

FORMULACIÓN FARMACÉUTICA QUE COMPRENDE BEVACIZUMAB

CAMPO TÉCNICO

La presente invención pertenece al campo técnico de la biomedicina, y en particular
5 se refiere a una formulación farmacéutica que comprende bevacizumab.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Los fármacos de proteínas (anticuerpos) altamente específicos, efectivos y seguros,
10 especialmente fármacos de anticuerpos terapéuticos, se han convertido en un punto de acceso global para el desarrollo de fármacos. Bevacizumab (nombre comercial chino: 安维汀®; nombre comercial en inglés: Avastin®) se desarrolló por Roche, y se aprobó por primera vez para su comercialización por la FDA de E.U.A. en el 2004 para utilizarse ampliamente en el tratamiento de una variedad de tumores malignos, tales como cáncer colorrectal metastásico, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer
15 de células renales, cáncer de ovario, cáncer de cuello uterino y glioblastoma. Bevacizumab es un anticuerpo IgG1 monoclonal humanizado y se une específicamente al factor de crecimiento endotelial vascular, de este modo bloqueando su unión a receptores (Flt-1 y KDR) en la superficie de las células endoteliales, evitando una serie de reacciones en cascada subsiguientes, inhibiendo la neogénesis de vasos sanguíneos anormales, previniendo de este modo el crecimiento y la diseminación de tumores,
20 y finalmente logrando el propósito de eliminar los tumores. Además, el bevacizumab tiene una fuerte especificidad y por lo general no interfiere con otros objetivos mientras bloquea la trayectoria del VEGF. Ya que bevacizumab puede destruir los vasos sanguíneos anormales y normalizar los vasos sanguíneos maduros, por lo general se utiliza para quimioterapia combinada, es decir, se utiliza junto con otros fármacos contra los tejidos tumorales. En tales terapias, bevacizumab puede ayudar y consolidar de manera efectiva el efecto terapéutico de otros fármacos (Presta L G, Chen H, O'Connor
25 S J, Chisholm V, Meng YG, Krummen L, et al. Cancer Res 1997;57:4593-9).

En el estudio de fármacos de anticuerpos monoclonales, el estudio de formulaciones farmacéuticas juega un papel importante. Los anticuerpos monoclonales IgG1 se utilizan principalmente como formulaciones líquidas para inyección y la proteína en las formulaciones líquidas
30 es apta para formar agregados o partículas, que afectarán la estabilidad. Mantener la buena estabilidad física, química y biológica de las formulaciones líquidas de anticuerpo monoclonal durante el almacenamiento se ha vuelto un tema que no se puede ignorar. Existe una necesidad urgente para el desarrollo de formulaciones de proteínas estables que pueda cumplir los requisitos de la industria farmacéutica.

35

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Es un objetivo de la presente invención proporcionar una formulación farmacéutica que comprenda bevacizumab.

De acuerdo con la presente invención, el sistema regulador de pH se examinó con bevacizumab (proteína HLX04) como el objeto de estudio mediante detección y optimización de fórmulas; y los efectos de diferentes fuerzas de iones, pH, tipo de estabilizador, tipos y contenido del agente tensoactivo, etc. en el sistema regulador de pH en la estabilidad de la proteína se examinaron en condiciones de aceleración de alta temperatura mediante el diseño de un experimento de un solo factor. La escala de proporción del contenido de cada componente en la formulación se determinó de manera experimental.

De acuerdo con la presente invención, los elementos de detección implicados en la evaluación de la estabilidad de la proteína en la formulación bajo una condición de aceleración de alta temperatura incluyen: apariencia, concentración de la proteína (A280), osmolalidad, pureza (SEC-HPLC, CEX-HPLC, y CE-SDS), tamaño de partícula promedio de la proteína, PDI (DLS), y el número de partículas sub-visibles (FlowCam).

Una formulación farmacéutica preferida de la presente invención incluye: bevacizumab, un regulador de pH, un estabilizador y un agente tensoactivo, en donde el bevacizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado recombinante con un contenido de preferiblemente 10-100 mg/mL, preferiblemente 10-80 mg/mL, o 10-50 mg/mL, y más preferiblemente 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL, y 80 mg/mL.

Preferiblemente, el regulador de pH de la presente invención incluye: uno de un sistema de histidina-clorhidrato de histidina, un sistema de ácido acético-acetato de sodio y un sistema de clorhidrato de histidina-acetato de sodio; más preferiblemente, el regulador de pH es un sistema regulador de pH de ácido acético-acetato de sodio, o un sistema regulador de pH de clorhidrato de histidina-acetato de sodio; y lo más preferiblemente, el regulador de pH es un sistema regulador de pH de clorhidrato de histidina-acetato de sodio.

El pH de la formulación farmacéutica es preferiblemente 5.0-5.6, y preferiblemente 5.3.

En el sistema regulador de pH, el regulador de pH de histidina-clorhidrato de histidina, regulador de pH de ácido acético-acetato de sodio, y regulador de pH de clorhidrato de histidina-acetato de sodio están preferiblemente a una concentración de 10-30 mM, en donde el regulador de pH de clorhidrato de histidina-acetato de sodio está preferiblemente a una concentración de 10 mM.

La formulación de la presente invención también comprende un estabilizador para mantener la estabilidad del fármaco de proteína y mantener la función del fármaco de proteína sin verse afectada por cambios en las condiciones (tal como cambios en congelación, liofilización u otras

condiciones de preparación). El estabilizador se selecciona preferiblemente de: uno o más de sacarosa, trehalosa, manitol, sorbitol o glicina; y el estabilizador es preferiblemente sacarosa, trehalosa, y sorbitol, y más preferiblemente es sacarosa y sorbitol. El contenido del estabilizador es preferiblemente: 20-100 mg/mL; más preferiblemente: 25-50 mg/mL; y preferiblemente: 45 mg/mL.

5 El agente tensoactivo es un agente tensoactivo convencional en la técnica y preferiblemente, un agente tensoactivo no iónico. Un ejemplo del agente tensoactivo en la presente es preferiblemente, polisorbato, y más preferiblemente Tween 80. El contenido del agente tensoactivo es preferiblemente 0.1-0.5 mg/mL, y preferiblemente 0.2 mg/mL.

10 Las formas de dosificación de la formulación farmacéutica son formas de dosificación convencionales en la técnica, preferiblemente incluyendo una formulación líquida o formulación liofilizada para inyección. La formulación líquida para inyección preferiblemente incluye una formulación para inyección subcutánea, una formulación para inyección intravenosa, una formulación para administración intraperitoneal, una formulación para inyección intramuscular, una formulación para inyección intravenosa/subcutánea o una formulación para inyección intravítrea. La formulación
15 líquida para inyección preferiblemente incluye una formulación de solución acuosa para inyección y una formulación para inyección con jeringa precargada, preferiblemente la formulación de solución acuosa para inyección, y la formulación de solución acuosa para inyección pueden usarse para inyección intravenosa o inyección intravítrea.

20 Una formulación preferida de bevacizumab se determina sobre la base de los resultados del estudio de un solo factor y su composición es la siguiente: 25 mg/mL de bevacizumab, 10 mM de clorhidrato de histidina-acetato de sodio (pH 5.3), 45 mg/mL de sorbitol, y 0.2 mg/mL de Tween 80. De acuerdo con la proporción antes mencionada, un producto acabado se prepara y la estabilidad de la fórmula de la formulación de la presente invención se verifica por medio de un estudio de estabilidad acelerado y estudio de estabilidad de congelación y descongelación repetidos. Las
25 formulaciones de la presente solicitud se comparan con las diferentes formulaciones en pruebas de estabilidad. Se puede ver de acuerdo con el análisis de los resultados con respecto a los isómeros moleculares, los isómeros de carga y las partículas subvisibles en las pruebas de aceleración a alta temperatura que la estabilidad de bevacizumab en la formulación de la presente invención es significativamente mejor que la de otras formulaciones.

30

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figuras 1A a 1F Examinación de las propiedades fisicoquímicas de la proteína HLX04 en los sistemas reguladores de pH de las formulaciones que se muestran en el Cuadro 5,
35 en donde (Figura 1A) ilustra las temperaturas Tagg en la semana 0, (Figura 1B) ilustra los valores KD

en la semana 0; (Figura 1C) ilustra los tamaños de partícula promedio y los índices de polidispersidad (PDI) de la proteína HLX04 en los sistemas reguladores de pH en la semana 0 y después de reposar a 40 °C durante 4 semanas; (Figura 1D) ilustra el porcentaje de área Pk 1 de la proteína HLX04 en el sistema regulador de pH en la semana 0 y después de reposar a 40 °C durante 4 semanas; (Figura 1E) tendencia de cambio del contenido de agregados de SEC a 40°C; y (Figura 1F) la tendencia de cambio del contenido de los picos principales de CEX a 40°C.

Figuras 2A a 2E Examinación de las propiedades fisicoquímicas de la proteína HLX04 en los sistemas reguladores de pH de las formulaciones que se muestran en el Cuadro 8, en donde (Figura 2A) es un diagrama que indica la comparación de estabilidad termodinámica, (Figura 2B) muestra la tendencia de cambio del tamaño de partícula promedio de la proteína a 40°C; (Figura 2C) muestra la tendencia de cambio del contenido de agregados de SEC a 40°C; (Figura 2D) muestra la tendencia de cambio del contenido de los picos principales de CEX a 40 °C; y (Figura 2E) muestra la tendencia de cambio del número de partículas subvisibles (por medio de FlowCam) a 40°C.

Figuras 3A a 3E Examinación de las propiedades fisicoquímicas de la proteína HLX04 en los sistemas reguladores de pH de las formulaciones que se muestran en el Cuadro 11, en donde (Figura 3A) es un diagrama que indica la comparación de estabilidad termodinámica, (Figura 3B) muestra la tendencia de cambio del tamaño de partícula promedio de la proteína a 40°C; (Figura 3C) muestra la tendencia de cambio del contenido de agregados de SEC a 40°C; (Figura 3D) muestra la tendencia de cambio del contenido de los picos principales de CEX a 40 °C; y (Figura 3E) muestra la tendencia de cambio del número de partículas subvisibles (por medio de FlowCam) a 40°C.

Figuras 4A a 4E Examinación de las propiedades fisicoquímicas de la proteína HLX04 en los sistemas reguladores de pH de las formulaciones que se muestran en el Cuadro 14, en donde la figura (Figura 4A) muestra un diagrama que indica la comparación de estabilidad termodinámica, (Figura 4B) muestra la tendencia de cambio del tamaño hidrodinámico promedio y PDI a 40°C medido por DLS; (Figura 4C) muestra la tendencia de cambio del contenido de agregados de SEC a 40°C; (Figura 4D) muestra la tendencia de cambio del contenido de los picos principales de CEX a 40 °C; y (Figura 4E) muestra la tendencia de cambio del número de partículas subvisibles (por medio de FlowCam) a 40°C.

Figuras 5A a 5I Examinación de las propiedades fisicoquímicas de la proteína HLX04 en los sistemas reguladores de pH de las formulaciones que se muestran en el Cuadro 20, en donde (Figura 5A) muestra un diagrama que indica la comparación de la estabilidad termodinámica; (Figura 5B) muestra la tendencia de cambio del tamaño hidrodinámico promedio y PDI medido por DLS a 40°C; (Figura 5C) muestra la tendencia de cambio del contenido de agregados de SEC a 40°C; (Figura 5D) muestra la tendencia de cambio del contenido de los picos principales de CEX a 40 °C; y (Figura 5E) muestra la tendencia de cambio de partículas subvisibles (por medio de FlowCam) a 40 °C; (Figura

5F) muestra la tendencia de cambio del tamaño hidrodinámico promedio y Pdl medido por DLS a -20°C a temperatura ambiente; (Figura 5G) muestra la tendencia de cambio del contenido de agregados de SEC a -20°C a temperatura ambiente; (Figura 5H) muestra la tendencia de cambio del contenido de los picos principales de CEX de -20 °C a temperatura ambiente; e (Figura 5I) muestra la tendencia de cambio del número de partículas subvisibles (por medio de FlowCam) a -20 °C a temperatura ambiente.

Las figuras 6A, 6B y 6C Los diagramas modelo del perfilador de conveniencia obtenidos al utilizar el software JMP.

Figuras 7A a 7E Examinación de las propiedades fisicoquímicas de la proteína HLX04 en los sistemas reguladores de pH de las formulaciones que se muestran en el Cuadro 26, (Figura 7A) muestra un diagrama que indica la comparación de estabilidad termodinámica; (Figura 7B) muestra la tendencia de cambio del tamaño de partícula promedio de la proteína a 40°C medido por DLS; (Figura 7C) muestra la tendencia de cambio del contenido de picos principales de SEC a 40°C; (Figura 7D) muestra la tendencia de cambio del contenido de los picos principales de CEX a 40 °C; y (Figura 7E) muestra la tendencia de cambio del número de partículas subvisibles (por medio de FlowCam) a 40°C.

Figuras 8A a 8D Diagramas de comparación de la estabilidad a diferentes concentraciones de proteína, (Figura 8A) muestra la tendencia de cambio del contenido de agregados de SEC; (Figura 8B) muestra la tendencia de cambio del contenido de los fragmentos de SEC; (Figura 8C) muestra la tendencia de cambio del contenido de IgG (CE-SDS no reductor); y (Figura 8D) muestra la tendencia de cambio del contenido de los picos principales de CEX.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Los siguientes ejemplos pretenden proporcionar a los expertos en la técnica con una revelación y descripción completas con respecto a cómo implementar y utilizar la presente invención y no pretenden limitar el alcance de la invención, ni pretenden significar que los experimentos a continuación son todos los experimentos implementados y los únicos experimentos que se pueden implementar.

Los reactivos químicos utilizados en los ejemplos son todos reactivos analíticos comercialmente disponibles y el anticuerpo monoclonal recombinante puede ser un anticuerpo monoclonal preparado de acuerdo con cualquier método conocido. El siguiente método de preparación de anticuerpos ejemplar es proporcionado por Shanghai Henlius Biotechnology Co., Ltd., y el método ejemplar no limita la presente invención.

La proteína de anticuerpos utilizada en este estudio es HLX04 (bevacizumab), y el anticuerpo se prepara de acuerdo con el método convencional en la técnica anterior, en donde las

secuencias de cadena ligera y pesada del mismo son las siguientes:

Cadena ligera

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKVLIIYFTSSLHSGVPS
RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYSTVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
5 SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Cadena pesada

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFTNYGMNWVRQAPGKLEWVGWINTYTGEPTYAAD
FKRRFTFSLDTSKSTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAKYPHYGSSHWYFDVWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS
10 KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV
LQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
15 SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

EJEMPLO 1

Método de detección

20 1.1. Apariencia y partículas visibles

La apariencia se detecta por medio de inspección visual. La botella de muestra se limpia y se coloca en el probador de claridad SC-4000A (Huanghai Medicine & Drug Testing Instruments, Shanghai) en un cuarto oscuro, la intensidad de la iluminación se ajusta a 1000-1500 Lux, la muestra se coloca en el borde (25 cm) de la placa de bloqueo de luz, y el color, claridad, 25 partículas visibles, etc. se inspeccionan visualmente contra un fondo negro y un fondo blanco, respectivamente, mientras se sujeta el cuello del frasco de penicilina de muestra.

1.2. Contenido de proteína

La absorbancia de la muestra a la longitud de onda de 280 nm se mide y la concentración de proteína se calcula al utilizar un medidor de concentración de proteína Trinean 30 Dropsense16. El coeficiente de extinción es $1.60 \text{ mL} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

1.3. pH

La muestra (25 μL) se toma y el pH de la misma se determina al utilizar un medidor de parámetro multifuncional Mettler Toledo, que se calibra con tres soluciones estándar (el pH es 4.01, 7.00 y 9.21, respectivamente), de modo que la pendiente del electrodo esté en la escala de 35 95%-105%.

1.4. Osmolalidad

La determinación se lleva a cabo de acuerdo con la Regla General 0632 “Determinación de Osmolalidad”, Farmacopea de la República Popular China (Edición 2015) utilizando un osmómetro Advanced Osmo PRO. La muestra (20 µL) y dos estándares de osmolalidad de 290 mOsmol/kg se toman, y los valores de osmolalidad de la muestra y los estándares se determinan al utilizar el método crioscópico.

1.5.Viscosidad

La viscosidad de la muestra se mide al utilizar el viscosímetro BROOKFIELD DV2T. El hervidor de baño de agua externo se enciende, la temperatura se fija a 25°C, 0.5 mL de la muestra se succiona y gota a gota se agrega en el centro de la copa de muestra, la velocidad del rotor se ajusta de modo que el par de medición caiga entre 40% y 60%, y se determina la viscosidad de la muestra.

1.6.DLS

El tamaño de partículas y la distribución del tamaño de partículas de la muestra se determinan al utilizar el instrumento de dispersión de luz estática y dinámica de alto rendimiento DynaPro PlateReader-III. En un banco limpio, se toma la muestra (25 µL) y se agrega a los micropozos de una placa de 384 pozos y después de completar la adición, la placa se cubre con una película. La placa de 384 pozos cubierta con película se coloca en una centrífuga refrigerada y se somete a centrifugado para eliminar las burbujas en los micropozos de la muestra. Los ajustes de parámetros específicos del instrumento se muestran en el Cuadro 1.

20

CUADRO 1

Ajustes de parámetros de instrumento de dispersión de luz estática y dinámica de alto rendimiento para la detección del tamaño de partículas

Módulo	Parámetro	Valor ajustado
Experimento	Tipo de experimento	Isotérmico
	Atenuación automática	Sí
	Imagen de cada pozo de muestra	Sí
	Tiempo de adquisición de dispersión de luz dinámica	5 s
	Número de adquisición de dispersión de luz dinámica de cada pozo de muestra	10
	Detección de luz estática	No
Detección de duplicados	Número de detección de cada pozo de muestra	1
	Tiempo de espera entre barridos de pozos de muestra	0 min
	Número de barridos	1

Módulo	Parámetro	Valor ajustado
	Tiempo de espera entre barridos	0 min
Temperatura	Temperatura de inicio	25°C
	Placa de muestra	Sellado
Fin del experimento	Temperatura	25°C
	Detector	Apagado

1.7.Temperatura Tagg

La temperatura de agregación de la muestra se determinan al utilizar el instrumento de dispersión de luz estática y dinámica de alto rendimiento DynaPro PlateReader-III. En un banco
5 limpio, se toma la muestra (25 μ L) y se agrega a los micropozos de una placa de 384 pozos y después de completar la adición, la placa se cubre con una película. La placa de 384 pozos cubierta con película se coloca en una centrífuga refrigerada y se somete a centrifugado para eliminar las burbujas en los micropozos de la muestra. Los ajustes de parámetros específicos del instrumento se muestran en el Cuadro 2.

10

CUADRO 2

Ajustes de parámetros de instrumento de dispersión de luz estática y dinámica de alto rendimiento para la detección de la Tagg

Módulo	Parámetro	Valor ajustado
Experimento	Tipo de experimento	Rampa térmica
	Atenuación automática	Sí
	Imagen de cada pozo	Sí
	Tiempo de adquisición de dispersión de luz dinámica	5 s
	Número de adquisición de dispersión de luz dinámica de cada pozo de muestra	5
	Detección de luz estática	No
Temperatura	Temperatura de inicio	40°C
	Temperatura final	80°C
	Placa de muestra	Sellado
Fin del experimento	Temperatura	25°C
	Detector	Apagado

1.8.DSC

Los parámetros termodinámicos $T_{m \text{ inicio}}$, valores T_{m1} y T_{m2} relacionados con la conformación de las proteínas se determina al utilizar el calorímetro diferencial de barrido TA Nano DSC. La muestra de proteína se diluye a una concentración de 1 mg/mL con un placebo, y la muestra
 5 de proteína diluida y el placebo correspondiente se colocan respectivamente en una placa de muestra de 96 pozos y, después del tratamiento de desgasificación, se colocan bajo una condición de presión de 300 ± 50 Kpa. El tiempo de pre-equilibrio se ajusta en 600 s, la escala de temperatura se ajusta en 25°C - 100°C , y la velocidad de barrido se ajusta en $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Las curvas de DSC de la muestra de proteína y placebo se recolectan, respectivamente, con tres veces de barrido para el placebo y un
 10 barrido para la muestra de proteína. Se selecciona el modelo a escala de dos estados para el ajuste de datos.

1.9.SEC-HPLC

La detección de SEC-HPLC se lleva a cabo al utilizar cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent 1260 con una columna cromatográfica TOSOH TSKgel G3000 ($7.8 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$,
 15 $5 \mu\text{m}$). La temperatura de la columna es temperatura ambiente (sin controlar la temperatura), la temperatura de la charola de la muestra es 2°C - 8°C , la fase móvil consiste en 100 mM dihidrógeno fosfato de sodio y 0.5% de cloruro de sodio, el pH es de 6.8 y se realiza una elución isocrática. El tiempo de elución es 30 min, y la velocidad de flujo es 0.5 mL/min. La longitud de onda de detección es 280 nm, la concentración de la muestra se diluye a 1 mg/mL, y el volumen de inyección es 50 μL .

20 1.10. CEX-HPLC

La detección de CEX-HPLC se lleva a cabo al utilizar cromatografía líquida de alto rendimiento Agilent 1260 con una columna cromatográfica Thermo ProPac™WCX-10 ($4 \text{ mm} \times 250 \text{ mm}$, $10 \mu\text{m}$). La temperatura de la columna es 35°C , la temperatura de la charola de muestra es 2°C - 8°C , la fase móvil A consiste en 50 mM de regulador de pH de fosfato (el pH siendo 6.10), la fase
 25 móvil B (el pH siendo 6.10) consiste en 50 mM del regulador de pH de fosfato y 300 mM de cloruro de sodio, y se lleva a cabo la elución en gradiente. El gradiente de elución se puede ver en el Cuadro 3, y la velocidad de flujo es 1.0 mL/min. La longitud de onda de detección es 280 nm, la concentración de la muestra se diluye a 1 mg/mL, y el volumen de inyección es 50 μL .

CUADRO 3**Gradiente de elución de CEX-HPLC**

Tiempo de retención	Fase móvil B%	Tasa de flujo (mL / min)
0.0 min	4.0%	1.0
3.0 min	4.0%	1.0
31.0 min	31.0%	1.0
32.0 min	100.0%	1.0
34.0 min	100.0%	1.0
34.1 min	4.0%	1.0
39.0 min	4.0%	1.0

1.11. CE-SDS

- 5 La determinación se lleva a cabo de acuerdo con la Regla General 3127 “Determinación de Heterogeneidades de Tamaño Molecular en Anticuerpos Monoclonales (método CE-SDS)”, Farmacopea de la República Popular China (Edición 2015). La detección se lleva a cabo utilizando CE-SDS de reducción y de no reducción. Se utilizan el aparato de electroforesis capilar Beckman Coulter PA800 plus y un capilar sin recubrimiento con una longitud total de 67 cm y un diámetro interior de
- 10 50 μm . Inyección: 5 KV, 20.0 s; separación: 15 KV, 35.0 min, y la detección se lleva a cabo a la longitud de onda de 220 nm al utilizar un detector PDA; y el cálculo se lleva a cabo por medio del método de normalización de área.

1.12. FlowCam

- 15 La morfología y el número de las partículas sub-visibles en la muestra se determinan al utilizar el detector analítico de partículas FlowCam 8100. Los ajustes de parámetros específicos del instrumento se muestran en el Cuadro 4.

CUADRO 4**Ajustes de parámetros de detección del detector analítico de partículas FlowCam 8100**

Categoría	Parámetro	Valor ajustado
Captura	Distancia al vecino más cercano (μm)	0
	Cerrar orificios	2
Umbral de segmentación	Píxeles oscuros	15
	Píxeles claros	15
	Píxeles oscuros y claros	Seleccionado
Célula de flujo	Tipo de célula de flujo	FC80FV
	Profundidad de la célula de flujo (μm)	81
	Ancho de la célula de flujo (μm)	700
Fluídicos	Volumen de la muestra, mL	0.4
	Velocidad de flujo, mL/min	0.1
	% de Eficiencia	Aproximadamente 70%

EJEMPLO 2Sistema regulador de pH y estudio de detección de pH

5 Para el estudio del sistema regulador de pH/pH, se llevan a cabo dos rondas de experimentos, y el tipo y la escala de pH del sistema regulador de pH se examinan mediante el diseño de un experimento de un solo factor.

2.1 Sistema regulador de pH/Estudio de detección de pH-I

2.1.1 Protocolo del estudio

10

CUADRO 5Información de la formulación del sistema regulador de pH/estudio de detección de pH-I

No.	Tipo de regulador de pH	Fuerza iónica, mmol/L	pH	Código
B1	Citrato-citrato de sodio	20	5.5	C55
B2			6.0	C60
B3	Histidina-clorhidrato de histidina	20	5.5	H55
B4			6.0	H60
B5	Ácido acético-acetato de sodio	20	5.0	A50
B6			5.5	A55
B7	Clorhidrato de histidina-acetato de sodio	20	5.5	HA55
B8	Dihidrógeno fosfato de sodio-hidrógeno fosfato disódico	50	6.2	PB62

15 En este estudio, la solución madre de proteína HLX04 (número de lote: AS201801) en donde Tween 20 se ha eliminado al utilizar cromatografía de cationes se somete a ultrafiltración e intercambio de medios y luego la concentración de la proteína se ajusta para preparar una formulación alternativa con una concentración de proteína final de aproximadamente 25.0 mg/mL (Cuadro 5). En un gabinete de bioseguridad, la muestra se filtra al utilizar un filtro estéril desechable de 0.22 µm y luego 1 mL de la solución de proteína se subenvasa asépticamente en frascos de penicilina de 2 mL. Los frascos están tapados con tapones de goma de 13 mm y se utilizan tapas compuestas de aluminio y plástico de 13 mm para sellar los tapones. Las muestras sub-avasadas se colocan a una temperatura constante y la cámara de humedad a 40°C para almacenamiento, y se muestrean y detectan de acuerdo con los requisitos de diseño en el Cuadro 6.

20

CUADRO 6**Condiciones de examinación y métodos de detección del sistema regulador de pH/estudio de detección de pH-I**

Condiciones de examinación	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 4
40°C	X, Y, Z	X	X	X, Y
X: Apariencia, contenido de proteína (A_{280}), SEC, y CEX Y: pH, DLS Z: Tagg, KD				

5 2.1.1 Resultados del estudio

En la semana 0, la temperatura Tagg es relativamente más alta (Figura 1A), el valor KD es positivo (Figura 1B), y el tamaño de partícula promedio es relativamente más chico (Figura 1C) para la proteína en los sistemas de histidina-clorhidrato de histidina, ácido acético-acetato de sodio y clorhidrato de histidina-acetato de sodio, lo que indica que la proteína muestra una mejor estabilidad conformacional y coloidal en los tres sistemas reguladores de pH.

Después de dejar reposar a 40°C durante 4 semanas, los resultados de las concentraciones de las proteínas y el pH no mostraron diferencia significativa (Cuadro 7). Los resultados de SEC muestran que los contenidos de los picos principales de las proteínas en cada sistema regulador de pH todos muestran una tendencia a la baja (Figura 1E), y en los tres sistemas reguladores de pH de citrato-citrato de sodio, histidina-clorhidrato de histidina y ácido acético-acetato de sodio, cuanto más bajo es el pH, mejor es la estabilidad. Las formulaciones se clasifican de superior a inferior como C55>A50>H55>HA55>C60≈A55>H60 (Figura 1E). Los resultados de DLS muestran que los índices de polidispersidad (PdI) de la proteína incrementan (Figura 1C), y el porcentaje de Área Pk 1 Int disminuye (Figura 1D) en los sistemas reguladores de pH de la histidina-clorhidrato de histidina y dihidrógeno fosfato de sodio-hidrógeno fosfato disódico, indicando que se produce un alto polímero soluble de menos de 1 μm . Los resultados de CEX muestran que los contenidos de los picos principales de las proteínas en cada sistema regulador de pH todos muestran una tendencia a la baja (Figura 1F), y la estabilidad de la proteína en el sistema regulador de pH de histidina-clorhidrato de histidina es significativamente mejor que en los otros sistemas reguladores de pH.

25

CUADRO 7**Resumen de datos del sistema regulador de pH/estudio de detección de pH-I**

Elemento de detección	Examinación Tiempo	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
		C55	C60	H55	H60	A50	A55	HA55	PB62
Concentración de la proteína (mg/mL)	Semana 0	25.4	25.1	25.0	24.8	25.3	25.6	25.1	25.2
	Semana 1	25.3	25.4	25.4	25.1	25.3	25.6	25.0	24.9
	Semana 2	25.4	25.4	24.8	25.1	25.3	25.1	25.0	24.8

Elemento de detección	Examinación Tiempo	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7	B8
		C55	C60	H55	H60	A50	A55	HA55	PB62
	Semana 4	25.3	25.3	25.3	25.1	25.3	25.5	25.2	25.0
pH	Semana 0	5.6	6.0	5.5	6.0	5.2	5.7	5.6	6.2
	Semana 4	5.5	6.0	5.6	6.0	5.1	5.7	5.6	6.2

2.2 Sistema regulador de pH/Estudio de detección de pH-II

2.2.1 Protocolo del estudio

- Los resultados del sistema regulador de pH/estudio de detección de pH I muestran
- 5 que en los sistemas reguladores de pH de histidina-clorhidrato de histidina, ácido acético-acetato de sodio y citrato-citrato de sodio, cuanto menor es el pH, mayor es el contenido del pico principal de SEC; y con respecto a las proteínas en las formulaciones sin estabilizantes y agentes tensoactivos, luego de ser puestas en condiciones de examen a 40°C durante 1 semana, se encuentran partículas visibles a simple vista en cada una de las formulaciones. Por lo tanto, en esta ronda de experimentos,
- 10 la detección del sistema regulador de pH se realiza además en la formulación con sacarosa y Tween 80 a un pH bajo de 5.0.

CUADRO 8

Información de la formulación del sistema regulador de pH/estudio de detección de pH-

II

No.	Tipo de regulador de pH	Fuerza iónica, mmol/L	pH	Estabilizador	Agente tensoactivo	Código
B1	Clorhidrato de histidina-acetato de sodio	20	5.0	50 mg/mL de sacarosa	0.2 mg/mL de Tween 80	HA50
B2	Ácido acético-acetato de sodio					A50
B3	Citrato-citrato de sodio					C50
B4	Histidina-clorhidrato de histidina					H50

- En este estudio, la proteína HLX04 (número de lote: AS201901-PT) se somete a ultrafiltración e intercambio de medios, luego se agregan materiales auxiliares y la concentración de proteína se ajusta para preparar una formulación alternativa con una concentración de proteína final
- 20 de aproximadamente 25.0 mg/mL (Cuadro 8). En un gabinete de bioseguridad, la muestra se filtra al utilizar un filtro estéril desechable de 0.22 µm y luego 1 mL de la solución de proteína se subenvasa asépticamente en frascos de penicilina de 2 mL. Los frascos están tapados con tapones de goma de 13 mm y se utilizan tapas compuestas de aluminio y plástico de 13 mm para sellar los tapones. Las muestras sub-avasadas se colocan a una temperatura constante y la cámara de humedad a 40°C

para almacenamiento, y se muestrean y detectan de acuerdo con los requisitos de diseño en el Cuadro 9.

CUADRO 9

5 **Condiciones de examinación y métodos de detección del sistema regulador de pH/estudio de detección de pH-II**

Condiciones de examinación	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 4
40°C	X, Y, Z	X	X, Y	X, Y
X: Apariencia, contenido de proteína (A_{280}), pH, SEC, CEX y DLS Y: FlowCam Z: Osmolalidad, Tagg				

2.2.2 Resultados del estudio

10 En la semana 0, no hay diferencia significativa en los resultados básicos de detección fisicoquímica de las proteínas en cada sistema regulador de pH (Cuadro 10), y las formulaciones se clasifican de superior a inferior de acuerdo con las temperaturas de agregación Tagg son $A50 \approx HA50 > H50 > C50$ (Figura 2A) y se clasifican de superior a inferior de acuerdo con el tamaño de partícula promedio de la proteína como $A50 \approx HA50 \approx H50 > C50$ (Figura 2B). Eso indica que la proteína muestra una mejor estabilidad conformacional y coloidal en los sistemas reguladores de pH de ácido acético-acetato de sodio y clorhidrato de histidina-acetato de sodio.

15 Después de reposar a 40°C durante 4 semanas, no hay diferencia significativa en los resultados básicos de detección fisicoquímica (Cuadro 10). Los resultados de SEC muestran que los contenidos de los picos principales de las proteínas en cada sistema regulador de pH todos muestran una tendencia a la baja y las formulaciones se clasifican de superior a inferior como $A50 \approx H50 \approx HA50 > C50$ (Figura 2C). Los resultados de CEX muestran que los contenidos de los picos principales de las proteínas en cada sistema regulador de pH todos muestran una tendencia a la baja y las formulaciones se clasifican de superior a inferior como $H50 \approx HA50 > A50 > C50$ (Figura 2D). Las formulaciones se clasifican de superior a inferior de acuerdo con las partículas sub-visibles FlowCam como $A50 > H50 \approx HA50 > C50$ (Figura 2E).

25

CUADRO 10

Resumen de datos del sistema regulador de pH/estudio de detección de pH-II

Elemento de detección	Tiempo de examinación	B1	B2	B3	B4
		HA50	A50	C50	H50
Concentración de la proteína (mg/mL)	Semana 0	24.9	25.0	25.5	24.7
	Semana 1	25.1	25.3	26.0	25.3
	Semana 2	24.4	24.7	25.3	24.5
	Semana 4	24.3	24.6	25.3	24.5

Elemento de detección	Tiempo de examinación	B1	B2	B3	B4
		HA50	A50	C50	H50
pH	Semana 0	5.1	5.1	5.1	5.0
	Semana 1	5.0	5.1	5.1	5.0
	Semana 2	5.1	5.1	5.1	5.1
	Semana 4	5.1	5.1	5.1	5.0
Osmolalidad (mOsmol/kg)	Semana 0	202	214	219	203

2.2.3 Conclusión del estudio

Los resultados de esta ronda de estudio muestran que la proteína muestra una mejor estabilidad conformacional y coloidal en los sistemas reguladores de pH de ácido acético-acetato de sodio y clorhidrato de histidina-acetato de sodio. Los resultados con respecto a los isómeros de carga de la proteína en el sistema regulador de pH de histidina-clorhidrato de histidina son mejores, y después de una consideración exhaustiva, el clorhidrato de histidina-acetato de sodio se selecciona como el sistema regulador de pH de la proteína.

EJEMPLO 3

Detección de la fuerza iónica

3.1 Protocolo del estudio

CUADRO 11

Información de la formulación del estudio de detección de fuerza iónica

No.	Tipo de regulador de pH	Fuerza iónica, mmol/L	pH	Estabilizador	Agente tensoactivo	Código
B1	Clorhidrato de histidina-acetato de sodio	10	5.0	50 mg/mL de sacarosa	0.2 mg/mL de Tween 80	HA-10
B2		20				HA-20
B3		30				HA-30

En este estudio, la proteína HLX04 (número de lote: AS201901-PT) se somete a ultrafiltración e intercambio de medios, luego se agregan materiales auxiliares y la concentración de proteína se ajusta para preparar una formulación alternativa con una concentración de proteína final de aproximadamente 25.0 mg/mL (Cuadro 11). En un gabinete de bioseguridad, la muestra se filtra al utilizar un filtro estéril desechable de 0.22 μ m y luego 1 mL de la solución de proteína se subenvasa aseptícamente en frascos de penicilina de 2 mL. Los frascos están tapados con tapones de goma de 13 mm y se utilizan tapas compuestas de aluminio y plástico de 13 mm para sellar los tapones. Las muestras sub-ensadas se colocan a una temperatura constante y la cámara de humedad a 40°C para almacenamiento, y se muestrean y detectan de acuerdo con los requisitos de diseño en el Cuadro

12.

CUADRO 12Condiciones de examinación y métodos de detección del estudio de detección de fuerza iónica

5

Condiciones de examinación	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 4
40°C	X, Y, Z	X	X, Y	X, Y
X: Apariencia, contenido de proteína (A_{280}), pH, SEC, CEX y DLS Y: FlowCam Z: Osmolalidad, Tagg				

3.2 Resultados del estudio

En la semana 0, las formulaciones se clasifican de superior a inferior de acuerdo con las temperaturas de agregación Tagg (Figura 3A) y los tamaños de partícula promedio (Figura 3B) de las proteínas en los sistemas de clorhidrato de histidina-acetato de sodio como HA-10>HA-20>HA-30, lo que indica que la proteína muestra una mejor estabilidad conformacional y coloidal en un sistema regulador de pH de clorhidrato de histidina- acetato de sodio 10 mM.

Después de reposar a 40°C durante 4 semanas, no hay diferencia significativa en los resultados básicos de detección fisicoquímica (Cuadro 13). Los resultados de SEC muestran que los contenidos de los picos principales de las proteínas en cada sistema regulador de pH todos muestran una tendencia a la baja (figura 3C) y las formulaciones se clasifican de superior a inferior como HA-10>HA-20≈HA-30. Los resultados de CEX muestran que los contenidos de los picos principales de las proteínas en cada sistema regulador de pH todos muestran una tendencia a la baja y no hay diferencia significativa en las tendencias a la baja (Figura 3D). Las formulaciones se clasifican de superior a inferior de acuerdo con las partículas sub-visibles FlowCam como HA-10>HA-20≈HA-30 (Figura 3E).

CUADRO 13Resumen de datos del estudio de detección de fuerza iónica

Elemento de detección	Tiempo de examinación	B1	B2	B3
		HA-10	HA-20	HA-30
Concentración de la proteína (mg/mL)	Semana 0	25.1	24.9	24.8
	Semana 1	25.3	25.1	25.3
	Semana 2	24.5	24.4	24.5
	Semana 4	24.5	24.3	24.5
pH	Semana 0	5.1	5.1	5.0
	Semana 1	5.1	5.0	5.0
	Semana 2	5.2	5.1	5.1
	Semana 4	5.2	5.1	5.1
Osmolalidad (mOsmol/kg)	Semana 0	189	202	225

3.3 Conclusión del estudio

Los resultados de esta ronda de estudio muestran que la proteína muestra una mejor estabilidad conformacional y coloidal en 10 mM del sistema regulador de pH de clorhidrato de histidina-acetato de sodio. El contenido del pico principal de SEC muestra una tendencia a la baja más lenta.

- 5 Hay pocas partículas sub-visibles FlowCam.

EJEMPLO 4

Detección de la escala de Ph

10 4.1 Protocolo del estudio

CUADRO 14

Información de la formulación del estudio de detección de la escala de pH

No.	Tipo de regulador de pH	Fuerza iónica, mmol/L	pH	Estabilizador	Agente tensoactivo	Código
B1	Clorhidrato de histidina-acetato de sodio	10	5.0	100 mg/mL de sacarosa	0.2 mg/mL de Tween 80	HA50
B2			5.3			HA53
B3			5.6			HA56

- 15 En este estudio, la proteína HLX04 (número de lote: AS201901-PT) se somete a ultrafiltración e intercambio de medios, luego se agregan materiales auxiliares y la concentración de proteína se ajusta para preparar una formulación alternativa con una concentración de proteína final de aproximadamente 25.0 mg/mL (Cuadro 14). En un gabinete de bioseguridad, la muestra se filtra al utilizar un filtro estéril desechable de 0.22 μ m y luego 1 mL de la solución de proteína se subenvasa
- 20 asépticamente en frascos de penicilina de 2 mL. Los frascos están tapados con tapones de goma de 13 mm y se utilizan tapas compuestas de aluminio y plástico de 13 mm para sellar los tapones. Las muestras sub-ensadas se colocan a una temperatura constante y la cámara de humedad a 40°C para almacenamiento, y se muestrean y detectan de acuerdo con los requisitos de diseño en el Cuadro
- 15.

25

CUADRO 15

Condiciones de examinación y métodos de detección del estudio de detección de escala de pH

Condiciones de examinación	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 4
40°C	X, Y	X	X	X
X: Apariencia, contenido de proteína (A_{280}), pH, SEC, CEX, DLS, y FlowCam				

Y: DSC, Tagg

4.2 Resultados del estudio

Las proteínas se almacenan en 10 mM del sistema de clorhidrato de histidina-acetato de sodio durante 4 semanas, y no hay diferencia significativa en las propiedades fisicoquímicas de las proteínas en los reguladores de pH en la escala de pH de 5.0-5.6 (Cuadro 16, Figuras 4A a 4E). Por lo tanto, la escala de pH de la formulación final es 5.0-5.6.

CUADRO 16

Resumen de datos del estudio de detección de la escala de pH

Elemento de detección	Tiempo de examinación	B1	B2	B3
		HA50	HA53	HA56
Concentración de la proteína (mg/mL)	Semana 0	25.0	25.2	25.5
	Semana 1	25.4	25.6	25.5
	Semana 2	25.8	25.9	25.8
	Semana 4	26.3	25.9	26.0
pH	Semana 0	5.0	5.4	5.6
	Semana 1	5.0	5.4	5.6
	Semana 2	5.0	5.4	5.6
	Semana 4	5.0	5.4	5.6

EJEMPLO 5

Detección del tipo de estabilizador

5.1 Protocolo del estudio

CUADRO 17

Información de la formulación del estudio de detección del tipo de estabilizador

No.	Tipo de regulador de pH	Fuerza iónica, mmol/L	pH	Estabilizador	Agente tensoactivo	Código
F1	Clorhidrato de histidina-acetato de sodio	10	5.3	100 mg/mL de sacarosa	0.2 mg/mL de Tween 80	Sacarosa
F2				100 mg/mL de trehalosa		Trehalosa
F3				50 mg/mL de manitol		Manitol
F4				50 mg/mL de sorbitol		Sorbitol
F5				25 mg/mL de glicina		Glicina

En este estudio, la proteína HLX04 (número de lote: AS201901-PT) se somete a

ultrafiltración e intercambio de medios, luego se agregan materiales auxiliares y la concentración de proteína se ajusta para preparar una formulación alternativa con una concentración de proteína final de aproximadamente 25.0 mg/mL (Cuadro 17). En un gabinete de bioseguridad, la muestra se filtra al utilizar un filtro estéril desechable de 0.22 μ m y luego 1 mL de la solución de proteína se subenvasa asépticamente en frascos de penicilina de 2 mL. Los frascos están tapados con tapones de goma de 13 mm y se utilizan tapas compuestas de aluminio y plástico de 13 mm para sellar los tapones. Las muestras sub-envasadas se examinan y se detectan de acuerdo con los requisitos de diseño en el Cuadro 18.

10

CUADRO 18

Condiciones de examinación y métodos de detección del estudio de detección del tipo de estabilizador

Condiciones de examinación	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 4
40°C	X, Y	X	X	X
-20°C a temperatura ambiente		5 rondas	10 rondas	
		X	X	
X: Apariencia, contenido de proteína (A ₂₈₀), pH, SEC, CEX, DLS, y FlowCam Y: DSC. Tagg. osmolalidad. viscosidad				

5.2 Resultados del estudio

15

En la semana 0, los estabilizadores se clasifican de superior a inferior de acuerdo con las temperaturas Tagg de las proteínas en las formulaciones que contienen varios estabilizadores como sacarosa>trehalosa>sorbitol≈manitol>glicina; y los estabilizadores se clasifican de superior a inferior de acuerdo con la $T_{m \text{ inicio}}$ como glicina>manitol≈sacarosa≈trehalosa≈sorbitol (Figura 5A).

20

Después de reposar a 40°C durante 4 semanas, los resultados de SEC muestran que los contenidos de los picos principales de las proteínas en las formulaciones que contienen varios estabilizadores todos muestran una tendencia a la baja, y las muestras que contienen glicina muestran una tendencia a la baja significativamente más rápida (Figura 5C). Los estabilizadores se clasifican de superior a inferior de acuerdo con los resultados de DLS como sorbitol≈manitol>glicina>sacarosa≈trehalosa (Figura 5B). Los resultados de CEX muestran que los contenidos de los picos principales de las proteínas en cada una de las formulaciones que contienen varios estabilizadores todos muestran una tendencia a la baja y las muestras que contienen glicina muestran una tendencia a la baja significativamente más rápida (Figura 5D). Los resultados de FlowCam muestran que los estabilizadores se clasifican de superior a inferior de acuerdo con las partículas sub-visibles como sorbitol≈sacarosa≈trehalosa≈manitol>glicina (Figura 5E).

30

Después de 10 rondas de ciclos repetidos de congelación y descongelación, los resultados de SEC muestran que no hay cambios en los contenidos de los picos principales de las

proteínas en las formulaciones que contienen sacarosa, trehalosa y sorbitol en comparación con los de la semana 0, y los contenidos de los picos principales en las formulaciones que contienen manitol o glicina muestran una tendencia a la baja significativamente más rápida (Figura 5G). Los estabilizadores se clasifican de superior a inferior de acuerdo con los resultados de DLS como sorbitol>sacarosa≈trehalosa>glicina≈manitol (Figure 5F). Los resultados de CEX muestran que no hay cambio en los contenidos de los picos principales de las proteínas en las formulaciones que contienen sacarosa, trehalosa, y sorbitol en comparación con los de la semana 0, y los contenidos de los picos principales en las formulaciones que contienen manitol y glicina muestran una tendencia a la baja significativamente más rápida (Figura 5H). Los resultados de FlowCam muestran que los estabilizadores se clasifican de superior a inferior de acuerdo con las partículas sub-visibles como sorbitol≈sacarosa≈trehalosa>manitol≈glicina (Figura 5I y Cuadro 19).

Los resultados de esta ronda de estudios muestran que bajo las condiciones de reposo a alta temperatura de 40°C y congelación y descongelación repetidas, en la formulación que contiene un estabilizador sacarosa o sorbitol en 10 mM de sistema regulador de pH de clorhidrato de histidina. acetato de sodio (pH 5.3), la proteína muestra mejor estabilidad.

CUADRO 19

Resumen de datos del estudio de detección del tipo de estabilizador

Condiciones de examinación	Elemento de detección	Tiempo de examinación	F1	F2	F3	F4	F5
			Sur	Tre	Man	Sor	Gly
40°C	Concentración de la proteína (mg/mL)	Semana 0	25.2	25.2	24.3	24.4	24.6
		Semana 1	25.6	25.2	24.5	24.6	24.6
		Semana 2	25.9	25.5	24.7	24.9	24.8
		Semana 4	25.9	25.6	25.0	25.3	25.0
	pH	Semana 0	5.4	5.3	5.3	5.3	5.4
		Semana 1	5.4	5.3	5.4	5.4	5.4
		Semana 2	5.4	5.4	5.4	5.3	5.5
		Semana 4	5.4	5.4	5.4	5.5	5.6
-20°C a temperatura ambiente	Concentración de la proteína (mg/mL)	Semana 0	25.2	25.2	24.3	24.4	24.6
		5 rondas	25.2	24.8	24.3	24.5	24.4
		10 rondas	25.5	25.1	24.7	24.5	24.5
	pH	Semana 0	5.4	5.3	5.3	5.3	5.4
		5 rondas	5.4	5.3	5.3	5.4	5.5
		10 rondas	5.3	5.3	5.3	5.3	5.4
Osmolalidad (mOsmol/kg)		Semana 0	372	345	336	321	363
Viscosidad (cP)		Semana 0	1.6	1.6	1.4	1.4	1.2

EJEMPLO 6Detección del estabilizador y agente tensoactivo

6.1 Protocolo del estudio

5 En esta ronda de estudio, tres factores, principalmente tipo de estabilizador, contenido del estabilizador y contenido de Tween 80, se seleccionan mediante el software JMP 15, se diseñan 10 grupos experimentales (Cuadro 20) mediante el método de superficie de respuesta de Box-Behnken, y se determinan las concentraciones del estabilizador y del agente tensoactivo mediante condiciones aceleradas como congelación y descongelación, agitación, iluminación y alta temperatura

10 (Cuadro 21).

CUADRO 20

Información de la formulación del estudio de detección del estabilizador y agente
tensoactivo

No.	Sistema regulador de pH	Tipo de estabilizador	Contenido del estabilizador, mg/mL	Contenido de Tween 80, mg/mL
F1	10 mM Clorhidrato de histidina- acetato de sodio pH 5.3	Sorbitol	0	0.1
F2			0	0.8
F3			40	0.45
F4			40	0.45
F5			80	0.1
F6			80	0.8
F7		Sacarosa	0	0.45
F8			40	0.1
F9			40	0.8
F10			80	0.45

15

En este estudio, la proteína HLX04 (número de lote: AS201901-PT) se somete a ultrafiltración e intercambio de medios, luego se agregan materiales auxiliares y la concentración de proteína se ajusta para preparar una formulación alternativa con una concentración de proteína final de aproximadamente 25.0 mg/mL (Cuadro 20). En un gabinete de bioseguridad, la muestra se filtra al utilizar un filtro estéril desechable de 0.22 µm y luego 1 mL de la solución de proteína se subenvasa asépticamente en frascos de penicilina de 2 mL. Los frascos están tapados con tapones de goma de 13 mm y se utilizan tapas compuestas de aluminio y plástico de 13 mm para sellar los tapones. Las muestras sub-ensadas se examinan y se detectan de acuerdo con los requisitos de diseño en el Cuadro 21.

20

CUADRO 21**Condiciones de examinación y métodos de detección del estudio de detección del estabilizador y agente tensoactivo**

Condiciones del estudio	Semana 0	1 ronda	5 rondas
-20°C a temperatura ambiente	X, Y, Z, W	X	X
Condiciones del estudio		Semana 2	Semana 4
25°C, 250 rpm		X	X, Y
Condiciones del estudio		Semana 2	Semana 4
40°C		X, Y	X, Y
Condiciones del estudio		5 días	10 días
4500 lx		X, Y	X, Y, Z
X: Apariencia, FlowCam, DLS Y: Contenido de proteína (A_{280}), SEC Z: CEX, CE W: pH, Tagg, osmolalidad, viscosidad			

5 6.2 Resultados del estudio

Los datos de detección se importan en el software JMP 15, y cada factor (variable dependiente) se somete a regresión lineal múltiple y ajuste de ecuaciones binomiales utilizando el método de mínimos cuadrados para obtener un modelo estadísticamente significativo (valor de $P < 0.1$) (Cuadro 22) con coeficientes de determinación corregidos (R^2) superiores a 0.95, lo que indica que el modelo y las condiciones reales están bien ajustadas, la ecuación tiene buena precisión y confiabilidad en términos de los valores de respuesta, y el modelo de regresión se puede usar en lugar de puntos de prueba reales para el análisis y la predicción de los resultados experimentales.

Al utilizar el software JMP 15, la formulación óptima se predice al utilizar un modelo de conveniencia maximizada de acuerdo con los resultados del análisis del Cuadro 22. Cuando el sorbitol se selecciona como el estabilizador, la conveniencia de la formulación es relativamente más alta; cuando el contenido de sorbitol es 4.5%, la conveniencia de la formulación es la más alta; y a medida que incrementa el contenido de polisorbato 80, la conveniencia de la formulación muestra una tendencia a la baja, y cuando el contenido de polisorbato 80 está en la escala de 0.01 %-0.03 %, la conveniencia de la formulación es relativamente más alta y el punto medio de 0.02 % está seleccionado (véase las Figuras 6A, 6B, y 6C).

De acuerdo con el sistema regulador de pH/estudio de detección de pH, estudio de detección de fuerza iónica, estudio de detección de tipo de agente tensoactivo, estudio de detección de tipo de estabilizador y estudio de detección del estabilizador y agente tensoactivo, la composición de la formulación final es la siguiente: 10 mM del sistema regulador de pH de clorhidrato de histidina-acetato de sodio (pH 5.3), con 45 mg/mL de sorbitol, y 0.2 mg/mL de Tween 80.

CUADRO 22

Resumen de datos del estudio de detección del estabilizador y agente tensoactivo

Condiciones de examinación	Respuesta	R ²	Valor P	Factores							
				Tipo de estabilizador	Contenido del estabilizador	Contenido de Tween 80	Tipo de estabilizador * contenido del estabilizador	Contenido del estabilizador * contenido del estabilizador	Tipo de estabilizador * contenido de Tween 80	Contenido del estabilizador * contenido de Tween 80	Contenido de Tween 80 * contenido de Tween 80
Semana 0	Osmolalidad	0.99	0.0083	0.0079	0.003	0.2597	0.0104	0.0998	0.2597	0.6082	0.289
	Viscosidad	0.99	0.1113	0.1875	0.0362	0.3275	0.6196	0.7332	0.1969	0.448	0.2508
	Tagg	0.99	0.033	0.1784	0.0169	0.0188	0.02	0.1027	0.0362	0.0321	0.1784
	Tamaño hidrodinámico promedio de las proteínas	0.99	0.1095	0.1462	0.0371	0.3498	0.1529	0.2785	0.1282	0.1114	0.4788
Estudio de congelación y descongelación	1 ronda-número de las partículas sub-visibles [#]	0.96	0.0369	0.051	0.0069	0.5427	0.057	0.1161		0.0613	
	5 rondas-número de las partículas sub-visibles	0.99	0.0583	0.1056	0.0258	0.2988	0.0743	0.0368	0.0825	0.2184	0.7177
Estudio de agitación	2 semanas-número de las partículas sub-visibles [#]	0.97	0.0201	0.9802	0.0126	0.8786		0.2381	0.0095	0.0112	
	4 semanas-número de las partículas sub-visibles [#]	0.98	0.0163	0.0497	0.0036	0.1329	0.241		0.0171	0.0342	
	4 semanas-contenido del pico principal de SEC	0.99	0.0493	0.0877	0.0202	0.0362	0.1692	0.1238	0.2143	0.0473	0.0877
	4 semanas-contenido del agregado de SEC	0.99	0.0496	0.0985	0.0211	0.0354	0.1103	0.1462	0.3498	0.0449	0.0846
Estudio de iluminación	5 días-contenido del pico principal	0.99	0.0658	0.1924	0.0269	0.1529	1	0.079	0.0519	0.0499	0.1924

Condiciones de examinación	Respuesta	R ²	Valor P	Factores							
				Tipo de estabilizador	Contenido del estabilizador	Contenido de Tween 80	Tipo de estabilizador * contenido del estabilizador	Contenido del estabilizador * contenido del estabilizador	Tipo de estabilizador * contenido de Tween 80	Contenido del estabilizador * contenido de Tween 80	Contenido de Tween 80 * contenido de Tween 80
ón	de SEC										
	5 días- contenido del agregado de SEC	0.99	0.068	0.2785	0.0273	0.1529	0.7532	0.0846	0.0556	0.0528	0.2279
	10 días- contenido del pico básico de CEX#	0.98	0.0619	0.0355	0.0726	0.4535	0.0332	0.2361	0.0332	0.0722	
40°C	4 semanas- contenido del pico principal de SEC	0.99	0.0724	0.1492	0.0406	0.0472	0.0911	0.0665	0.0987	0.0925	0.409
	4 semanas- contenido del agregado de SEC	0.99	0.0547	0.1177	0.026	0.041	0.0967	0.0495	0.0776	0.0894	0.1663
	4 semanas- contenido del fragmento de SEC	0.99	0.1347	0.2785	0.1892	0.0648	0.0967	0.1924	0.1892	0.0894	0.1924
Nota: Marcar con # significa resultados obtenidos después del análisis paso a paso											

EJEMPLO 7

Comparación de las formulaciones seleccionadas con otras formulaciones

7.1 Protocolo del estudio

CUADRO 23

Información de la formulación

No.	Sistema regulador de pH	pH	Tipo de estabilizador	Contenido del estabilizador, mg/mL	Sal	Tipo de agente tensoactivo	Contenido de agente tensoactivo, mg/mL	Código
F1	10 mM de clorhidrato de histidina-acetato de sodio	5.3	Sorbitol	45	-	Tween 80	0.2	HA53
F2	50 mM de dihidrógeno fosfato de sodio-hidrógeno fosfato disódico	6.2	Trehalosa	60	-	Tween 20	0.4	PB62
F3	10 mM de citrato-citrato de sodio	5.0	Sacarosa	20	100 mM de clorhidrato de arginina	Tween 20	0.5	C50

En este estudio, la proteína HLX04 (número de lote: AS201901-PT) se somete a ultrafiltración e intercambio de medios, luego se agregan materiales auxiliares y la concentración de proteína se ajusta para preparar una formulación alternativa con una concentración de proteína final de aproximadamente 25.0 mg/mL (Cuadro 23). En un gabinete de bioseguridad, la muestra se filtra al utilizar un filtro estéril desechable de 0.22 μ m y luego 1 mL de la solución de proteína se subenvasa asépticamente en frascos de penicilina de 2 mL. Los frascos están tapados con tapones de goma de 13 mm y se utilizan tapas compuestas de aluminio y plástico de 13 mm para sellar los tapones. Las muestras sub-ensadas se colocan a una temperatura constante y la cámara de humedad a 40°C para almacenamiento, y se muestrean y detectan de acuerdo con los requisitos de diseño en el Cuadro 24.

CUADRO 24

Condiciones de examinación y métodos de detección

Condiciones de examinación	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 4
40°C	X, Y, Z	X	X, Y	X, Y
X: Apariencia, contenido de proteína (A_{280}), pH, SEC, CEX, DLS, y FlowCam Y: DSC, Tagg, Tg'				

7.2 Resultados del estudio

En la semana 0, las proteínas en las 3 formulaciones son todas líquidos incoloros y ligeramente opalescentes sin partículas visibles obvias. Las formulaciones se clasifican de superior a inferior de acuerdo con las temperaturas de agregación Tagg como HA53>PB62>C50 (Figura 7A), y se clasifican de superior a inferior de acuerdo con los tamaños de partículas promedio de las proteínas como HA53>C50>PB62 (Figura 7B), lo que indica que la proteína tiene mejor estabilidad conformacional y coloidal en la formulación HA53.

Después de reposar a 40°C durante 4 semanas, la estabilidad de la proteína se puede mantener hasta un cierto grado en las 3 formulaciones, y no hay un cambio significativo en las detecciones fisicoquímicas básicas de las proteínas (Cuadro 25). Los resultados de SEC muestran que los contenidos de los picos principales de las proteínas en cada formulación todos muestran una tendencia a la baja (figura 7C) y las formulaciones se clasifican de superior a inferior como HA53>C50>PB62. Los resultados de CEX muestran que los contenidos de los picos principales de las proteínas en cada formulación todos muestran una tendencia a la baja (Figura 7D), y los sistemas reguladores de pH son clasificados de superior a inferior como HA53>C50>PB62. Los sistemas reguladores de pH se clasifican de superior a inferior de acuerdo con las partículas sub-visibles FlowCam como HA53>PB62>C50 (Figura 7E).

CUADRO 25**Resumen de datos del estudio comparativo de varias formulaciones**

Elemento de detección	Tiempo de examinación	F1	F2	F3
		HA53	PB62	C50
Concentración de la proteína (mg/mL)	Semana 0	25.2	24.8	24.3
	Semana 1	25.6	25.2	24.5
	Semana 2	25.9	25.2	24.4
	Semana 4	25.9	25.2	24.6
pH	Semana 0	5.4	6.2	5.0
	Semana 1	5.4	6.1	5.1
	Semana 2	5.4	6.2	5.0
	Semana 4	5.4	6.2	5.1

- De acuerdo con los resultados con respecto a los isómeros moleculares, los isómeros de carga y las partículas subvisibles en las pruebas de aceleración a alta temperatura, la estabilidad de bevacizumab en la formulación de la presente solicitud es significativamente mejor que la de bevacizumab en la formulación existente (PB62) y otras formulaciones similares.

EJEMPLO 8**Comparación de la estabilidad a diferentes concentraciones de proteína****8.1 Protocolo del estudio****CUADRO 26****Información de la formulación**

No.	Sistema regulador de pH	pH	Tipo de estabilizador	Contenido del estabilizador, mg/mL	Tipo de agente tensoactivo	Contenido de agente tensoactivo, mg/mL	Código
F1	10 mM de clorhidrato de histidina-acetato de sodio	5.3	Sorbitol	45	Tween 80	0.2	10
F2							25
F3							50
F4							80
F5	50 mM de dihidrógeno fosfato de sodio-hidrógeno fosfato disódico	6.2	Trehalosa	60	Tween 20	0.4	Avastin

- Después del estudio de detección de la formulación, se determina que la formulación de la formulación HLX04 es la siguiente: 10 mM de clorhidrato de histidina-acetato de sodio, 45 mg/mL de sorbitol, y 0.2 mg/mL de Tween 80, pH 5.3. En esta ronda de estudio, bajo la condición de aceleración de la alta temperatura de 40°C, las diferencias de estabilidad entre las muestras de la

formulación HLX04 en la escala de concentración de 10-80 mg/mL y Avastin® se comparan. La proteína HLX04 PT (número de lote: AS201901-PT) se somete a ultrafiltración e intercambio de medios, luego se agregan materiales auxiliares y la concentración de proteína se ajusta para preparar varias formulaciones alternativas (Cuadro 26). En un gabinete de bioseguridad, la muestra se filtra al utilizar un filtro estéril desechable de 0.22 µm y luego 0.5 mL de la solución de proteína se subenvasa asépticamente en frascos de penicilina de 2 mL. Los frascos están tapados con tapones de goma de 13 mm y se utilizan tapas compuestas de aluminio y plástico de 13 mm para sellar los tapones. Las muestras sub-ensadas y fármaco original (número de lote: H0154B14, código: Avastin) se colocan a una temperatura constante y la cámara de humedad a 40°C para almacenamiento, y se muestrean y detectan de acuerdo con los requisitos de diseño en el Cuadro 27.

CUADRO 27

Condiciones de examinación y métodos de detección

Condiciones de examinación	Semana 0	Semana 2	Semana 4
40°C	X	X	X
X: Apariencia, contenido de proteína (A_{280}), pH, SEC, CEX y CE			

8.2 Resultados del estudio

En esta ronda de estudio, por medio de las pruebas de aceleración a alta temperatura (40°C), las diferencias de estabilidad entre las muestras de la formulación HLX04 en la escala de concentración de 10-80 mg/mL y Avastin® se comparan. Los resultados del estudio (Cuadro 28) muestran que en la semana 0, los contenidos de agregados de las muestras de la formulación HLX04 en la escala de concentración de 10-80 mg/mL son 2.0%-2.7%, que son menores que el contenido de agregado (3.6%) de Avastin. Después de reposar a 40°C durante 4 semanas, la velocidad de agregación (Figura 8A), la velocidad de degradación (Figuras 8B y 8C) y la tendencia de cambio de los isómeros de carga (Figura 8D) de las muestras de la formulación HLX04 en la escala de concentración de 10-80 mg/mL son significativamente más lentas que las de Avastin.

En resumen, en comparación con el fármaco original Avastin (60 mg/mL), la formulación HLX04 en la escala de concentración de 10-80 mg/mL tiene mejor estabilidad.

CUADRO 28

Resumen de datos de la comparación de la estabilidad en diferentes concentraciones de proteína

Elemento de detección		Tiempo de examinación	Código				
			10	25	50	80	Avastin
SEC	% de pico principal	Semana 0	97.9	97.7	97.5	97.2	96.2
		Semana 2	98.4	98.1	97.3	96.3	94.3
		Semana 4	96.2	95.9	94.8	93.3	90.1
	% de agregado	Semana 0	2.0	2.2	2.4	2.7	3.6
		Semana 2	1.2	1.5	2.3	3.3	5.2
		Semana 4	1.3	1.6	2.8	4.3	7.0
	% de fragmento	Semana 0	0.1	0.1	0.1	0.1	0.2
		Semana 2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.5
		Semana 4	2.6	2.5	2.4	2.3	2.8
CEX	% de pico principal	Semana 0	61.2	60.9	61.2	60.9	63.9
		Semana 2	49.9	50.2	49.9	49.7	47.6
		Semana 4	41.1	41.7	41.2	40.8	36.0
	% de pico ácido	Semana 0	30.6	30.8	30.7	30.6	27.3
		Semana 2	41.3	41.2	40.9	40.5	42.1
		Semana 4	49.9	49.5	49.2	48.6	52.1
	% de pico básico	Semana 0	8.2	8.2	8.2	8.5	8.8
		Semana 2	8.7	8.7	9.2	9.8	10.4
		Semana 4	9.0	8.8	9.5	10.6	11.9
CE-SDS	% de IgG	Semana 0	95.7	95.6	95.5	95.6	96.0
		Semana 2	94.6	94.5	94.3	94.5	95.4
		Semana 4	87	86.9	86.8	86.2	83.5

NOVEDAD DE LA INVENCION

REIVINDICACIONES

- 5 1.- Una formulación farmacéutica que comprende bevacizumab, en donde la formulación farmacéutica comprende: bevacizumab, un regulador de pH, un estabilizador, y un agente tensoactivo, en donde el regulador de pH se selecciona de uno o más de un sistema de histidina-clorhidrato de histidina, un sistema de ácido acético-acetato de sodio y un sistema de clorhidrato de histidina-acetato de sodio; el estabilizador se selecciona de uno o más de sacarosa, trehalosa y sorbitol;
- 10 y el agente tensoactivo es Tween 80 o Tween 20.
- 2.- La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque el regulador de pH es un regulador de pH de clorhidrato de histidina-acetato de sodio a una concentración de 10-30 mM.
- 3.- La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 2, caracterizada
- 15 además porque el regulador de pH es un regulador de pH de clorhidrato de histidina-acetato de sodio a una concentración de 10 mM.
- 4.- La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque el estabilizador es sorbitol o sacarosa con un contenido de 20-100 mg/mL.
- 5.- La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada
- 20 además porque el agente tensoactivo es Tween 80 con un contenido de 0.1 mg/mL-0.5 mg/mL.
- 6.- La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque el pH de la formulación farmacéutica es 5.0-5.6.
- 7.- La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque la concentración de proteína de bevacizumab es 10-100 mg/mL, preferiblemente 10-
- 25 80 mg/mL, o la concentración de proteína de bevacizumab es 10-50 mg/mL.
- 8.- La formulación farmacéutica de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, caracterizada además porque la formulación contiene: 10 mM de regulador de pH de clorhidrato de histidina-acetato de sodio, 45 mg/mL de sorbitol, y 0.2 mg/mL de Tween 80, con un pH de 5.3.
- 9.- La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 8, caracterizada
- 30 además porque la formulación contiene 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL o 80 mg/mL de bevacizumab.
- 10.- La formulación farmacéutica de conformidad con la reivindicación 1, caracterizada además porque la formulación es una formulación líquida o formulación liofilizada para inyección.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se proporciona una formulación farmacéutica que comprende 10-80 mg/ml de bevacizumab; el sistema regulador de pH de la formulación farmacéutica es preferiblemente 10-30 mM de regulador de pH de clorhidrato de histidina-acetato de sodio, en donde 25-50 mg/mL de sacarosa o sorbitol se utiliza como un estabilizador, y Tween 80 se utiliza como un agente tensoactivo y el sistema tiene un pH de 5.0-5.6; la formulación se prueba bajo condiciones repetidas de congelación y descongelación y aceleración de alta temperatura de 40°C; la estabilidad de la proteína es buena y es mejor que otras formulaciones similares.