprueba	0.08	6.1	94	26.6	72.6	0.8	30.0	42.9	27.1
5% sacarosa 1.5 Prolina	F3	Aprueba	0.06	6.1	93	31.1	68.1	0.7	30.2	43.5	26.3
5% sacarosa 3.0% prolina	F4	Aprueba	0.07	6.1	93	28.9	70.3	0.8	30.4	43.3	26.3
3% prolina	F5	Aprueba	0.16	6.1	88	45.5	53.9	0.6	28.7	41.9	29.4
5% sacarosa, 1.5% prolina 25 mM arginina	F6	Aprueba	0.13	6.1	94	39.5	59.8	0.7	28.2	41.5	30.3
5% sacarosa 1.5% prolina 25mM Mg(OAc)2	F7	Aprueba	0.15	6.2	91	41.1	58.1	0.8	32.7	35.5	31.8
5% sacarosa, 1.5% prolina 25mM NaCl	F8	Aprueba	0.16	6.1	84	40.4	58.9	0.7	28.7	42.0	29.3
5% sacarosa, 1.5% prolina 25mM histidina	F9	Aprueba	0.13	6.1	90	40.0	59.2	0.7	28.9	43.8	27.3

FIGURA 5