

**FORMULACIONES DE ANTICUERPOS ANTI PROTOFIBRILLAS A β DE ALTA
CONCENTRACIÓN Y MÉTODOS DE USO DE LAS MISMAS**

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 62/992,746, presentada el 20 de marzo de 2020, y la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 63/027,263, presentada el 19 de mayo de 2020; cuyo contenido se incorpora en el presente documento por referencia en su totalidad.

[0002] La enfermedad de Alzheimer (EA) es un trastorno neurodegenerativo progresivo de etiología desconocida y la forma más común de demencia entre las personas mayores. En 2006, hubo 26.6 millones de casos de EA en el mundo (intervalo: 11.4-59.4 millones) (Brookmeyer, R., *et al.*, Forecasting the global burden of Alzheimer's Disease. *Alzheimer Dement.* 2007; 3:186-91), mientras que más de 5 millones de personas en los Estados Unidos supuestamente vivían con EA (2010 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer Dement.* 2010;6:158-94). Para el año 2050, se prevé que la prevalencia mundial de la EA aumente a 106.8 millones (intervalo: 47.2 - 221.2 millones), mientras que solo en los Estados Unidos se estima que la prevalencia sea de 11 a 16 millones. (Brookmeyer, anteriormente, y 2010 Alzheimer's disease facts and figures, anteriormente).

[0003] La enfermedad generalmente implica un deterioro global de la función cognitiva que avanza lentamente y deja a los sujetos en estadio terminal postrados en cama. Los sujetos con EA típicamente sobreviven solo de 3 a 10 años después del inicio de los síntomas, aunque se conocen extremos de 2 y 20 años. (Hebert, L.E., *et al.*, Alzheimer disease in the U.S. population: prevalence

estimates using the 2000 census. *Arch Neurol.* 2003; 60:1119-1122). La EA es la séptima causa principal de todas las muertes en los Estados Unidos y la quinta causa principal de muerte en estadounidenses mayores de 65 años, a pesar del hecho de que la mortalidad debida a la EA está muy subestimada porque los certificados de defunción rara vez atribuyen la causa de la muerte a la EA. (2010 Alzheimer's disease facts and figures, anteriormente).

[0004] Histológicamente, la enfermedad se caracteriza por placas neuríticas, que se encuentran principalmente en la corteza de asociación, el sistema límbico y los ganglios basales. El componente principal de estas placas es el péptido beta amiloide (A β). A β existe en diversos estados conformacionales: monómeros, oligómeros, protofibrillas y fibrillas insolubles. Se desconocen los detalles de la relación mecánica entre el inicio de la enfermedad de Alzheimer y la producción de A β . Sin embargo, algunos anticuerpos anti A β se encuentran actualmente en estudio clínico como posibles agentes terapéuticos para la enfermedad de Alzheimer.

[0005] Los anticuerpos anti A β y otras proteínas pueden administrarse a sujetos por vía intravenosa, subcutánea, intramuscular y otros medios. La posología y/o la forma farmacéutica de un anticuerpo pueden presentar muchos desafíos para el desarrollo de una formulación farmacéutica adecuada. Por ejemplo, a altas concentraciones de anticuerpos, la estabilidad del anticuerpo puede ser problemática debido a la formación de agregados o fragmentación entre proteínas. Generalmente, la agregación aumenta con el aumento de las concentraciones de anticuerpos.

Además, las formulaciones de anticuerpos de alta concentración requieren altas concentraciones de estabilizadores y otros excipientes para lograr la estabilidad y semivida de la proteína a largo plazo. Las formulaciones de anticuerpos de alta concentración también suelen ser viscosas, lo que complica potencialmente la fabricación y la administración de la formulación farmacéutica.

[0006] En el presente documento se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a la protofibrilla A β . En el presente documento también se proporcionan formulaciones farmacéuticas que comprenden 80-300 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a la protofibrilla A β , en donde el anticuerpo es BAN2401 (también conocido como lecanemab). Se ha encontrado que las formulaciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento son ventajosas. Por ejemplo, a pesar de las altas concentraciones de anticuerpo anti protofibrillas A β (por ejemplo, 100 mg/ml o 200 mg/ml), la tasa de agregación entre proteínas es inesperadamente baja y comparable a las tasas de agregación que típicamente se observan con concentraciones de anticuerpos mucho más bajas (por ejemplo, 10 mg/ml). En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas desveladas actualmente exhiben una tasa inicial más baja de agregados que las formulaciones que tienen concentraciones significativamente más bajas de anticuerpo anti protofibrillas A β (por ejemplo, ~0.3 % del nivel inicial de

agregados para 100 mg/ml de anticuerpo anti protofibrillas A β frente a ~0.8 % del nivel inicial de agregados para 10 mg/ml de anticuerpo anti protofibrillas A β). En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas desveladas actualmente exhiben una menor tasa de generación de partículas subvisibles que las formulaciones que tienen concentraciones significativamente más bajas de anticuerpo anti protofibrillas A β (por ejemplo, 10.6 partículas/ml para 100 mg/ml de anticuerpo anti protofibrillas A β frente a 12.6 partículas/ml para 10 mg/ml de anticuerpo anti protofibrillas A β). En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas desveladas actualmente exhiben una tasa de agregación reducida, un nivel de agregación inicial reducido, una tasa de fragmentación de proteínas reducida y/o una reducción en la formación de partículas subvisibles en comparación con las formulaciones que tienen concentraciones significativamente más bajas de anticuerpo anti protofibrillas A β . La tasa de agregación baja, el nivel de agregación inicial, la tasa de fragmentación de proteínas y/o la generación de partículas subvisibles pueden permitir una mayor estabilidad y/o una semivida más prolongada del producto. Además, los excipientes en las formulaciones farmacéuticas desveladas actualmente pueden estar presentes en cantidades más bajas que en los productos intravenosos comercializados actualmente. En algunas realizaciones, el pH y la osmolalidad de las formulaciones farmacéuticas desveladas actualmente son aceptables para la administración intravenosa después de la dilución en fluidos intravenosos.

[0007] En algunas realizaciones, el al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β comprende (i) un dominio

variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

5 **[0008]** En algunas realizaciones, el al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (HCDR1), SEQ ID NO: 6 (HCDR2) y SEQ ID NO: 7 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (LCDR1), SEQ ID NO: 9 (LCDR2) y SEQ ID NO: 10 (LCDR3).

15 **[0009]** La asignación de aminoácidos a cada dominio es, generalmente, de acuerdo con las definiciones de SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST (Kabat et al., 5^a ed., U.S. Department of Health and Human Services, Publicación del NIH N.º 91- 3242, 1991, en lo sucesivo denominado "informe Kabat").

20 **[0010]** En algunas realizaciones, el al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β comprende una región constante humana. En algunas realizaciones, la región constante humana del al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β comprende una región constante de cadena pesada elegida entre IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA, IgE, y cualquier variación alélica de las mismas como se desvela en el informe Kabat. En la presente divulgación se puede usar una cualquiera o más de dichas secuencias. En algunas realizaciones, la región constante de cadena pesada se elige entre IgG1 y variaciones alélicas de la misma. La secuencia

25

30

de aminoácidos de la región constante de IgG1 humana se conoce en la técnica y se expone en la SEQ ID NO: 3.

5 **[0011]** En algunas realizaciones, la región constante humana del al menos un anticuerpo anti A β comprende una región constante de cadena ligera elegida entre las regiones constantes de la cadena κ - λ y cualquier variación alélica de la misma como se analiza en el informe Kabat. En la presente divulgación se puede usar una cualquiera o más de dichas secuencias. En algunas realizaciones, la región constante de
10 cadena ligera se elige entre κ y variaciones alélicas de la misma. La secuencia de aminoácidos de la región constante de cadena κ humana se conoce en la técnica y se expone en la SEQ ID NO: 4.

15 **[0012]** En algunas realizaciones, el al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β comprende marcos de la región variable de cadena pesada y ligera humanas. En algunas realizaciones, el al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β comprende una región variable de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, y
20 una región variable de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2. En algunas realizaciones, el al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana, y una región constante de cadena ligera de Ig kappa
25 humana. En algunas realizaciones, el al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β comprende una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3, y una región constante de cadena ligera que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

30

[0016] En algunas realizaciones, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado está presente en una concentración de al menos 80 mg/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado está presente en una
5 concentración de al menos 100 mg/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado está presente en una concentración de al menos 200 mg/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado está presente en una concentración de al menos
10 250 mg/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento del mismo está presente en una concentración que varía de 80 mg/ml a 300 mg/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado está presente en una concentración que varía de 85 mg/ml a 275 mg/ml. En
15 algunas realizaciones, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado está presente en una concentración que varía de 90 mg/ml a 250 mg/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado está presente en una concentración que varía de 95 mg/ml a 225 mg/ml. En
20 algunas realizaciones, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado está presente en una concentración que varía de 100 mg/ml a 200 mg/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento del mismo está presente en una concentración de 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml,
25 110 mg/ml, 120 mg/ml, 130 mg/ml, 140 mg/ml, 150 mg/ml, 160 mg/ml, 170 mg/ml, 180 mg/ml, 190 mg/ml, 200 mg/ml, 210 mg/ml, 220 mg/ml, 230 mg/ml, 240 mg/ml, 250 mg/ml, 260 mg/ml, 270 mg/ml, 280 mg/ml, 290 mg/ml o 300 mg/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento del
30 mismo está presente en una concentración de 100 mg/ml. En

algunas realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento del mismo está presente en una concentración de 200 mg/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento del mismo está presente en una concentración de 250 mg/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento del mismo está presente en una concentración de 300 mg/ml. En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento del mismo es BAN2401. En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento del mismo comprende (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2. En algunas realizaciones, el anticuerpo aislado o fragmento del mismo comprende tres regiones determinantes de complementariedad de cadena pesada (HCDR1, HCDR2 y HCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 5 (HCDR1), SEQ ID NO: 6 (HCDR2) y SEQ ID NO: 7 (HCDR3); y tres regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) que comprenden las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 8 (LCDR1), SEQ ID NO: 9 (LCDR2) y SEQ ID NO: 10 (LCDR3).

[0017] En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a la protofibrilla A β comprende además al menos un componente adicional. En algunas realizaciones, el al menos un componente adicional en la formulación farmacéutica se elige entre tampones. En algunas realizaciones, el tampón es un tampón de citrato. En algunas realizaciones, el tampón es un tampón de histidina.

En algunas realizaciones, el al menos un componente adicional en la formulación farmacéutica se elige entre emulsionantes. En algunas realizaciones, el al menos un componente adicional en la formulación farmacéutica se elige entre ácido cítrico (o ácido cítrico monohidrato), cloruro de sodio, histidina (y/o clorhidrato de histidina), arginina (y/o clorhidrato de arginina) y polisorbato 80. En algunas realizaciones, el al menos un componente adicional en la formulación farmacéutica se elige entre ácido cítrico (y/o ácido cítrico monohidrato), arginina (y/o clorhidrato de arginina) y polisorbato 80. En algunas realizaciones, el al menos un componente adicional en la formulación farmacéutica se elige entre histidina (y/o clorhidrato de histidina), arginina (y/o clorhidrato de arginina) y polisorbato 80.

15 **[0018]** En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende arginina (y/o clorhidrato de arginina). En algunas realizaciones, la concentración de arginina (y/o clorhidrato de arginina) en la formulación farmacéutica varía de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM. En algunas realizaciones, la concentración de arginina (y/o clorhidrato de arginina) en la formulación farmacéutica varía de aproximadamente 110 mM a aproximadamente 380 mM. En algunas realizaciones, la concentración de arginina (y/o clorhidrato de arginina) en la formulación farmacéutica varía de aproximadamente 120 mM a aproximadamente 360 mM. En algunas realizaciones, la concentración de arginina (y/o clorhidrato de arginina) en la formulación farmacéutica varía de aproximadamente 125 mM a aproximadamente 350 mM. En algunas realizaciones, la concentración de arginina (y/o clorhidrato de arginina) en

la formulación farmacéutica es de 125 mM. En algunas realizaciones, la concentración de arginina (y/o clorhidrato de arginina) en la formulación farmacéutica es de 200 mM. En algunas realizaciones, la concentración de arginina (y/o clorhidrato de arginina) en la formulación farmacéutica es de 350 mM.

[0019] En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende histidina. En algunas realizaciones, la concentración de histidina en la formulación farmacéutica varía de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM. En algunas realizaciones, la concentración de histidina en la formulación farmacéutica varía de 10 mM a 100 mM, de 12 mM a 80 mM, de 14 mM a 60 mM, de 15 mM a 55 mM, de 15 mM a 35 mM o de 15 mM a 25 mM. En algunas realizaciones, la concentración de histidina es de 25 mM. En algunas realizaciones, la concentración de histidina es de 50 mM.

[0020] En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende polisorbato 80. En algunas realizaciones, la concentración de polisorbato 80 en la formulación farmacéutica varía de aproximadamente el 0.01 al 0.1 % p/v, del 0.01 al 0.08 % p/v, del 0.02 al 0.08 % p/v, del 0.03 al 0.07 % p/v o del 0.04 al 0.06 % p/v. En algunas realizaciones, el polisorbato 80 está presente en la formulación farmacéutica en una concentración del 0.01 % p/v, 0.02 % p/v, 0.03 % p/v, 0.04 % p/v, 0.05 % p/v, 0.06 % p/v, 0.07 % p/v o del 0.08 % p/v. En algunas realizaciones, el polisorbato 80 está presente en la formulación farmacéutica en una concentración del 0.02 % p/v. En algunas realizaciones, el polisorbato 80 está presente en la

formulación farmacéutica en una concentración del 0.05 % p/v.

5 **[0021]** En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende ácido cítrico monohidrato. En algunas realizaciones, la concentración de ácido cítrico monohidrato en la formulación farmacéutica varía de aproximadamente 10 mM a 100 mM. En algunas realizaciones, la concentración de ácido cítrico monohidrato en la formulación farmacéutica varía de 10 mM a 100 mM, de 10 mM a 90 mM, de 15 mM a 85 mM, 10 de 20 mM a 80 mM, de 25 mM a 75 mM, de 30 mM a 70 mM, de 30 mM a 60 mM o de 30 mM a 50 mM. En algunas realizaciones, la concentración de ácido cítrico monohidrato en la formulación farmacéutica es de 50 mM.

15 **[0022]** En algunas realizaciones, la divulgación proporciona una formulación farmacéutica que tiene un pH en el intervalo de 4.5 a 5.5. En algunas realizaciones, el pH en la formulación farmacéutica se encuentra en el intervalo de 4.0 a 6.0, 4.2 a 5.8, 4.3 a 5.7, 4.4 a 5.6 o 4.5 a 5.5. En algunas realizaciones, el pH es 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 20 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 o 5.5. En algunas realizaciones, el pH es 5.0.

[0023] En algunas realizaciones, las formulaciones farmacéuticas desveladas en el presente documento pueden estar en forma de una solución y/o cualquier otra formulación 25 líquida adecuada que un experto en la materia considere apropiada. La vía de administración de las composiciones de la presente divulgación puede ser intravenosa o subcutánea. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica se formula como un líquido apirógeno estéril para 30 administración intravenosa. En algunas realizaciones, la

formulación farmacéutica se formula como un líquido apirógeno estéril para administración subcutánea. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica es una solución salina.

5 **[0024]** En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica es una forma farmacéutica líquida que comprende al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a la protofibrilla A β , tal como BAN2401, y que comprende además, por ejemplo, ácido
10 cítrico monohidrato, arginina, clorhidrato de arginina y polisorbato 80. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende 100 mg/ml de al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se
15 une a la protofibrilla A β , tal como BAN2401, ácido cítrico monohidrato 50 mM, arginina 110 mM, clorhidrato de arginina 240 mM y polisorbato 80 al 0.05 % (p/v), y tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.4.

[0025] En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica es una forma farmacéutica líquida que comprende
20 al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a la protofibrilla A β , tal como BAN2401, y que comprende además, por ejemplo, histidina, clorhidrato de histidina, clorhidrato de arginina y
25 polisorbato 80. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende 100 mg/ml o 200 mg/ml de al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a la protofibrilla A β , tal como BAN2401,
30 25 mM de histidina y clorhidrato de histidina, clorhidrato de arginina 200 mM y polisorbato 80 al 0.05 % (p/v), y tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.4.

[0026] En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica es una forma farmacéutica líquida que comprende al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a la protofibrilla A β , tal como BAN2401, y que comprende además, por ejemplo, histidina, clorhidrato de histidina, clorhidrato de arginina y polisorbato 80. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende 200 mg/ml de al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a la protofibrilla A β , tal como BAN2401, histidina 50 mM y clorhidrato de histidina, clorhidrato de arginina 125 mM y polisorbato 80 al 0.02 % (p/v), y tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.4.

[0027] En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica es una forma farmacéutica líquida que comprende al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a la protofibrilla A β , tal como BAN2401, y que comprende además, por ejemplo, histidina, clorhidrato de histidina, clorhidrato de arginina y polisorbato 80. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende 200 mg/ml de al menos un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a la protofibrilla A β , tal como BAN2401, ácido cítrico 50 mM (y/o ácido cítrico monohidrato), arginina 125 mM (y/o clorhidrato de arginina) y polisorbato 80 al 0.02 % (p/v), y tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.4.

[0028] BAN2401 y los métodos que comprenden el uso de BAN2401 se desvelan en la Solicitud Provisional de EE.UU. N.º 62/749,614 y la Solicitud Internacional PCT N.º PCT/US2019/043067, ambas de las cuales se incorporan en

el presente documento por referencia en su totalidad.

Breve descripción de los dibujos

5 [0029] La figura 1 representa el porcentaje de agregación en formulaciones de BAN2401 a razón de 10 mg/ml, 100 mg/ml y 200 mg/ml en los puntos temporales 0, 1, 2 y 3 meses a 5 °C.

10 [0030] La figura 2 representa el porcentaje de fragmentación en formulaciones de BAN2401 a razón de 10 mg/ml, 100 mg/ml y 200 mg/ml en los puntos temporales 0, 1, 2 y 3 meses a 5 °C.

15 [0031] La figura 3 representa el porcentaje de monómeros en formulaciones de BAN2401 a razón de 10 mg/ml, 100 mg/ml y 200 mg/ml en los puntos temporales 0, 1, 2 y 3 meses a 5 °C.

20 [0032] La figura 4 representa el porcentaje de agregación en formulaciones de BAN2401 a razón de 10 mg/ml, 100 mg/ml y 200 mg/ml en los puntos temporales 0, 1, 2 y 3 meses a 25 °C.

25 [0033] La figura 5 representa el porcentaje de fragmentación en formulaciones de BAN2401 a razón de 10 mg/ml, 100 mg/ml y 200 mg/ml en los puntos temporales 0, 1, 2 y 3 meses a 25 °C.

30 [0034] La figura 6 representa el porcentaje de monómeros en formulaciones de BAN2401 a razón de 10 mg/ml, 100 mg/ml y 200 mg/ml en los puntos temporales 0, 1, 2 y 3 meses a 25 °C.

 [0035] La figura 7 representa el porcentaje de agregación en formulaciones de BAN2401 a valores de pH de 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5 en los puntos temporales 0, 1, 2 y 3 meses a 5 °C.

[0036] La figura 8 representa el porcentaje de fragmentación en formulaciones de BAN2401 a valores de pH de 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5 en los puntos temporales 0, 1, 2 y 3 meses a 5 °C.

5 [0037] La figura 9 representa el porcentaje de monómeros en formulaciones de BAN2401 a valores de pH de 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5 en los puntos temporales 0, 1, 2 y 3 meses a 5 °C.

10 [0038] La figura 10 representa el porcentaje de agregación en formulaciones de BAN2401 a valores de pH de 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5 en los puntos temporales 0, 1, 2 y 3 meses a 25 °C.

15 [0039] La figura 11 representa el porcentaje de fragmentación en formulaciones de BAN2401 a valores de pH de 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5 en los puntos temporales 0, 1, 2 y 3 meses a 25 °C.

20 [0040] La figura 12 representa el porcentaje de monómeros en formulaciones de BAN2401 a valores de pH de 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5 en los puntos temporales 0, 1, 2 y 3 meses a 25 °C.

[0041] La figura 13 representa el porcentaje de agregación en formulaciones de BAN2401 a razón de 10 mg/ml, 100 mg/ml y 200 mg/ml en los puntos temporales 0, 1 y 2 meses a 25 °C.

25 [0042] La figura 14 representa el porcentaje de fragmentación en formulaciones de BAN2401 a razón de 10 mg/ml, 100 mg/ml y 200 mg/ml en los puntos temporales 0, 1 y 2 meses a 25 °C.

30 [0043] La figura 15 representa el porcentaje de monómeros en formulaciones de BAN2401 a razón de 10 mg/ml,

100 mg/ml y 200 mg/ml en los puntos temporales 0, 1 y 2 meses a 25 °C.

5 **[0044]** La figura 16 representa el porcentaje de agregación de monómeros en formulaciones de BAN2401 en función de la concentración de arginina.

[0045] La figura 17 representa un diagrama de flujo para el proceso de fabricación de una inyección de 10 mg/ml de BAN2401.

10 **[0046]** La figura 18 representa un diagrama de flujo para el proceso de fabricación de una inyección de 100 mg/ml de BAN2401.

[0047] La figura 19 representa los valores de pH de formulaciones de BAN2401 a valores de pH en los puntos temporales 0 y 12 meses a 5 °C.

15 **[0048]** La figura 20 representa los valores de pH de formulaciones de BAN2401 a valores de pH en los puntos temporales 0, 1 y 3 meses a 25 °C.

20 **[0049]** La figura 21 representa los valores de pH de formulaciones de BAN2401 a valores de pH después de un mes a 5 °C y con agitación a 25 °C.

[0050] La figura 22 representa la absorbancia a 405 nm de formulaciones de BAN2401 en los puntos temporales 0, 1, 3, 6, 9 y 12 meses a 5 °C.

25 **[0051]** La figura 23 representa la absorbancia a 405 nm de formulaciones de BAN2401 en los puntos temporales 0, 1 y 3 meses a 25 °C.

[0052] La figura 24 representa la absorbancia a 405 nm de formulaciones de BAN2401 en un mes a 5 °C y con agitación a 25 °C.

[0053] La figura 25 representa el porcentaje de agregación en formulaciones de BAN2401 en los puntos temporales 0, 1, 3, 6, 9 y 12 meses a 5 °C.

5 [0054] La figura 26 representa el porcentaje de fragmentación en formulaciones de BAN2401 en los puntos temporales 0, 1, 3, 6, 9 y 12 meses a 5 °C.

[0055] La figura 27 representa el porcentaje de monómeros en formulaciones de BAN2401 en los puntos temporales 0, 1, 3, 6, 9 y 12 meses a 5 °C.

10 [0056] La figura 28 representa el porcentaje de agregación en formulaciones de BAN2401 en los puntos temporales 0, 1 y 3 meses a 25 °C.

15 [0057] La figura 29 representa el porcentaje de fragmentación en formulaciones de BAN2401 en los puntos temporales 0, 1 y 3 meses a 25 °C.

[0058] La figura 30 representa el porcentaje de monómeros en formulaciones de BAN2401 en los puntos temporales 0, 1 y 3 meses a 25 °C.

20 [0059] La figura 31 representa el porcentaje de agregación en formulaciones de BAN2401 en un mes a 5 °C y con agitación a 25 °C.

[0060] La figura 32 representa el porcentaje de fragmentación en formulaciones de BAN2401 en un mes a 5 °C y con agitación a 25 °C.

25 [0061] La figura 33 representa el porcentaje de monómeros en formulaciones de BAN2401 en un mes a 5 °C y con agitación a 25 °C.

Definiciones

30 [0062] Las siguientes son definiciones de términos usados en la presente solicitud.

[0063] Como se usa en el presente documento, los términos en singular "un", "una", y "el/la" incluyen la referencia en plural a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

5 [0064] Como se usa en el presente documento, la expresión "y/o" significa "uno o ambos" de los elementos así unidos, es decir, elementos que están presentes conjuntivamente en algunos casos y presentes disyuntivamente en otros casos. Por lo tanto, como ejemplo no limitante, "A
10 y/o B", cuando se usa junto con un lenguaje abierto tal como "que comprende", puede referirse, en algunas realizaciones, a A solamente (opcionalmente incluyendo elementos distintos de B); en otras realizaciones, a B solamente (opcionalmente incluyendo elementos distintos de A); en aún otras
15 realizaciones, tanto a A como a B (incluyendo opcionalmente otros elementos); etc.

[0065] Como se usa en el presente documento, "al menos uno/a" significa uno o más de los elementos en la lista de elementos, pero sin incluir necesariamente al menos uno
20 de todos y cada uno de los elementos específicamente enumerados dentro de la lista de elementos y sin excluir ninguna combinación de elementos en la lista de elementos. Esta definición también permite que los elementos puedan estar presentes opcionalmente distintos de los elementos
25 específicamente identificados dentro de la lista de elementos a los que se refiere la expresión "al menos uno/a", ya estén relacionados o no con los elementos identificados específicamente. Por lo tanto, como ejemplo no limitativo, "al menos uno de A y B" (o, de manera equivalente, "al menos
30 uno de A o B", o, de manera equivalente, "al menos uno de A

y/o B") puede referirse, en una realización, al menos a un, opcionalmente incluyendo más de un, A, sin B presente (y opcionalmente incluyendo elementos distintos de B); en otra realización, al menos a un, opcionalmente incluyendo más de un, B, sin A presente (y opcionalmente incluyendo elementos distintos de A); en aún otra realización, al menos a un, opcionalmente incluyendo más de un, A, y al menos a un, opcionalmente incluyendo más de un, B (y opcionalmente incluyendo otros elementos); etc.

10 **[0066]** Cuando se menciona un número, ya sea en solitario o como parte de un intervalo numérico, debe entenderse que el valor numérico puede variar por encima y por debajo del valor establecido en una varianza que sea razonable para el valor descrito, como se reconoce por un
15 experto en la materia.

[0067] Como se usa en el presente documento, un "fragmento" de un anticuerpo comprende una parte del anticuerpo, por ejemplo, que comprende una región de unión a antígeno o región variable del mismo. Los ejemplos no
20 limitantes de fragmentos incluyen fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos F(ab')₂, fragmentos Fv, diacuerpos, anticuerpos lineales y moléculas de anticuerpos monocatenarios.

[0068] Como se usa en el presente documento, "fragmentación" o "formación de fragmentos" se refiere a la degradación de un anticuerpo o fragmento del mismo cuando
25 está en una formulación o se añade a ella. Un fragmento generado por la fragmentación o la formación de fragmentos puede o no ser capaz de unirse al antígeno al que se une el
30 anticuerpo o fragmento del mismo.

5 [0069] Como se usa en el presente documento, "tampón de histidina" puede comprender histidina, clorhidrato de histidina o una combinación de los mismos, en donde el clorhidrato de histidina puede ser clorhidrato de histidina monohidrato.

 [0070] Como se usa en el presente documento, "tampón de citrato" puede comprender ácido cítrico, sus sales o una combinación de los mismos, en donde el ácido cítrico puede ser ácido cítrico monohidrato o ácido cítrico anhidro.

10 ***Realizaciones no limitantes de la divulgación:***

 [0071] Determinadas realizaciones de la presente divulgación se refieren a formulaciones farmacéuticas acuosas.

15 [0072] En algunas realizaciones, se proporciona una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

 (a) un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, a una concentración de 80-300 mg/ml; y

20 (b) arginina de 100 mM a 400 mM, en donde la arginina es arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos, que comprende opcionalmente uno cualquiera o más de los siguientes:

25 a. polisorbato 80 del 0.01 % p/v al 0.1 % p/v;

30 b. un tampón farmacéuticamente aceptable, opcionalmente, en donde el tampón es un tampón

de histidina o tampón de citrato; y

c. un pH de 4.5 a 5.5.

[0073] En algunas realizaciones, se proporciona una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

5 (a) un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la
10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, a una concentración de 80-300 mg/ml; y

(b) un tampón farmacéuticamente aceptable, en donde el tampón es un tampón de histidina, opcionalmente, en donde el tampón de histidina está
15 a una concentración de aproximadamente 25 mM, que comprende opcionalmente uno cualquiera o más de los siguientes:

a. polisorbato 80 del 0.01 % p/v al 0.1 % p/v;

20 b. arginina de 100 mM a 400 mM, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos; y

c. un pH de 4.5 a 5.5.

[0074] Algunas realizaciones se refieren a una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

25 (a) un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a protofibrillas A β humanas, a una concentración de 80 mg/ml a 300 mg/ml,

(b) arginina de 100 mM a 400 mM,

(c) polisorbato 80 del 0.01 % p/v al 0.1 % p/v,

30 y

(d) un tampón farmacéuticamente aceptable,
en donde la formulación farmacéutica tiene un
pH que varía de 4.5 a 5.5, y

en donde el anticuerpo o fragmento del mismo
comprende: (i) un dominio variable de cadena pesada que
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1,
y (ii) un dominio variable de cadena ligera que
comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2,
y en donde la arginina es arginina, clorhidrato de
arginina o una combinación de los mismos.

[0075] Concentración de anticuerpo

[0076] Para cualquiera de las formulaciones
farmacéuticas acuosas descritas en el presente documento, el
anticuerpo puede estar presente en las siguientes
concentraciones.

[0077] En algunas realizaciones de la formulación
farmacéutica, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado
o fragmento del mismo está presente en una concentración de
100 mg/ml o más. En algunas realizaciones de la formulación
farmacéutica, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado
o fragmento del mismo está presente en una concentración de
100 mg/ml.

[0078] En algunas realizaciones de la formulación
farmacéutica, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado
o fragmento del mismo está presente en una concentración de
200 mg/ml o más. En algunas realizaciones de la formulación
farmacéutica, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado
o fragmento del mismo está presente en una concentración de
200 mg/ml.

[0079] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo está presente en una concentración que varía de 80 mg/ml a 300 mg/ml. En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo está presente en una concentración que varía de 80 mg/ml a 240 mg/ml.

[0080] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo está presente en una concentración que varía de 100 mg/ml a 200 mg/ml.

[0081] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo está presente en una concentración que varía de 80 mg/ml a 300 mg/ml, de 85 mg/ml a 275 mg/ml, de 90 mg/ml a 250 mg/ml, de 95 mg/ml a 225 mg/ml, de 100 a 200 mg/ml. En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo está presente en una concentración que varía de 90 mg/ml a 220 mg/ml, de 100 mg/ml a 210 mg/ml o de 110 mg/ml a 200 mg/ml.

[0082] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo está presente en una concentración de 80 mg/ml, 90 mg/ml, 100 mg/ml, 110 mg/ml, 120 mg/ml, 180 mg/ml, 190 mg/ml, 200 mg/ml, 210 mg/ml, 220 mg/ml, 230 mg/ml, 240 mg/ml, 250 mg/ml, 260 mg/ml, 270 mg/ml, 280 mg/ml, 290 mg/ml o 300 mg/ml.

[0083] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado

o fragmento del mismo está presente en una concentración de 100 mg/ml.

5 **[0084]** En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo está presente en una concentración de 200 mg/ml.

[0085] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo es BAN2401.

10 **[0086]** **Arginina**

[0087] Para cualquiera de las formulaciones farmacéuticas acuosas descritas en el presente documento, la formulación puede comprender arginina de la siguiente manera.

15 **[0088]** En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica comprende arginina. En algunas realizaciones, la arginina es arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos.

[0089] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, la concentración de arginina varía de aproximadamente 100 mM a aproximadamente 400 mM.

20 **[0090]** En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, la concentración de arginina varía de 100 mM a 400 mM, de 110 mM a 380 mM, de 120 mM a 360 mM, de 125 mM a 350 mM, de 100 mM a 200 mM, de 125 mM a 200 mM o de 150 mM a 200 mM. En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, la concentración de arginina varía de arginina 150 mM a 250 mM, de 160 mM a 240 mM, de 170 mM a 230 mM, de 180 mM a 220 mM, de 190 mM a 210 mM, clorhidrato de arginina
30 o una combinación de los mismos

[0091] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, la concentración de arginina es de 125 mM.

[0092] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, la concentración de arginina es de 200 mM.

5 [0093] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, la concentración de arginina varía de 200 mM a 400 mM, de 210 mM a 390 mM, de 220 mM a 380 mM, de 230 mM a 370 mM, de 240 mM a 360 mM, de 240 mM a 350 mM o de 250 mM a 350 mM.

10 [0094] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, la concentración de arginina es de 350 mM.

[0095] **Polisorbato 80 (PS80)**

15 [0096] Para cualquiera de las formulaciones farmacéuticas acuosas descritas en el presente documento, la formulación puede comprender polisorbato 80 de la siguiente manera.

[0097] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, la concentración de polisorbato 80 varía de aproximadamente el 0.01 % p/v al 0.1 % p/v, del 0.01 % p/v al 0.08 % p/v, del 0.02 % p/v al 0.08 % p/v, del 0.03 % p/v al 0.07 % p/v o del 0.04 % p/v al 0.06 % p/v.

25 [0098] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el polisorbato 80 está presente en una concentración del 0.01 % p/v, 0.02 % p/v, 0.03 % p/v, 0.04 % p/v, 0.05 % p/v, 0.06 % p/v, 0.07 % p/v o del 0.08 % p/v.

[0099] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el polisorbato 80 está presente en una concentración del 0.02 % p/v.

30 [00100] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el polisorbato 80 está presente en una

concentración del 0.05 % p/v.

[00101] Tampón

5 **[00102]** Para cualquiera de las formulaciones farmacéuticas acuosas descritas en el presente documento, la formulación puede comprender un tampón farmacéuticamente aceptable de la siguiente manera.

[00103] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el tampón farmacéuticamente aceptable es tampón de citrato.

10 **[00104]** En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el tampón de citrato está presente en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM.

15 **[00105]** En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, la concentración del tampón de citrato varía de 10 mM a 100 mM, de 10 mM a 90 mM, de 15 mM a 85 mM, de 20 mM a 80 mM, de 25 mM a 75 mM, de 30 mM a 70 mM, de 30 mM a 60 mM o de 30 mM a 50 mM.

20 **[00106]** En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el tampón de citrato está presente en una concentración de 50 mM.

[00107] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el tampón farmacéuticamente aceptable es un tampón de histidina.

25 **[00108]** En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el tampón de histidina está presente en una concentración de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 100 mM.

30 **[00109]** En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, la concentración del tampón de histidina varía

de 10 mM a 100 mM, de 12 mM a 80 mM, de 14 mM a 60 mM o de 15 mM a 55 mM, de 15 mM a 35 mM o de 15 mM a 25 mM.

5 **[00110]** En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el tampón de histidina está presente en una concentración de 25 mM.

[00111] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el tampón de histidina está presente en una concentración de 50 mM.

10 **[00112]** En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el tampón de histidina comprende histidina y clorhidrato de histidina monohidrato. En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el tampón de histidina comprende histidina y clorhidrato de histidina monohidrato, en donde la histidina está en una concentración
15 de aproximadamente 0.1 a 0.3 mg/ml, y el clorhidrato de histidina monohidrato está en una concentración de aproximadamente 4 a 6 mg/ml. En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el tampón de histidina comprende histidina y clorhidrato de histidina monohidrato, en donde
20 la histidina está en una concentración de aproximadamente 0.26 mg/ml, y el clorhidrato de histidina monohidrato está en una concentración de aproximadamente 4.89 mg/ml. En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el tampón de histidina comprende histidina y clorhidrato de
25 histidina monohidrato, en donde la histidina comprende 0.2-0.3 mg/ml de histidina y de 4.4 a 4.9 mg/ml de clorhidrato de histidina, opcionalmente, en donde el clorhidrato de histidina es monohidrato.

[00113] pH

[00114] Para cualquiera de las formulaciones farmacéuticas acuosas descritas en el presente documento, la formulación puede comprender a pH de la siguiente manera.

5 [00115] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el pH se encuentra en el intervalo de 4.0 a 6.0, de 4.2 a 5.8, de 4.3 a 5.7, de 4.4 a 5.6 o de 4.5 a 5.5.

10 [00116] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el pH es de 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4 o 5.5.

[00117] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el pH es de 4.5 a 5.5.

[00118] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, el pH es de 5.0.

15 [00119] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, la formulación farmacéutica es adecuada para inyección intravenosa.

20 [00120] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica, la formulación farmacéutica es adecuada para inyección subcutánea.

[00121] En algunas realizaciones de la formulación farmacéutica acuosa, la formulación farmacéutica comprende metionina.

25 [00122] En algunas realizaciones, se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

- (a) de 80 mg/ml a 240 mg/ml de BAN2401,
- (b) clorhidrato de arginina de 140 mM a 260 mM,
- (c) polisorbato 80 del 0.01 % p/v al 0.1 % p/v,

y

30 (d) tampón de histidina de 15 mM a 35 mM,

en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5.

[00123] En algunas realizaciones, se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

5 (a) de 80 mg/ml a 240 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena
10 ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2,

(b) clorhidrato de arginina de 140 mM a 260 mM,

(c) polisorbato 80 del 0.01 % p/v al 0.1 % p/v,

y

15 (d) tampón de histidina de 15 mM a 35 mM,

en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5.

[00124] En algunas realizaciones, se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

20 (a) de 80 mg/ml a 240 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, y (ii) una cadena ligera que comprende la secuencia de
25 aminoácidos de SEQ ID NO:12,

(b) clorhidrato de arginina de 140 mM a 260 mM,

(c) polisorbato 80 del 0.01 % p/v al 0.1 % p/v,

y

(d) tampón de histidina de 15 mM a 35 mM,

30

en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5.

5 **[00125]** En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

- (a) de 80 mg/ml a 120 mg/ml de BAN2401,
- (b) arginina de 240 mM a 360 mM,
- (c) polisorbato 80 del 0.03 % p/v al 0.08 % p/v,

10 y

- (d) tampón de citrato de 30 mM a 70 mM,

en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5, y en donde la arginina es arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos.

15

[00126] En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

20 (a) de 80 mg/ml a 120 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2,

25

- (b) arginina de 240 mM a 360 mM,
- (c) polisorbato 80 del 0.03 % p/v al 0.08 % p/v,

y

- (d) tampón de citrato de 30 mM a 70 mM,

30 en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5, y en donde la arginina es

arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos.

[00127] En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

(a) de 80 mg/ml a 120 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, y (ii) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12,

(b) arginina de 240 mM a 360 mM,

(c) polisorbato 80 del 0.03 % p/v al 0.08 % p/v,

y

(d) tampón de citrato de 30 mM a 70 mM,

en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5, y en donde la arginina es arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos.

[00128] En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

(a) 100 mg/ml de BAN2401,

(b) clorhidrato de arginina 200 mM,

(c) polisorbato 80 al 0.05 % p/v, y

(d) tampón de histidina 25 mM,

en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5.

[00129] En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

5 (a) 100 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2,

10 (b) clorhidrato de arginina 200 mM,
(c) polisorbato 80 al 0.05 % p/v, y
(d) tampón de histidina 25 mM,

en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5.

15 **[00130]** En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

(a) 100 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) una
20 cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, y (ii) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12,

(b) clorhidrato de arginina 200 mM,
(c) polisorbato 80 al 0.05 % p/v, y
25 (d) tampón de histidina 25 mM,

en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5.

[00131] En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que
30 comprende:

- (a) 200 mg/ml de BAN2401,
- (b) clorhidrato de arginina 200 mM,
- (c) polisorbato 80 al 0.05 % p/v, y
- (d) tampón de histidina 25 mM,

5 en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5.

[00132] En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

10 (a) 200 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la

15 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2,

- (b) clorhidrato de arginina 200 mM,
- (c) polisorbato 80 al 0.05 % p/v, y
- (d) tampón de histidina 25 mM,

20 en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5.

[00133] En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

25 (a) 200 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, y (ii) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12,

- (b) clorhidrato de arginina 200 mM,
- 30 (c) polisorbato 80 al 0.05 % p/v, y

(d) tampón de histidina 25 mM,
en donde la formulación farmacéutica tiene un pH
que varía de 4.5 a 5.5.

5 **[00134]** En algunas realizaciones, en el presente
documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que
comprende:

 (a) 100 mg/ml de BAN2401,
 (b) arginina 350 mM,
 (c) polisorbato 80 al 0.05 % p/v, y
10 (d) tampón de citrato 50 mM,
en donde la formulación farmacéutica tiene un pH
que varía de 4.5 a 5.5, y en donde la arginina es
arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de
los mismos.

15 **[00135]** En algunas realizaciones, en el presente
documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que
comprende:

 (a) 100 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas
A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) un
20 dominio variable de cadena pesada que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un
dominio variable de cadena ligera que comprende la
secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2,
 (b) arginina 350 mM,
25 (c) polisorbato 80 al 0.05 % p/v, y
 (d) tampón de citrato 50 mM,
en donde la formulación farmacéutica tiene un pH
que varía de 4.5 a 5.5, y en donde la arginina es
arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de
30 los mismos.

[00136] En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

(a) 100 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, y (ii) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12,

(b) arginina 350 mM,
(c) polisorbato 80 al 0.05 % p/v, y
(d) tampón de citrato 50 mM,

en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5, y en donde la arginina es arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos.

[00137] En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

(a) de 150 mg/ml a 250 mg/ml de BAN2401,
(b) clorhidrato de arginina de 100 mM a 150 mM,
(c) polisorbato 80 del 0.01 % p/v al 0.05 % p/v, y
(d) tampón de histidina de 35 mM a 65 mM,

[00138] en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5. En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

(a) de 150 mg/ml a 250 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo

que comprende: (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2,

(b) clorhidrato de arginina de 100 mM a 150 mM,

(c) polisorbato 80 del 0.01 % p/v al 0.05 % p/v,

y

(d) tampón de histidina de 35 mM a 65 mM,

en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5.

[00139] En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

(a) de 150 mg/ml a 250 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) una cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:11, y (ii) una cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:12,

(b) clorhidrato de arginina de 100 mM a 150 mM,

(c) polisorbato 80 del 0.01 % p/v al 0.05 % p/v,

y

(d) tampón de histidina de 35 mM a 65 mM,

en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5.

[00140] En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica acuosa tiene un pH de 5.0.

Método para reducir la formación de agregados

[00141] En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela un método para reducir la formación de agregados de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo, que comprende:

5 (a) proporcionar una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a protofibrillas A β humanas, a una concentración de 50 mg/ml o más, opcionalmente, en donde la concentración es de 80 mg/ml
10 a 300 mg/ml, opcionalmente, en donde la concentración es de 100 mg/ml a 200 mg/ml, y

 (b) añadir arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos y, opcionalmente, proporcionar un tampón farmacéuticamente aceptable, en
15 donde el tampón es opcionalmente tampón de histidina, en donde el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo comprende (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable
20 de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

[00142] En algunas realizaciones del método para reducir la formación de agregados, el pH de la formulación farmacéutica se encuentra en el intervalo de 4.5 a 5.5. En
25 algunas realizaciones del método, el pH de la formulación farmacéutica es de 5.0.

[00143] En algunas realizaciones del método para reducir la formación de agregados, la arginina, el clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos está
30 presente en una concentración de 150 mM a 250 mM.

[00144] En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela un método para reducir la fragmentación de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo, que comprende:

5 (a) proporcionar una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a protofibrillas A β humanas, a una concentración de 50 mg/ml o más, opcionalmente, en donde la concentración es de 80 mg/ml
10 a 300 mg/ml, opcionalmente, en donde la concentración es de 100 mg/ml a 200 mg/ml, y

 (b) añadir tampón de histidina y, opcionalmente, proporcionar además arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos, en donde el anticuerpo
15 anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo comprende (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

20 **[00145]** En algunas realizaciones del método para reducir la fragmentación, el pH de la formulación farmacéutica se encuentra en el intervalo de 4.5 a 5.5. En algunas realizaciones del método, el pH de la formulación farmacéutica es de 5.0.

25 **[00146]** En algunas realizaciones del método para reducir la fragmentación, la arginina, el clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos está presente en una concentración de 100 mM a 400 mM.

[00147] En algunas realizaciones del método para reducir la fragmentación, la formulación farmacéutica comprende además polisorbato 80 del 0.01 % p/v al 0.1 % p/v.

5 [00148] En algunas realizaciones del método para reducir la fragmentación, la formulación farmacéutica comprende además un tampón farmacéuticamente aceptable, en donde el tampón es tampón de histidina, opcionalmente, en donde el tampón de histidina varía de 10 mM a 100 mM, de 12 mM a 80 mM, de 14 mM a 60 mM o de 15 mM a 55 mM, de 15 mM
10 a 35 mM o de 15 mM a 25 mM.

[00149] En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela un método para reducir la formación de agregados y/o la fragmentación de un anticuerpo anti
15 protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo, que comprende:

(a) proporcionar una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a protofibrillas A β humanas, a una concentración de 50 mg/ml o más,
20 opcionalmente en donde la concentración es de 80 mg/ml a 300 mg/ml, opcionalmente en donde la concentración es de 100 mg/ml a 200 mg/ml,

(b) añadir arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos, y

25 (c) proporcionar un tampón de histidina farmacéuticamente aceptable, en donde el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo comprende (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1,

30

y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

5 **[00150]** En algunas realizaciones, en el presente documento se desvela un método para reducir la formación de agregados y/o la fragmentación de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo, que comprende:

10 (a) proporcionar una formulación farmacéutica que comprende un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a protofibrillas A β humanas, a una concentración de 50 mg/ml o más, opcionalmente en donde la concentración es de 80 mg/ml a 300 mg/ml, opcionalmente en donde la concentración es de 100 mg/ml a 200 mg/ml,

15 (b) proporcionar tampón de histidina, y

20 (c) proporcionar arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos, en donde la formulación está a un pH de 4.5-5.5, en donde el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo comprende (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2.

25 **[00151]** En el presente documento también se proporcionan las siguientes realizaciones:

 [Embodiment 01] Una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

30 a. un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que se une a

protofibrillas A β humanas, a una concentración de 80 mg/ml a 300 mg/ml,

b. arginina de 100 mM a 400 mM,

c. polisorbato 80 del 0.01 % p/v al 0.1 %

5 p/v, y

d. un tampón farmacéuticamente aceptable,

en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5,

10 en donde el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo comprende: (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, y

15 en donde la arginina es arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos.

[Embodiment 02] La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo está presente en una concentración de 100 mg/ml a 200 mg/ml.

[Embodiment 03] La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo está presente en una concentración de 100 mg/ml.

[Embodiment 04] La formulación farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento

30

del mismo está presente en una concentración de 200 mg/ml.

5 [Embodiment 05] La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que comprende además metionina.

[Embodiment 06] La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en donde el tampón farmacéuticamente aceptable es tampón de citrato o tampón de histidina.

10 [Embodiment 07] La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, que comprende tampón de citrato de 10 a 100 mM o tampón de histidina de 10 a 100 mM.

15 [Embodiment 08] La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende arginina de 125 a 350 mM.

20 [Embodiment 09] La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, que comprende arginina 200 mM, en donde la arginina es clorhidrato de arginina.

[Embodiment 10] La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-9, que comprende arginina 200 mM, en donde la arginina es clorhidrato de arginina, y tampón de histidina 25 mM.

25 [Embodiment 11] Una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

30 a. de 80 mg/ml a 240 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de

SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2,

5 b. clorhidrato de arginina de 140 mM a 260 mM,

 c. polisorbato 80 del 0.02 % p/v al 0.08 % p/v, y

 d. tampón de histidina de 15 mM a 35 mM,
10 en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5.

[Embodiment 12] Una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

 a. de 80 mg/ml a 120 mg/ml de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo
15 que comprende: (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2,

20 b. arginina de 240 mM a 360 mM,

 c. polisorbato 80 del 0.02 % p/v al 0.08 % p/v, y

 d. tampón de citrato de 30 mM a 50 mM,
25 en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5,

 y en donde la arginina es arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos.

[Embodiment 13] Un método para reducir la formación de agregados de un anticuerpo anti

protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo, que comprende:

proporcionar una formulación farmacéutica acuosa que comprende un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 a una concentración de 80 mg/ml a 300 mg/ml, y

añadir arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos a dicha formulación farmacéutica acuosa, en donde el pH de la formulación farmacéutica varía de 4.5 a 5.5.

[Embodiment 14] El método de acuerdo con la reivindicación 13, en donde la arginina, el clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos está presente en una concentración de 150 a 250 mM.

[Embodiment 15] El método de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la arginina, el clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos está presente en una concentración de 200 mM.

[Embodiment 16] El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en donde la formulación farmacéutica comprende además un tampón farmacéuticamente aceptable.

[Embodiment 17] El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde el tampón farmacéuticamente aceptable es tampón de histidina o tampón de citrato.

[Embodiment 18] Un método para reducir la fragmentación de un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo, que comprende:

5 proporcionar una formulación farmacéutica acuosa que comprende un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la
10 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2 a una concentración de 80 mg/ml a 300 mg/ml, y

añadir tampón de histidina a dicha composición farmacéutica acuosa, en donde el pH de la formulación farmacéutica varía de 4.5 a 5.5.

15 [Embodiment 19] El método de acuerdo con la reivindicación 18, que comprende tampón de histidina de 15 a 35 mM.

[Embodiment 20] El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13-19, en donde la
20 formulación farmacéutica comprende además polisorbato 80 del 0.01 % p/v al 0.1 % p/v.

[Embodiment 21] Una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

a. de 80 mg/ml a 240 mg/ml de un anticuerpo
25 anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la
30 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;

- b. arginina de 140 mM a 260 mM, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos;
- c. polisorbato 80 del 0.01 % p/v al 0.1 % p/v; y
- 5 d. tampón de histidina de 15 mM a 35 mM o tampón de citrato de 30 mM a 50 mM,
- en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5.

[Embodiment 22] La formulación farmacéutica de acuerdo con la realización 21, que comprende 100 mg/ml del anticuerpo.

[Embodiment 23] La formulación farmacéutica de acuerdo con la realización 21, que comprende 200 mg/ml del anticuerpo.

15 [Embodiment 24] La formulación farmacéutica de acuerdo con la realización 21, que comprende de 90 mg/ml a 220 mg/ml, de 100 mg/ml a 210 mg/ml o de 110 mg/ml a 200 mg/ml del anticuerpo.

[Embodiment 25] La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 21-24, que comprende tampón de histidina, en donde el tampón de histidina comprende histidina de 15 mM a 30 mM, de 15 mM a 25 mM o de 20 mM a 30 mM.

25 [Embodiment 26] La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 21-25, que comprende tampón de histidina, en donde el tampón de histidina comprende 0.2-0.3 mg/ml de histidina y de 4.4 a 4.9 mg/ml de clorhidrato de histidina, opcionalmente, en donde el clorhidrato de histidina es monohidrato.

30

[Embodiment 27] La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 21-26, que comprende arginina 150 mM a 250 mM, de 160 mM a 240 mM, de 170 mM a 230 mM, de 180 mM a 220 mM, de 190 mM a 210 mM, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos.

[Embodiment 28] La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 21-27, que comprende polisorbato 80 del 0.02 % p/v al 0.05 % o del 0.04 % p/v al 0.04 % p/v.

[Embodiment 29] La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 21-28, que comprende tampón de citrato.

[Embodiment 30] La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 21-29, que comprende tampón de histidina.

[Embodiment 31] La formulación farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 21-30, que comprende además metionina.

[Embodiment 32] Una formulación farmacéutica acuosa que comprende:

- a. de 100 mg/ml a 200 mg/ml de un anticuerpo que comprende: (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2;
- b. clorhidrato de arginina 200 mM;
- c. polisorbato 80 al 0.05 % p/v; y
- d. tampón de histidina 25 mM,

en donde la formulación farmacéutica tiene un pH que varía de 4.5 a 5.5.

5 [Embodiment 33] La formulación farmacéutica de acuerdo con la realización 32, que comprende 100 mg/ml del anticuerpo.

[Embodiment 34] La formulación farmacéutica de acuerdo con la realización 32, que comprende 200 mg/ml del anticuerpo.

10 [Embodiment 35] Un método para reducir la formación de agregados y/o la fragmentación de un anticuerpo, que comprende:

a. proporcionar una formulación farmacéutica acuosa que comprende un anticuerpo anti protofibrillas A β aislado o fragmento del mismo que comprende: (i) un dominio variable de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1, y (ii) un dominio variable de cadena ligera que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:2, a una concentración de 80 mg/ml a 300 mg/ml, y

15

20

b. añadir 1) arginina, clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos, o 2) tampón de histidina a dicha composición farmacéutica acuosa.

25 [Embodiment 36] El método de la realización 35, en donde el pH de la formulación farmacéutica varía de 4.5 a 5.5.

[Embodiment 37] El método de la realización 35, en donde la arginina, el clorhidrato de arginina o

una combinación de los mismos está presente en una concentración de 150-250 mM.

5 [Embodiment 38] El método de acuerdo con la realización 37, en donde la arginina, el clorhidrato de arginina o una combinación de los mismos está presente en una concentración de 200 mM.

[Embodiment 39] El método de acuerdo con la realización 38, que comprende tampón de histidina de 15 a 25 mM.

10 [Embodiment 40] El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 35-39, en donde la formulación farmacéutica comprende además polisorbato 80 del 0.01 % p/v al 0.1 % p/v.

15 [Embodiment 41] El método de acuerdo con una cualquiera de las realizaciones 35-40, en donde la formulación farmacéutica comprende además un tampón farmacéuticamente aceptable.

20 [Embodiment 42] El método de acuerdo con la realización 41, en donde el tampón farmacéuticamente aceptable es tampón de histidina o tampón de citrato.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Estudio de concentración de proteína

25 [00152] Se prepararon muestras con tres concentraciones de proteína (10, 100, 200 mg/ml) y se examinaron en el estudio de concentración. El material de 10 mg/ml era una sustancia farmacológica purificada (PDS, por sus siglas en inglés) de BAN2401 y los materiales de 100 y 200 mg/ml se produjeron a partir de PDS de BAN2401 usando
30 filtros giratorios Amicon Ultra-15. Todas las muestras

estaban en el mismo tampón de formulación (citrato de sodio 25 mM, cloruro de sodio 125 mM, pH 5.7), excepto que cada una tenía un nivel de PS80 diferente. Los porcentajes de PS80 de las muestras de 10, 100 y 200 mg/ml fueron del 0.02 %, 0.16 % y 0.32 %, respectivamente. Todas las muestras se filtraron en 0.2 g y se dividieron en alícuotas en tubos de polipropileno (PP) estériles para la prueba de estabilidad. (Nota: El proceso de eliminación de PS80 no estaba disponible en el momento en que se realizó el estudio de concentración).

[00153] La estabilidad de las muestras se evaluó a dos temperaturas (5 y 25 °C) durante 3 meses usando HPLC-SEC nativa, pH y DLS. Se realizaron ensayos de caracterización adicionales, tales como verificación de PS80, en las muestras de T = 0. Los detalles de las pruebas de muestra se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Programa de pruebas (Estudio de concentración)

Punto temporal	T = 0	T = 1 m	T = 2 m	T = 3 m
Temperatura	ND	5 °C	5 °C	5 °C
		25 °C	25 °C	25 °C
Número de muestras	3	6	6	6
Pruebas	SEC nativa	SEC nativa	SEC nativa	SEC nativa
	pH	pH	pH	pH
	DLS	DLS	DLS	DLS

[00154] Se midió el pH usando un medidor de pH con una microsonda. Antes de las mediciones, se realizó una calibración usando estándares de pH 4.0 y 7.0.

5 [00155] La agregación y la degradación física del BAN2401 concentrado se evaluaron realizando HPLC-SEC nativa en muestras de estabilidad almacenadas a 5 y 25 °C.

10 [00156] El análisis de HPLC-SEC (nativa) se realizó utilizando una columna TSK G3000 SWXL con fosfato de sodio 0.2 M, fase móvil de pH 7.0 a un caudal de 1.0 ml/min. Los volúmenes de inyección de muestra fueron 15, 1.5 o 0.8 μ l, para concentraciones de proteína de 10, 100 o 200 mg/ml, respectivamente. Esto garantiza que se inyecten aproximadamente 150 pg de proteína en la columna durante todo el estudio. Los resultados de las áreas máximas
15 relativas (%) para el monómero, el agregado y el fragmento se indican en las figuras 1-6.

[00157] A ambas temperaturas (5 y 25 °C) se observaron mayores porcentajes de agregado y tasas de agregación con mayores concentraciones de proteína. Para las
20 muestras de 100 y 200 mg/ml, los porcentajes agregados de partida fueron casi el doble que los de la muestra de 10 mg/ml. Esto indicó que el proceso de concentración por sí solo provocó que la proteína se agregara. Se produjo una agregación adicional durante el almacenamiento a 5 y 25 °C.
25 La tasa de agregación promedio durante 3 meses a 5 °C fue del 0.17 % al mes para 100 mg/ml y del 0.20 % al mes para 200 mg/ml. A modo de comparación, la muestra de 10 mg/ml mostró solo una tasa de agregación del 0.07 % al mes en las mismas condiciones. En resumen, parecía que BAN2401 a razón

de 100 mg/ml o más no era físicamente estable en la formulación.

[00158] La concentración de proteína se evaluó mediante UV midiendo la absorbancia a 280 y 320 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-800. Las muestras se diluyeron 500 veces y se prepararon por duplicado. La concentración de proteína se calculó usando un coeficiente de extinción, ϵ , de 1.32 usando la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración} = (A_{280} - A_{320}) / \epsilon \times \text{Factor de dilución}$$

[00159] La concentración de proteína se midió usando un espectrofotómetro UV-Vis. Los resultados se enumeran en la Tabla 2. En general, las concentraciones permanecieron sin cambios a lo largo de los 3 meses a ambas temperaturas.

Tabla 2. Resultados de la concentración de proteína (estudio de concentración)

ID de muestra	Concentración de proteína (mg/ml)						
	T = 0	T = 1 m		T = 2 m		T = 3 m	
		5 °C	25 °C	5 °C	25 °C	5 °C	25 °C
10 mg/ml	10.6	9.93	9.93	9.9	10.0	10.11	10.15
100 mg/ml	110.3	110.1	114.1	103.4	104.2	106.6	106.4
200 mg/ml	210.8	197.2	224.5	207.4	205.4	205.3	205.8

Ejemplo 2: Estudio de cribado de pH

[00160] La estabilidad de BAN2401 a 200 mg/ml se evaluó a cinco valores de pH diferentes. Para preparar las muestras, se concentró la PDS de BAN2401 eliminando con PS80 y se diafiltró en un tampón que contenía citrato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 100 mM, pH 4.5. El ajuste de concentración final se realizó mediante una dilución para lograr una concentración de 200 mg/ml de proteína y PS80 al

0.02 %. El material resultante se dividió en 5 alícuotas; cuatro de las alícuotas se titularon con hidróxido de sodio 10 N para producir muestras a diferentes pH (es decir, pH 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5). Las muestras resultantes se filtraron a 0.2 μ m y se subdividieron en alícuotas en tubos de polipropileno (PP) estériles para evaluar la estabilidad.

[00161] La estabilidad de las muestras se evaluó a dos temperaturas (5 y 25 °C) usando HPLC-SEC nativa, pH y DLS durante 3 meses. Además, se realizó un estudio de agitación en el punto temporal de 1 mes, en donde un subconjunto de las muestras a 5 °C se agitó horizontalmente a 250 RPM durante 3 días en una incubadora a 25 °C. Los detalles de las pruebas de muestra se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Programa de pruebas (estudio de pH)

Punto temporal	T = 0	T = 1 mes	T = 2 mes	T = 3 mes
Temperatura	nd	5 °C	5 °C	5 °C
		25 °C	25 °C	25 °C
Agitación	nd	Agitación	No requerida	No requerida
Número de muestras	5	15	10	10
Pruebas	SEC nativa pH DLS DSC	SEC nativa pH DLS	SEC nativa pH DLS	SEC nativa pH DLS

[00162] El análisis de SEC-HPLC se realizó utilizando una columna TSK G3000 SWXL con fosfato de sodio 0.2 M, fase móvil de pH 7.0 a un caudal de 1.0 ml/min. Los volúmenes de inyección de muestra fueron 15, 1.5 o 0.8 µl, para concentraciones de proteína de 10, 100 o 200 mg/ml, respectivamente. Esto garantiza que se inyecten aproximadamente 150 µg de proteína en la columna durante todo el estudio. Se indican los resultados de las áreas máximas relativas (%) para el monómero, el agregado y el fragmento.

[00163] La agregación y la degradación física del BAN2401 concentrado se evaluaron realizando HPLC-SEC nativa en muestras de estabilidad almacenadas a 5 y 25 °C. Los resultados se muestran en las figuras 7-12. BAN2401 pareció ser más estable a un pH más bajo en ambas temperaturas (5 y 25 °C). Las formulaciones con pH 4.5 y 5.0 comenzaron con bajos porcentajes de agregados y exhibieron un aumento más lento en la formación de agregados, a una tasa de ~0.07 % al mes a 5 °C. Además de la agregación, también se analizó la fragmentación de la proteína. Los resultados sugirieron que la fragmentación de BAN2401 fue más pronunciada en las formulaciones de BAN2401 a un pH más bajo. Basándose en estas consideraciones, las formulaciones de BAN2401 a pH 5.0 se consideraron las más estables (es decir, exhibieron menos agregación y/o degradación física de BAN2401 en relación con otras formulaciones a diferentes valores de pH).

Ejemplo 3: Estudio de cribado de excipientes

[00164] En este estudio se cribaron doce excipientes. Para preparar las muestras con BAN2401 a 200 mg/ml, se

concentró BAN2401 eliminado con PS80 mediante una etapa de TFF, seguido de una etapa de diafiltración con el tampón base (citrato 50 mM, PS80 al 0.02 %, pH 6.0). El material concentrado se dividió en alícuotas en veinticuatro fracciones. Cada fracción se enriqueció con una solución madre que contenía un excipiente específico. Para la mayoría de los excipientes se examinaron dos concentraciones, excepto el cloruro de sodio y el ácido ascórbico para los que se prepararon muestras con tres y un nivel de concentración, respectivamente. En la Tabla 4 se muestra una lista de los excipientes usados y sus concentraciones.

Tabla 4. Lista de excipientes y concentraciones correspondientes

Excipiente	Concentración (N.º de formulación)
Ninguno	La muestra de control (F0) contenía la proteína en el tampón base sin ningún excipiente añadido.
Sacarosa	1 % (F1), 6 % (F2)
Trehalosa	0.5 % (F3), 3.5 % (F4)
Manitol	0.5 % (F5), 1.8 % (F6)
Prolina	50 Mm (F9), 400 Mm (F10)
Glicina	50 Mm (F11), 400 Mm (F12)
Arginina	25 Mm (F13), 160 mM (F14)

NaCl	50 mM (F16), 150 mM (F17), 500 mM (F18)
PS80	0.05 % v/v (F19), 0.1 % v/v (F20)
PEG400	1 % (F21), 6 % (F22)
Dextrano, BPM	1 % (F23), 5 % (F24)
Ácido ascórbico	50 Mm (F15)
Sorbitol	1 % (F7), 6 % (F8)

5
10
15
[00165] Todas las muestras, incluyendo el control (es decir, la muestra en el tampón base sin excipiente), se filtraron a 0.2 g y a continuación se cargaron en jeringas BD asépticamente usando una herramienta de taponamiento manual. Las muestras de control también se cargaron en viales de vidrio. Los viales y las jeringas BD se colocaron a 5 y 25 °C. La estabilidad de la muestra se evaluó durante 2 meses usando HPLC-SEC nativa y pH.

20
[00166] Las muestras del estudio de cribado de excipientes se prepararon en una condición de tampón subóptima (citrato 50 mM, PS80 al 0.02 %, pH 6.0) para amplificar los efectos positivos de los excipientes en la prevención de la formación de agregados. El perfil de estabilidad (agregación) de cada formulación durante 2 meses a 25 °C se evaluó mediante HPLC-SEC nativa.

25
30
[00167] Como se muestra en las figuras 13-15, la formulación que contenía arginina 160 mM (F14) produjo la tasa de agregación más baja entre las formulaciones. Como comparación, la formulación de arginina 160 mM mostró solo un 1.4 % de agregados a 25 °C después de 2 meses, mientras que el control (es decir, la formulación en el tampón base

sin excipiente - F0) mostró un 2.4 % de agregados al mismo tiempo en las mismas condiciones.

5 **[00168]** Además, las formulaciones con arginina tenían los porcentajes de agregados de partida más bajos, lo que indica que la arginina era capaz de suprimir la formación de agregados durante la etapa de concentración de proteína. La fragmentación fue ligeramente mayor con la formulación de arginina (F14) en comparación con el control (F0). Sin embargo, la diferencia podría haber estado dentro de la variabilidad del ensayo.

10 **[00169]** El segundo mejor excipiente en este estudio fue la formulación con prolina 400 mM (F10), aunque su efecto en el control de la agregación no fue tan eficaz como el de la formulación de arginina (F14).

15 **[00170]** Las formulaciones con cloruro de sodio (F16-F18) no mostraron efecto sobre la estabilidad en comparación con la muestra de control. Se hizo la misma observación para las formulaciones con PS80 (F19 y F20): no se observó efecto en la estabilidad al variar el contenido de PS80. La formulación con ácido ascórbico (F15) mostró un efecto drástico al aumentar los porcentajes de agregados y fragmentos desde el inicio del estudio.

20 **[00171]** Se midió el pH de las dos formulaciones de arginina (F13 y F14) para verificar que la presencia de arginina en las formulaciones no había provocado que el pH se desviara con el tiempo. Como se muestra en la Tabla 4, no se observó cambio en el pH. También se midió la osmolalidad de las dos formulaciones. Las muestras se almacenaron a -20 °C antes de descongelarlas al mismo tiempo para las mediciones.

25

30

Tabla 5. pH y osmolalidad de las formulaciones de arginina (F13 y F14)

Formulación de arginina (F13 y F14; punto temporal)	pH	mOsm/kg
F13, T = 0	sin muestra	sin muestra
F14, T = 0	5.86	sin muestra
F13, T = 1 mes	5.97	231
F14, T = 1 mes	5.88	477
F13, T = 2 meses	5.97	230
F14, T = 2 meses	5.89	459

Ejemplo 4: Estudio de concentración de arginina

[00172] La relación entre la concentración de arginina y los agregados en la formulación se estudió por Design Expert® 7.0. Los factores elegidos para el estudio y los niveles explorados para cada factor se muestran en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6. Factores investigados en el Ejemplo 4

Factor	Intervalo del factor	Niveles del factor
BAN2401	30 a 120 mg/ml	30, 53, 75, 98, 120 mg/ml
pH	4.5 a 6.0	4.5, 4.9, 5.2, 5.6 y 6.0
Arginina	0 a 450 mM	0, 225, 338 y 450 mM
Polisorbato 80	0 al 0.1 %	0, 0.025, 0.05, 0.075 y 0.1 %

[00173] Se generó una aleatorización de la muestra mediante un diseño D-óptimo en Design Expert® 7.0. El conjunto de muestras obtenido contenía 25 puntos de datos que incluían 4 réplicas, como se muestra en la Tabla 7. Se preparó y se evaluó cada formulación.

Tabla 7. Formulaciones preparadas para el Ejemplo 4

Entrada	BAN2401 (mg/ml)	pH	Arginina (mM)	Polisorbato 80 (%)
1	30	5.2	0	0.000
2	30	6.0	0	0.050
3	30	4.5	0	0.100
4	30	4.5	0	0.100
5	30	6.0	225	0.000
6	30	4.5	450	0.000
7	30	4.5	450	0.000
8	30	6.0	450	0.100
9	30	6.0	450	0.100
10	53	5.6	225	0.025
11	53	4.9	338	0.075
12	75	4.5	0	0.000
13	75	4.5	0	0.000
14	75	6.0	0	0.100
15	75	5.2	225	0.000
16	75	6.0	450	0.000
17	75	6.0	450	0.000
18	98	4.5	450	0.100
19	98	5.6	225	0.025
20	120	4.9	338	0.075

5

21	120	6.0	0	0.000
22	120	4.5	0	0.100
23	120	5.2	225	0.050
24	120	4.5	450	0.000
25	120	6.0	450	0.100

10

[00174] La relación entre la concentración de arginina y los niveles de agregado en las formulaciones de BAN2401 de 100 mg/ml a pH 5.0 que contenían polisorbato 80 al 0.02 % se estimó mediante Design Expert® 7.0. El resultado de la estimación se muestra en la figura 16.

Ejemplo 5: Estudio de PS80

15

[00175] Para evaluar los cambios en la calidad del producto farmacológico en condiciones de estrés, se realizaron estudios de agitación y congelación-descongelación usando un tampón de formulación (pH 5.0, arginina 350 mM, ácido cítrico 50 mM). En este experimento, se investigaron formulaciones con concentraciones variables de polisorbato 80 para confirmar el efecto del polisorbato 80 en la generación de partículas subvisibles en dichas condiciones de estrés. Las formulaciones investigadas y las condiciones de estrés aplicadas se muestran en la Tabla 8.

20

Tabla 8. Formulaciones estudiadas para estudios de estrés por agitación y congelación-descongelación

25

Formulación	Concentraciones de Polisorbato 80	Condición de estrés
-------------	---	---------------------

30

5 10 15	100 mg/ml de BAN2401 Tampón de citrato 50 mM Arginina 350 mM pH 5.0	• 0 % • 0.02 % • 0.05 % • 0.1 %	• Agitación a 250 rpm durante 3 días a 5 °C • Agitación a 250 rpm durante 3 días a temperatura ambiente • Tres ciclos de congelación-descongelación (de -20 °C a temperatura ambiente)
------------------------------	--	--	--

[00176] Las muestras se prepararon de la misma manera que se describe en el Ejemplo 4. Se añadió una solución de PS80 al 10 % para alcanzar la concentración de PS80 diana en las formulaciones y el ajuste de la concentración de proteína final se realizó mediante dilución con el tampón de formulación. Las formulaciones se pasaron a través de filtros de 0.2 µm y se cargaron en viales de 2 ml con un volumen de llenado de 1.3 ml. Las muestras se colocaron en un agitador orbital en orientación horizontal (vial tendido de lado) que a continuación se colocó en un refrigerador o en la mesa de laboratorio. Las muestras se agitaron a 250 rpm durante 3 días. Otras muestras se congelaron colocándolas en una cámara a -20 °C durante 2 horas, a continuación se retiraron y se dejaron a temperatura ambiente durante 2 horas para que se descongelaran. El ciclo de congelación-descongelación se

repitió tres veces. Las muestras de los estudios de agitación y congelación-descongelación se evaluaron en cuanto a apariencia visual, niveles de agregados y fragmentos mediante SEC-HPLC, y partículas subvisibles mediante imágenes de microflujo (MFI, por sus siglas en inglés).

[00177] Los resultados de los estudios de agitación y congelación-descongelación en formulaciones de BAN2401 con niveles variables de PS80 se resumen a continuación.

Análisis de SEC-HPLC

[00178] El análisis de SEC-HPLC se realizó utilizando una columna TSK G3000 SWXL con fosfato de sodio 0.2 M, fase móvil de pH 7.0 a un caudal de 1.0 ml/min. Los volúmenes de inyección de muestra fueron 5.0 µl o 2.5 µl, para concentraciones de proteína de 50 o 100 mg/ml, respectivamente. Esto garantiza que se inyecten aproximadamente 250 µg de proteína en la columna durante todo el estudio. Se indican los resultados de las áreas máximas relativas (%) para el monómero, el agregado y el fragmento.

[00179] En el nivel de agregados en formulaciones de pH 5 almacenadas a 25 °C durante 3 meses con concentraciones variables de polisorbato 80, no hubo una diferencia significativa en los niveles de agregados cuando la concentración de PS80 se aumentó del 0 % al 0.06 %, en una formulación a pH de 5.0. Se concluye que PS80 no afecta a la formación de agregados, es decir, dímeros y trímeros según lo medido por SEC-HPLC, durante el almacenamiento de formulaciones de BAN2401 a 25 °C.

[00180] En el efecto de la concentración de polisorbato 80 sobre los niveles de fragmentos en

formulaciones a pH 5, la concentración de polisorbato 80 no afecta a los niveles de fragmentos en BAN2401.

[00181] En la apariencia de las formulaciones después de la agitación a 250 rpm durante 3 días a temperatura ambiente, la muestra sin PS80 estaba turbia con la proteína precipitada, mientras que las otras muestras (polisorbato 80 al 0.02 %, 0.05 % y 0.1 %) eran soluciones libres de partículas visiblemente transparentes. Todas las muestras que se agitaron a 250 rpm durante 3 días a 5 °C eran transparentes y estaban libres de precipitados. Todas las muestras sometidas a ciclos de congelación/descongelación también estaban transparentes y libres de precipitado.

[00182] Los niveles de agregados y fragmentos en las formulaciones de BAN2401 sometidas a agitación y congelación-descongelación se muestran en la Tabla 9. La condición de estrés que provocó la mayor inestabilidad fue la agitación en condiciones ambientales. En estas condiciones, la muestra sin PS80 mostró la mayor formación de especies de alto peso molecular y la mayor pérdida de monómero. Este efecto se anuló a medida que aumentaba la concentración de PS80.

Tabla 9. Resultados de los niveles de agregados y fragmentos para los estudios de agitación y congelación-descongelación

Condición de estrés	Polisorbato 80 (%)	Pureza de HPLC (% de área)			
		APM1 ^(a)	APM2 ^(a)	Monómero	BPM ^(b)
5 °C (control)	0	–	0.4	99.4	0.2
	0.02	–	0.5	99.3	0.2

5		0.05	–	0.5	99.4	0.2
		0.1	–	0.5	99.4	0.2
	Agitación a 5 °C	0	0.5	0.6	98.7	0.2
		0.02	–	0.5	99.3	0.2
		0.05	–	0.5	99.3	0.2
0.1		–	0.5	99.3	0.2	
10	Agitación a temperatura ambiente	0 ^(c)	1.5	1.2	97.1	0.2
		0.02	4.0	0.8	95.1	0.2
		0.05	0.1	0.5	99.2	0.2
		0.1	–	0.5	99.3	0.2
15	Tres ciclos de congelación/descongelación	0	–	0.4	99.4	0.2
		0.02	–	0.5	99.4	0.2
		0.05	–	0.4	99.4	0.2
		0.1	–	0.5	99.4	0.2

(a) Especies de alto peso molecular; (b) Especies de bajo peso molecular; y (c) La muestra estaba turbia

Análisis de partículas subvisibles

[00183] El análisis de partículas subvisibles se realizó usando imágenes de microflujo (microscopio de flujo DPA4100 y celda de flujo BP-4100-FC-400-UN). El volumen total de la muestra fue de 0.9 ml y los resultados se informaron para un intervalo de 2.25-100 µm, 5-100 µm, 10-100 µm y 25-100 µm.

[00184] Se redujo un aumento de partículas subvisibles (2 a 10 pm) en las muestras sin PS80 que se sometieron a concentración y congelación-descongelación. La generación de partículas subvisibles se suprimió cada vez más a medida que aumentaba la concentración de PS80 en la formulación. Este efecto se demostró en todos los intervalos de tamaño estudiados. No hubo cambios significativos en las

partículas subvisibles en las formulaciones que contenían el 0.05 % y el 0.1 % de polisorbato 80. Por lo tanto, se eligió una concentración de PS80 del 0.05 % como óptima para la formulación.

5 **[00185]** Los datos sugieren que PS80 no tiene ningún efecto sobre la formación de agregados (dímeros y trímeros) y fragmentos de BAN2401 según lo medido por SEC-HPLC. Por lo tanto, la concentración de PS80 se seleccionó basándose en los resultados de los estudios de agitación y congelación-descongelación. Se eligió una concentración de PS80 del 10 0.05 % para evitar posibles caídas durante el envío y minimizar la formación de partículas subvisibles.

15 **Ejemplo 6: Preparación de formulaciones intravenosas (IV) de BAN2401**

A. Formulación de 10 mg/ml de BAN2401

[00186] Se fabricó una formulación de 10 mg/ml de BAN2401 para inyección intravenosa ("inyección de 10 mg/ml") mediante un proceso aséptico de cGMP convencional para la 20 preparación de una formulación acuosa estéril. Se produjo una inyección de 10 mg/ml de BAN2401 a partir de la formulación de sustancia farmacológica de BAN2401 correspondiente a continuación sin adición de ningún excipiente ni dilución. En la Tabla 10 se muestra una 25 formulación IV de ejemplo que contiene 10 mg/ml de BAN2401.

Tabla 10. Formulación IV de 10 mg/ml comparativa que comprende BAN2401.

componente	composición
BAN2401	10 mg/ml

Tampón de citrato de sodio/ácido cítrico	25 mM
Cloruro de sodio	125 mM
Polisorbato 80	0.02 % (p/v)
Agua para inyección	c.s.
pH	5.7

[00187] La solución de sustancia farmacológica de BAN2401 filtrada se cargó asépticamente en viales como se ilustra en la figura 17 (denominada en la figura 17 como "Formulación A"). La sustancia farmacológica combinada se sometió a una etapa de filtración para reducir la carga biológica a través de un filtro de 0.2 μ m. La filtración estéril final se realizó a través de dos filtros de 0.2 μ m en serie y se realizaron pruebas de integridad del filtro antes y después de la filtración. El producto farmacológico a granel estéril se cargó asépticamente en viales. Durante la operación de llenado, la precisión del llenado se confirmó midiendo el peso de llenado del vial. Los viales llenos se taparon y a continuación se sellaron con un sobresello de aluminio. Después de tapar a presión, el producto se almacenó a 5 ± 3 °C.

25 **[00188]** Los viales se analizaron usando el Método 1
 (oscurecimiento de luz) según el estándar USP 788. Los
 resultados se muestran en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11. Distribución del tamaño de partícula (partículas/recipiente) para viales de inyección de 10 mg/ml

[illegible]

2	-	-	-	16	-	-		-	-	-	-		-	-	-
μm				64											

Ejemplo 7: Preparación de formulaciones intravenosas (IV) y subcutáneas (SC) de BAN2401

A. Formulaciones de 100 mg/ml de BAN2401

[00189] Se fabricó una formulación de 100 mg/ml de BAN2401 ("inyección de 100 mg/ml") mediante un proceso aséptico de cGMP convencional para la preparación de una formulación acuosa estéril. Se produjeron 100 mg/ml de BAN2401 a partir de las sustancias farmacológicas de BAN2401 correspondientes sin adición de ningún excipiente ni dilución (Tabla 13).

Tabla 13. Formulación IV de 100 mg/ml de ejemplo que comprende BAN2401.

componente	composición
BAN2401	100 mg/ml
Tampón de ácido cítrico	50 mM
Arginina	110 mM
Clorhidrato de arginina	240 mM
Polisorbato 80	0.05 % (p/v)
Agua para inyección	c.s.
pH	5.0

[00190] La solución de sustancia farmacológica de BAN2401 filtrada (inyección de 100 mg/ml) se cargó asépticamente en viales como se ilustra en la figura 18 (denominada en la figura 18 como "Formulación B"). La

sustancia farmacológica se sometió a una etapa de filtración para reducir la carga biológica a través de un filtro de 0.2 μm . La filtración estéril final se realizó a través de dos filtros de 0.2 μm en serie y se realizaron pruebas de integridad del filtro antes y después de la filtración. El producto farmacológico a granel estéril se cargó asépticamente en viales. Durante la operación de llenado, la precisión del llenado se confirmó midiendo el peso de llenado del vial. Los viales llenos se taparon y a continuación se sellaron con un sobresello de aluminio. Después de tapar a presión, el producto se almacenó a 5 ± 3 °C.

[00191] Los viales se analizaron usando el Método 1 (oscurecimiento de luz) según el estándar USP 788. Los resultados se muestran en las Tablas 14 y 15.

Tabla 14. Distribución del tamaño de partícula (partículas/vial) para viales de inyección de 100 mg/ml

N.° de lote	B1	B2	B3	B4
25 μm	0	0	1	0
10 μm	53	8	9	9
5 μm	631	72	51	60
2 μm	1954	321	249	267

Tabla 15. Distribución del tamaño de partícula (partículas/ml) para viales de inyección de 100 mg/ml

N.° de lote	B1	B2	B3	B4
25 μm	0	0	0.2	0
10 μm	10.6	1.6	1.8	1.8
5 μm	126.2	14.4	10.2	12

2 μ m	390.8	64.2	49.8	53.4
-----------	-------	------	------	------

[00192] Se fabricó otra inyección de 100 mg/ml de BAN2401. Los siguientes materiales se pueden usar en una formulación SC de ejemplo que contiene 100 mg/ml de BAN2401, como se muestra en la Tabla 16.

Tabla 16. Otra formulación IV de 100 mg/ml de ejemplo que comprende BAN2401.

componente	composición
BAN2401	100 mg/ml
Histidina	25 mM en total
HCl de histidina	
HCl de arginina	200 mM
Polisorbato 80	0.05 % (p/v)
Agua para inyección	c.s.
pH	5.0 $\pm$ 0.4

B. Formulación de 200 mg/ml de BAN2401

[00193] Los siguientes materiales se pueden usar en una formulación SC de ejemplo que contiene 200 mg/ml de BAN2401, como se muestra en la Tabla 17. La estabilidad de BAN2401 en estas formulaciones (FSC1, FSC2 y FSC3) se evaluó junto con una evaluación de la estabilidad del material en tres cierres de recipiente:

i) Jeringa precargada (PFS, por sus siglas en inglés) de vidrio Becton-Dickenson Hypak Biotech y tapón

ii) PFS de plástico West Crystal Zenith y tapón

iii) Vial de vidrio West de 5 ml y tapón

Tabla 17. Formulaciones SC de 200 mg/ml de ejemplo que comprenden BAN2401.

componente	composición				
ID de muestra	FSC1a	FSC1b	FSC2	FSC3	FSC4
BAN2401	200 mg/ml 1	200 mg/ml 1	200 mg/ml 1	200 mg/ml 1	200 mg/ml 1
Histidina HCl de histidina	50 mM en total ¹	50 mM en total ¹	50 mM en total ¹	--	25 mM en total ¹
Ácido cítrico	--	--	--	50 mM	--
HCl de arginina	125 mM	125 mM	125 mM	125 mM	200 mM
Polisorbato 80	0.02 % (p/v)	0.02 % (p/v)	0.02 % (p/v)	0.02 % (p/v)	0.05 % (p/v)
Metionina	--	5 mM	--	--	--
Agua para inyección	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.	c.s.
pH	5.0 ± 0.4	5.0 ± 0.4	5.5 ± 0.4	5.0 ± 0.4	5.0 ± 0.4

¹ Concentración total como histidina

[00194] Se preparó BAN2401 a una concentración de proteína diana de 200 mg/ml mediante TFF como se resume a continuación. Se realizó una operación TFF separada para preparar material de BAN2401 en cada tampón de formulación, excepto para FSC1a y FSC1b. Para dos de las formulaciones,

se realizó una operación TFF y el material concentrado resultante se dividió en dos semilotes. Una pequeña cantidad de material filtrado estéril en cada tampón de formulación final no se cargó en el tiempo cero, sino que se almacenó congelada a -20 °C para llenar los cierres de recipiente apropiados para la prueba con jeringa.

(a)**Preparación de BAN2401**

[00195] El proceso de concentración/diafiltración de proteína mediante TFF se puede subdividir en 3 etapas:

1. Concentración del material a 100-150 mg/ml
2. Diafiltración (5 veces) frente al tampón de formulación
3. Concentración a >200 mg/ml

[00196] La etapa de concentración/diafiltración se realizó usando un sistema Pall Centramate LV instalado con 0.02 m² de área de membrana. El material de BAN2401 (extraído de la fabricación de lotes GMP antes de la adición de PS80) se cargó en el sistema TFF y se realizó una concentración de 10-15 veces (etapa 1). A continuación, el material se diafiltró frente a hasta 5 diavolúmenes del tampón de formulación (etapa 2), realizándose controles de pH y conductividad del permeado para controlar la diafiltración. Después de la diafiltración, el material se concentró aún más hasta la concentración de proteína diana de 210 a 250 mg/ml (etapa 3). Se recogió el retenido y se tomaron muestras para determinar la concentración de proteína.

[00197] En la preparación de esta formulación, no se alcanzó la concentración de proteína diana de 210 a 250 mg/ml debido a la alta presión en el sistema TFF. Por lo tanto, la

concentración de proteína diana se logró mediante el uso de unidades de filtro centrífugas Millipore de 1 gal (30,000 MWCO). Para realizar esta etapa de concentración, las unidades de filtro se equilibraron con el tampón de formulación de BAN2401, seguido de la centrifugación del material de BAN2401 a 3600 RPM (~3000 x g) durante intervalos de 30 minutos a 20 °C, hasta que se esperó que la concentración de proteína en el retenido fuera superior a 200 mg/ml. El retenido se recuperó de las unidades de filtro y se combinó. Después de mezclar a fondo, se tomaron muestras del retenido combinado para medir la concentración de proteína.

[00198] Después de concentrar la proteína, se tomó una muestra del grupo y se diluyó 500 veces con el tampón de formulación apropiado. La absorbancia de la muestra diluida a 280 nm y 320 nm se midió frente al blanco de tampón. El ajuste final de la concentración de proteína se realizó mediante dilución con el tampón de formulación apropiado. Por último, se añadió una solución al 10 % de PS80 al BAN2401 para lograr un PS80 al 0.02 % en la solución final, y la solución de proteína se mezcló a fondo mediante rotación de tipo noria.

[00199] El material final formulado con BAN2401 se filtró usando filtros de jeringa de 0.2 µm y posteriormente se cargó en viales o PFS. Esta etapa se realizó asépticamente en una cabina de bioseguridad. Los viales o PFS resultantes se colocaron en un congelador a -20 °C. Los viales se almacenaron invertidos y las PFS se almacenaron horizontalmente para simular las peores condiciones.

**C. Experimentos de estabilidad en formulaciones
SC de 200 mg/ml de ejemplo que comprenden BAN2401.**

[00200] La estabilidad de la muestra se evaluó a 5 °C (3M, 6M, 9M, 12M) y a 25 °C (1M, 3M) usando un ensayo de pH (figuras 19-21), absorbancia a 405 nm (figuras 22-24) (para detectar aumentos en el amarillamiento), cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) (figuras 25-33), y a 5 °C posteriormente. Véase la Tabla 17 para las formulaciones FSC1-FSC4 de ejemplo; cabe apreciar que en las figuras 19-33, "Fla" se refiere a FSC1a, "Flb" se refiere a FSC1b, "F2" se refiere a FSC2 y "F3" se refiere a FSC3. Se realizaron ensayos de caracterización adicionales, incluida la concentración de proteína, calorimetría diferencial de barrido (DSC, por sus siglas en inglés), PS80 y osmolalidad en muestras de t = 0. Se realizaron pruebas de partículas subvisibles en muestras de t = 0 y t = 6 meses. Se realizó un estudio de agitación de 3 días en muestras almacenadas durante 1 mes a 5 °C. Las muestras para el estudio de agitación se transfirieron del almacenamiento a 5 °C después de 1 mes a 25 °C con agitación durante 3 días a 250 rpm.

[00201] Los resultados de las pruebas mostraron que 200 mg/ml de BAN2401 en todas las formulaciones de FSC1a-FSC3 tenían niveles similares de agregados y fragmentos después del almacenamiento a 2-8 °C durante 12 meses. Se evaluó la estabilidad de BAN2401 a 200 mg/ml en las tres formulaciones FSC1a-FSC3. En general, la estabilidad de BAN2401 en cada formulación ensayada pareció similar y se mantuvo en más del 98.2 % de monómero después del almacenamiento a 5 °C durante 12 meses, independientemente del cierre del recipiente ensayado. Además, después del

almacenamiento a 5 °C durante 12 meses, el pH se mantuvo estable, no hubo un aumento apreciable del amarillamiento por A405.

(a) **Concentración de proteína**

5 (Muestras de T = 0)

[00202] La concentración de proteína se midió usando un espectrofotómetro UV-Vis. Los resultados se enumeran en la Tabla 18.

Tabla 18. Resultados de la concentración de proteína

10	<table><tr><th>ID de muestra</th><th>Concentración de proteína (mg/ml)</th></tr><tr><td>FSC1a</td><td>206</td></tr><tr><td>FSC1b</td><td>204</td></tr><tr><td>FSC2</td><td>201</td></tr><tr><td>FSC3</td><td>189</td></tr></table>	ID de muestra	Concentración de proteína (mg/ml)	FSC1a	206	FSC1b	204	FSC2	201	FSC3	189
ID de muestra	Concentración de proteína (mg/ml)										
FSC1a	206										
FSC1b	204										
FSC2	201										
FSC3	189										
15											

[00203] La concentración de proteína se evaluó midiendo la absorbancia a 280 y 320 nm en un espectrofotómetro Beckman DU-800 utilizando una cubeta de cuarzo de 1 cm. Las muestras se diluyeron 500 veces y se prepararon por triplicado. La concentración de proteína se calculó usando un coeficiente de extinción, ϵ , de 1.32 usando la siguiente fórmula:

25 Concentración = $(A_{280} - A_{320}) / \epsilon \times \text{Factor de dilución}$

(b) **Polisorbato 80 (Muestras de T = 0)**

[00204] El contenido de PS80 de las muestras se midió mediante la cuantificación de ácido oleico. Los resultados se muestran en la Tabla 19.

30

Tabla 19. Resultados de polisorbato 80

ID de muestra	Polisorbato 80 (%)
FSC1a	0.016
FSC1b	0.022
FSC2	0.019
FSC3	0.019

[00205] La medición se realizó por cuantificación de ácido oleico, un producto de hidrólisis de PS80. Usando hidrólisis básica, PS80 libera ácido oleico en una relación molar de 1:1. A continuación, el ácido oleico se puede separar de otros productos y matrices de hidrólisis de PS80 mediante HPLC de fase inversa. El ácido oleico se controló sin derivatización usando la absorbancia a 195 nm. [J. Chromatography B, 878 (2010) 1865- 1870]. Experimentalmente, las muestras se mezclaron con hidróxido de sodio para liberar ácido oleico, que posteriormente se extrajo con acetonitrilo. El extracto se diluyó con una solución de fosfato de potasio y se inyectó un volumen de muestra de 100 µl en una columna Waters Symmetry C18. La separación se realizó mediante una elución isocrática que contenía un 80 % de fase orgánica A (acetonitrilo) y un 20 % de fase acuosa B (fosfato de potasio monobásico 20 mM, pH 2.8). La concentración de PS80 en la muestra se calculó a partir del área máxima usando una curva estándar.

(c) Osmolalidad (Muestras de T = 0)

[00206] La osmolalidad de las muestras se determinó usando un osmómetro de punto de congelación. Los resultados se muestran en la Tabla 20.

Tabla 20. Resultados de osmolalidad

5

ID de muestra	Osmolalidad (mOsmol/kg de H ₂ O)
FSC1a	294
FSC1b	309
FSC2	297
FSC3	327

10

15

[00207] La osmolalidad se midió usando un osmómetro de punto de congelación Osmette III de Precision Systems. Las muestras se diluyeron 3 veces con WFI y se extrajeron volúmenes de muestra diluida de 10 µl y se cargaron en el instrumento usando la pipeta del osmómetro. Las medidas de osmolalidad resultantes se corrigieron para la dilución de las muestras.

20

(d)**Partículas subvisibles**

25

[00208] El análisis de partículas subvisibles se realizó usando un instrumento FlowCarn de Fluid Technologies. Los resultados de T = 0 se enumeran en la Tabla 21. Parece haber un aumento en la concentración total de partículas y el número de partículas de más de 10 µm en el tiempo cuando el material se almacena a 5 °C. El grado del aumento del cambio fue pequeño en el siguiente orden, FSC1a < FSC1b < FSC2 < FSC3.

30

Tabla 21. Resultados de partículas subvisibles

ID de muestra	Partículas/ml en total	Partículas/ml $\geq 10 \mu\text{m}$	Partículas/ml $\geq 25 \mu\text{m}$
FSC1a	1.2×10^4	9	0
FSC1b	2.6×10^4	0	0
FSC2	2.8×10^4	18	0
FSC3	3.9×10^4	63	0

[00209] El análisis de partículas subvisibles se realizó usando una FlowCam de Fluid Imaging Technologies con un objetivo de 20x y una celda de flujo de 50 μm . Antes de analizar muestras de BAN2401, la celda de flujo se lavó abundantemente con dI de H_2O y se realizó una medición en dI H_2O para garantizar que la celda de flujo estuviera limpia. Si el número total de partículas contadas por 0.2 ml de dI H_2O era ≤ 2 , la celda de flujo se consideraba lista para usar. Las muestras se equilibraron a temperatura ambiente y a continuación se diluyeron 20 veces con agua desionizada. Las muestras diluidas por duplicado se analizaron usando un volumen de muestra de 0.2 ml y un caudal de muestra de 0.02 ml/min. La tasa de autoimagen fue de 14, lo que da una eficiencia del 19.6 % y un tiempo de análisis de 10 min. Las concentraciones de partículas resultantes se corrigieron para determinar la dilución de las muestras.

(e)**pH**

[00210] Se controló el pH de cada formulación durante todo el ensayo de estabilidad. Como se muestra en las figuras 19-21, no se observó ningún cambio aparente para las muestras en ninguna de las condiciones de almacenamiento ensayadas.

(f)**HPLC-SEC**

[00211] El análisis de cromatografía líquida de alto rendimiento-cromatografía de exclusión por tamaño (HPLC-SEC) se realizó utilizando una columna TSK 03000 SWXL con fosfato de sodio 0.2 M, fase móvil a pH 7.0 a un caudal de 1.0 ml/min. El volumen de inyección de muestra fue de 0.8 µl para una concentración de proteína de 200 mg/ml. Esto garantiza que se inyecten aproximadamente 150 µg de proteína en la columna durante todo el estudio. Se indicaron los resultados de las áreas máximas relativas (%) para el monómero, el agregado y el fragmento, como se muestra en las figuras 25-33.

[00212] La degradación física del BAN2401 se evaluó realizando un análisis por HPLC-SEC en las muestras de estabilidad almacenadas a 5 y 25 °C. Después del almacenamiento a 5 °C durante 12 meses, el porcentaje de agregado fue similar para las 3 formulaciones, a razón de aproximadamente el 1.1 %. El fragmento porcentual generado para todas las formulaciones ensayadas estuvo en el intervalo del 0.4-0.5 %. El contenido de monómero después de 12 meses de almacenamiento a 5 °C estuvo en el intervalo del 98.4-98.6 % para todas las formulaciones y cierres de recipientes ensayados. Con las tasas actuales de degradación, es posible que BAN2401 en todas las formulaciones ensayadas pueda tener más del 97 % de monómero después de un almacenamiento de hasta 24 meses a 5 °C.

[00213] Después del almacenamiento a 25 °C hasta 3 meses, la generación de fragmentos después de 3 meses estuvo en el intervalo del 0.4-0.8 %. El contenido de monómero fue ligeramente superior al 98 % para todas las formulaciones, excepto FSC3, que tenía ligeramente menos del 98 % de monómero después de 3 meses a 25 °C.

Ejemplo 8: Selección de concentraciones de proteína, arginina y polisorbato 80

A. Preparación de las muestras

[00214] Cada formulación candidata (F1-F12) se preparó de la siguiente manera. El intermedio de proceso de la sustancia farmacológica (DS, por siglas en inglés)—se concentró y se equilibró con los tampones de formulación correspondientes (Tabla 22) mediante unidades de filtro centrífugas. Después de la concentración y el equilibrio, se añadió PS80 disuelto en el tampón de formulación para lograr concentraciones predeterminadas y las concentraciones de proteína se ajustaron a la concentración final. Cada formulación candidata se cargó en viales con un volumen de llenado de 0.5 ml. Las formulaciones candidatas (F1-F12) se muestran en la Tabla 22. La formulación F0 se evaluó como control.

Tabla 22 Formulación (F0) y formulaciones candidatas F1-F12

N.° de for m.	BAN240 1	Tampón	Estabilizad or (arginina)	Polisorbat o 80	pH	Volu men de
---------------	-------------	--------	---------------------------------	--------------------	----	-------------------

									llen ado
	mg/ml	mmol/l	mg/m l	mmol/ l	mg/m l	% (p/v)	mg/m l		ml
5	F0	100	Citrato 50	9.6	350	61.0	0.05	0.5	5/0. 5 ^b
	F1	200	Histidi na 25	3.9	150	26.1	0.05	0.5	5. 0
10	F2 ^a	200	Histidi na 25	3.9	200	34.8	0.05	0.5	5. 0
	F3	200	Histidi na 25	3.9	250	43.6	0.05	0.5	5. 0
15	F4	200	Histidi na 25	3.9	300	52.3	0.05	0.5	5. 0
	F5	200	Histidi na 25	3.9	350	61.0	0.05	0.5	5. 0
	F6	250	Histidi na 25	3.9	200	34.8	0.05	0.5	5. 0
20	F7	300	Histidi na 25	3.9	200	34.8	0.05	0.5	5. 0
	F8	200	Histidi na 25	3.9	200	34.8	0	0	5. 0
25	F9	200	Histidi na 25	3.9	200	34.8	0.02	0.2	5. 0
	F10 ^a	200	Histidi na 25	3.9	200	34.8	0.05	0.5	5. 0
30	F11	200	Histidi na 25	3.9	200	34.8	0.08	0.8	5. 0

F12	200	Histidina 25	3.9	200	34.8	0.10	1.0	5.0	0.5
-----	-----	--------------	-----	-----	------	------	-----	-----	-----

a: F2 y F10 son las mismas formulaciones, preparadas para diferentes estudios.

5 b: En la selección de la concentración de polisorbato 80, la solución farmacológica se extrajo del producto farmacológico y se llenó con 0.5 ml para alinear el volumen de llenado y el sistema de cierre de recipiente.

10 B. Protocolo de estabilidad

[00215] Los protocolos de estabilidad se muestran en la Tabla 23, Tabla 24 y Tabla 25. Una vez retirados del almacenamiento, los viales se almacenaron a 5 °C hasta las pruebas. Las condiciones de almacenamiento fueron las
15 siguientes:

- Condición a largo plazo: almacenados a 5 °C ± 3 °C en vertical
- Condición acelerada: Almacenados a 25 °C ± 2 °C, 60 % de HR ± 5 % de HR en vertical
- 20 • Condición estresada (congelación-descongelación): Congelados a -30 °C y descongelados a temperatura ambiente, en vertical
- Condición estresada (agitación): 5 °C, tumbados, en horizontal, a 250 rpm en un agitador
25 alternativo con una amplitud de agitación de 50 mm

Tabla 23 Protocolo de Estabilidad (Condición acelerada y a largo plazo)

Elemento de prueba	Punto de prueba			
	Inicial	5 °C ± 3 °C en vertical	25 °C ± 2 °C, 60 % de HR ± 5 % de HR en vertical	
		3M	1M	3M
Aspecto	F0-F7	F0-F7	F0-F7	F0-F7
pH	F0-F7	F0-F7	F0-F7	F0-F7
HPLC de exclusión por tamaño	F0-F7	F0-F7	F0-F7	F0-F7
HPLC de intercambio iónico	F0-F7	F0-F7	ND	F0-F7
Polisorbato 80	F0-F7	F0-F7	F0-F7	F0-F7

N/A: No aplicable.

Tabla 24 Protocolo de estabilidad (Condición estresada: F0-F7)

Elemento de prueba	Punto de prueba	
	Inicial	Congelación-descongelación (-30 °C a temperatura ambiente)
		3 ciclos
Aspecto	F0-F7	F6-F7
pH	F0-F7	F0-F7

5 10	HPLC de exclusión por tamaño	F0-F7	F0-F7
	HPLC de intercambio iónico	F0-F7	F0-F7
	Polisorbato 80	F0-F7	ND
	Concentración de proteína	F0-F7	ND
	Viscosidad	F0-F7	ND
	Osmolalidad	F0-F7	ND

N/A: No aplicable.

15 **Tabla 25 Protocolo de estabilidad (Condición estresada: F0, F8-F12)**

20 25 30	Elemento de prueba	Punto de prueba	
		Inicia l	Congelación-descongelación (-30 °C a temperatura ambiente)
		3 ciclos	3 días
	Aspecto	F0, F8-F12	F0, F8-F12
	pH	F0, F8-F12	F0, F8-F12
	Concentración de proteína	F0, F8-F12	F0, F8-F12

5	Materia extraña insoluble (partículas visibles)	F0, F8-F12	F0, F8-F12	F0, F8-F12
	HPLC de exclusión por tamaño (SEC)	F0, F8-F12	F0, F8-F12	F0, F8-F12
10	Polisorbato 80 (PS80)	F0, F9-F12	F0, F9-F12	F0, F9-F12
	Imágenes de microflujo (MFI)	F0, F8-F12	F0, F8-F12	F0, F8-F12

N/A: No aplicable.

15

[00216] Dado que se sabe que la viscosidad de la solución aumenta exponencialmente en soluciones de proteína altamente concentradas, la concentración de proteína de cada formulación candidata (F1-F5) se ajustó a 200 ± 10 mg/ml con tampón de formulación que contenía PS80 al 0.05 % (p/v) para el análisis. Otras formulaciones no se diluyeron antes de la medición.

20

C. Resultados y análisis

(a) Selección de la concentración de arginina

25

[00217] Para seleccionar la concentración de arginina diana en la formulación, se evaluaron las propiedades físicas y se realizaron estudios de congelación-descongelación, de estabilidad a largo plazo y acelerada para formulaciones candidatas con diferente concentración de arginina (150 a

30

350 mmol/l, F1 a F5) y en comparación con la formulación F0 (véase la Tabla 22). Las propiedades físicas y los resultados del estudio de congelación-descongelación se muestran en la Tabla 26. Los resultados del estudio de estabilidad a largo
5 plazo y acelerada se muestran en la Tabla 27 y la Tabla 28.

10

15

20

25

30

Tabla 26: Resultados de las propiedades físicas y el estudio de estabilidad de congelación-descongelación para el producto farmacológico de BAN2401 (F0-F5)

Elemento de prueba	Criterio de aceptación	F0 (Control)	F1 Arg 150 mM	F2 Arg 200 mM	F3 Arg 250 mM	F4 Arg 300 mM	F5 Arg 350 mM
		Iniciación	Congelación-descongelación (3 ciclos)	Iniciación	Congelación-descongelación (3 ciclos)	Iniciación	Congelación-descongelación (3 ciclos)
Aspecto	Informe de resultado	CSYL	NP	CSYL	NP	CSYL	NP

[illegible]

5 10	HPLC de intercambio iónico	Informe de resultado												
		Pico principal	67.2%	67.2%	67.1%	70.6%	70.4%	70.7%	67.6%	67.9%	70.1%	67.3%	70.7%	70.5%
		Pico ácido	27.3%	27.1%	24.5%	23.3%	23.2%	23.1%	24.1%	24.2%	23.5%	24.6%	23.1%	23.5%
		Pico básico	5.4%	5.7%	8.4%	6.2%	6.4%	6.2%	8.3%	7.9%	6.3%	8.1%	6.3%	6.1%
15	Polisorbato 80	Informe de resultado	0.053%	ND	0.054%	ND	0.052%	ND	0.050%	ND	0.037%	ND	0.052%	ND

		(% p/v)												
5	Concentración de proteína	Informe de resultado (mg/ml)	103	ND	224	ND	222	ND	213	ND	207	ND	217	ND
10	Viscosidad ^a	Informe de resultado (cP)	2.6	ND	7.3	ND	7.8	ND	8.0	ND	8.1	ND	8.0	ND
15		Conc. de proteína	ND	ND	204	ND	210	ND	203	ND	200	ND	199	ND

	(mg/ml)												
Osmolalidad	Informe de resultado (mOsm/kg)	506	ND	367	ND	455	ND	533	ND	615	ND	691	ND

10 mM: mmol/l, CSYL: Líquido transparente de color ligeramente amarillo, Arg: Arginina, NP: No programado.

a: La concentración de proteína se ajustó antes de la medición de la viscosidad (F1-F5).

Tabla 27 Resultados del estudio de estabilidad para el producto farmacológico de BAN2401 (F0-F7) almacenado a 5 ± 3 °C, en posición vertical

Elemento de prueba	Criterio de aceptación	F0		F1		F2		F3		F4		F5		F6		F7	
		Inicial	3M	Inicial	3M	Inicial	3M	Inicial	3M	Inicial	3M	Inicial	3M	Inicial	3M	Inicial	3M
Aspecto	Informe de resultado	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL
pH	Informe de resultado	5.00	4.95	4.89	4.85	4.90	4.85	4.90	4.85	4.90	4.85	4.93	4.86	4.88	4.82	4.85	4.81

[illegible]

5		Pico principal	67.2 %	66.0 %	67.1 %	69.0 %	70.4 %	69.4 %	67.6 %	69.0 %	70.1 %	69.9 %	70.7 %	71.0 %	71.1 %	69.5 %	71.2 %	70.1 %
		Pico ácido	27.3 %	26.7 %	24.5 %	23.6 %	23.2 %	23.9 %	24.1 %	24.2 %	23.5 %	23.2 %	23.1 %	22.5 %	22.7 %	23.6 %	22.8 %	23.1 %
		Pico básico	5.4 %	7.2 %	8.4 %	7.4 %	6.4 %	6.7 %	8.3 %	6.9 %	6.3 %	6.8 %	6.3 %	6.5 %	6.2 %	6.8 %	6.0 %	6.8 %
10	Polisorbato 80	Informe de resultado (% p/v)	0.053 %	0.056 %	0.054 %	0.057 %	0.052 %	0.055 %	0.050 %	0.054 %	0.037 %	0.055 %	0.052 %	0.052 %	0.056 %	0.055 %	0.051 %	0.052 %

CSYL: Líquido transparente de color ligeramente amarillo.

[illegible]

[illegible]

5		resul tado	67. 2%	NP	59	67	NP	63	70	NP	63	67	NP	63	70	NP	63	70	NP	63	71	NP	63	71	NP	63									
		Princ ipal			.6	.1		.0	.4		.1	.6		.1	.1		.3	.7		.9	.1		.0	.2		.1									
		Ácido			27. 3%	NP		33	24		NP	29		23	NP		29	24		NP	29		23	NP		29	23	NP	28	22	NP	29	22	NP	28
								.8	.5			.4		.2			.6	.1			.1		.5			.1	.1		.3	.7		.5	.8		.1
10		Básic o	5.4 %	NP	6. 6%	8. 4%	NP	7. 6%	6. 4%	NP	7. 4%	8. 3%	NP	7. 8%	6. 3%	NP	7. 5%	6. 3%	NP	7. 8%	6. 2%	NP	7. 5%	6. 0%	NP	8. 1%									
15	PS8 0	Infor me de resul tado (% p/v)	0.0 53%	0. 05 3%	0. 05 2%	0. 05 4%	0. 05 2%	0. 05 2%	0. 05 2%	0. 05 0%	0. 05 0%	0. 05 0%	0. 05 0%	0. 04 9%	0. 03 7%	0. 05 1%	0. 05 2%	0. 05 2%	0. 04 9%	0. 04 9%	0. 05 6%	0. 05 3%	0. 05 3%	0. 05 1%	0. 05 0%	0. 04 9%									

CSYL: Líquido transparente de color ligeramente amarillo, Ini: Inicial, SEC: HPLC de exclusión por tamaño, IEX: HPLC de intercambio iónico, PS80: Polisorbato 80, NP: No programado.

5

10

15

(b)**Propiedades físicas**

[00218] Como se muestra en la Tabla 26, los valores de osmolalidad aumentaron a medida que aumentaba la concentración de arginina. F1, F2 y F3 mostraron valores de osmolalidad más bajos en comparación con F4 y F5. Por lo tanto, la concentración de arginina se limitó a 250 mmol/l o menos. Los valores de viscosidad de F1-F5 estuvieron dentro de un intervalo estrecho (7.3-8.1 cP) y no se correlacionaron con la concentración de arginina dentro de 150 a 350 mmol/l. Los resultados de apariencia, pH y concentración de PS80 y proteína estuvieron casi en el objetivo.

(c)**Estudio de estabilidad de congelación-descongelación**

[00219] No se observaron cambios significativos en ninguno de los elementos de prueba después de tres ciclos de prueba de congelación-descongelación como se muestra en la Tabla 26.

(d) Estudio de estabilidad a largo plazo

[00220] Como se muestra en la Tabla 27, no se observaron cambios significativos en ninguno de los elementos de prueba, excepto por HPLC de exclusión por tamaño (SEC) después de tres meses de almacenamiento. Las cantidades de agregado y fragmento por SEC aumentaron ligeramente en las formulaciones candidatas F1-F5. Cada tasa de aumento fue similar a la formulación F0.

(e)**Estudio de estabilidad acelerada**

[00221] Como se muestra en la Tabla 28, no se observaron cambios significativos en ninguno de los elementos de prueba excepto por SEC y HPLC de exclusión

iónica (IEX). Aunque la cantidad de agregado por SEC aumentó en todos los candidatos (F1-F5, 200 mg/ml de BAN2401) y la tasa fue más rápida que en la formulación F0 como se esperaba, todos los candidatos se consideraron factibles considerando los resultados en condiciones a largo plazo y la estabilidad de F0 con una semivida larga. La mayor concentración de arginina dio como resultado una formación de agregados ligeramente más lenta, de acuerdo con los resultados descritos en el Ejemplo 4. La cantidad de fragmento por SEC también aumentó en todos los candidatos pero la tasa fue similar a la de la formulación F0. En cuanto a IEX, la cantidad de pico ácido aumentó en todos los candidatos pero la tasa fue similar a la de F0.

(f)**Concentración de arginina**

[00222] Como se muestra en la Tabla 26, F4 y F5 (a concentraciones de arginina de 300 y 350 mmol/l) no se consideraron factibles en vista de la osmolalidad. Entre los candidatos factibles F1, F2 y F3 (a concentraciones de arginina de 150, 200 y 250 mmol/l), F1 es el más cercano a la isotónica. Como se muestra en la Tabla 28, las formulaciones con concentraciones de arginina más altas mostraron una tasa de formación de agregados más baja en los estudios de estabilidad acelerada, pero la diferencia en la tasa no fue significativa en el intervalo de concentración de arginina evaluado. Tomando en consideración tanto la isotonicidad como la tasa de formación de agregados, se seleccionaron 200 mmol/l como la concentración de arginina diana basándose en la formulación F2.

(g)**Selección****de****la**

concentración de proteína

[00223] Para seleccionar la concentración de proteína diana en la formulación, se evaluaron las propiedades físicas y se realizaron estudios de congelación-descongelación, estabilidad a largo plazo y acelerada para formulaciones candidatas con diferente concentración de proteína (200 a 300 mg/ml, F2, F6, F7) y la formulación F0. Las propiedades físicas y los resultados del estudio de congelación-descongelación se muestran en la Tabla 29. Los resultados de los estudios de estabilidad a largo plazo y acelerada se muestran en la Tabla 27 y la Tabla 28.

Tabla 29 Resultados de las propiedades físicas y el estudio de estabilidad de congelación-descongelación para el producto farmacológico de BAN2401 (F0, F6 y F7)

Elemento de prueba	Criterio de aceptación	F0 ^a (Control)		F2 ^a 200 mg/ml de BAN2401		F6 250 mg/ml de BAN2401		F7 300 mg/ml de BAN2401	
		Inicial	Congelación-descongelación (3 ciclos)	Inicial	Congelación-descongelación (3 ciclos)	Inicial	Congelación-descongelación (3 ciclos)	Inicial	Congelación-descongelación (3 ciclos)
Aspecto	Informe de resultado	CSYL	NP	CSYL	NP	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL
pH	Informe de	5.00	5.01	4.90	4.90	4.88	4.83	4.85	4.86

		resulta do								
5	HPLC de exclusión por tamaño	Informe de resulta do								
		Monómer o	98.8%	98.8%	98.7%	98.7%	98.5%	98.5%	98.5%	98.4%
10		Agregad o	0.9%	0.9%	1.0%	1.0%	1.1%	1.1%	1.2%	1.2%
		Fragmen to	0.3%	0.3%	0.3%	0.3%	0.4%	0.4%	0.4%	0.4%
15	HPLC de intercambi o iónico	Informe de resulta do								

5		Pico principal	67.2%	67.2%	70.4%	70.7%	71.1%	71.2%	71.2%	71.4%
		Pico ácido	27.3%	27.1%	23.2%	23.1%	22.7%	22.6%	22.8%	22.5%
		Pico básico	5.4%	5.7%	6.4%	6.2%	6.2%	6.2%	6.0%	6.1%
10	Polisorbato 80	Informe de resultado (p/v (%))	0.053 %	NP	0.052%	NP	0.056 %	NP	0.051 %	NP
15	Concentración de proteína	Informe de resultado (mg/ml)	103	NP	222	NP	242	NP	299	NP

5	Viscosidad	Informe de resultado (cP)	2.6	NP	7.8 (210 mg/ml)	NP	21	NP	48	NP
10	Osmolalidad	Informe de resultado (mOsm/kg)	506	NP	455	NP	507	NP	554	NP

CSYL: Líquido transparente de color ligeramente amarillo, NP: No programado.

a: Los resultados son los mismos que en la Tabla 26.

(h)

Propiedades físicas

[00224] Como se muestra en la Tabla 29, F2 y F6 mostraron valores de osmolalidad más bajos en comparación con F7. Los valores de viscosidad en F2, F6 y F7 fueron 7.8, 21 y 48 cP, respectivamente. Una viscosidad alta superior a 20 cP provocaría dificultades en la fabricación de DS al aumentar la contrapresión de la bomba y disminuir el flujo transmembrana durante las etapas de ultrafiltración y diafiltración. Además, la solución de mayor concentración dificulta el proceso de llenado de DP al obstruir las agujas de llenado, lo que provoca una variación del peso de llenado. Dado que se informa que la viscosidad deseada no es superior a 20 cP³, F2 era factible. Los resultados de apariencia, pH y concentración de PS80 y proteína estuvieron casi en el objetivo.

(i)

Estudio de congelación-descongelación

[00225] No se observaron cambios significativos en ninguno de los elementos ensayados después de tres ciclos de prueba de congelación-descongelación como se muestra en la Tabla 29.

(j)

Estudio de estabilidad a largo plazo

[00226] Como se muestra en la Tabla 27, no se observaron cambios significativos distintos de la HPLC de exclusión por tamaño (SEC) después de tres meses de almacenamiento. La cantidad de agregado por SEC aumentó ligeramente en las formulaciones candidatas F2, F6 y F7, pero la tasa de aumento fue similar a la de F0.

**(k) Estudio de estabilidad
acelerada**

5 **[00227]** Como se muestra en la Tabla 28, no se
observaron cambios significativos distintos de la SEC y la
HPLC de exclusión iónica (IEX). La cantidad de agregado por
SEC aumentó en todos los candidatos (F2, F6 y F7) en tasas
similares en el punto temporal de tres meses (0.7-0.8 % de
aumento). Por lo tanto, todos los candidatos se consideraron
factibles. La cantidad de fragmento por SEC también aumentó
10 en todos los candidatos pero la tasa fue similar a la de F0.
En cuanto a IEX, la cantidad de pico ácido por IEX aumentó
en todos los candidatos pero la tasa fue similar a la de F0.

(l) Concentración de proteína

15 **[00228]** Teniendo en cuenta los resultados de
osmolalidad y viscosidad que se muestran en la Tabla 29, y
los resultados de estabilidad global que se muestran en la
Tabla 27 y la Tabla 28, se seleccionó una concentración de
proteína de 200 mg/ml.

**(m) Selección de la
concentración de PS80**

20 **[00229]** Para seleccionar la concentración de PS80
diana en la formulación, se realizaron estudios de
congelación-descongelación y agitación para formulaciones
candidatas con diferente concentración de PS80 [del 0 al
25 0.10 % (p/v), F8-F12] y la formulación F0. Los resultados
del estudio de congelación-descongelación y agitación se
muestran en la Tabla 30 y la Tabla 31, respectivamente.

		result ado												
5	pH	Inform e de result ado	4.98	4.98	4.85	4.86	4.85	4.86	4.85	4.86	4.85	4.86	4.85	4.85
10	Partícu las visible s	Inform e de result ado	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP
15	HPLC de exclusi ón por tamaño	Inform e de result ado												
		Monóme ro	98.3%	98.4%	98.0%	98.0%	98.0%	97.9%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%	98.0%

5		Agrega do	1.0%	1.0%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	1.1%	
		Fragme nto	0.7%	0.7%	0.9%	0.9%	0.9%	1.1%	0.9%	1.0%	0.9%	0.9%	0.9%	
10	Polisor bato 80	Inform e de result ado (% p/v)	0.051%	0.050%	<0.010 %	<0.010 %	0.020%	0.019%	0.051%	0.050%	0.083%	0.082%	0.106%	0.104%
15	Concent ración de proteín a	Inform e de result ado	105	104	187	187	190	187	190	190	187	189	190	191

		(mg/ml)												
5	MFI	Informe de resultado (unidad/ml)												
10		≥25 μm	1	0	55	4	1	1	0	0	3	5	1	0
		10-25 μm	4	11	1065	83	14	11	5	8	3	14	8	5
		5-10 μm	27	73	1317	287	15	20	8	53	51	56	19	59
15		2-5 μm	150	308	2321	1172	43	80	50	339	174	304	47	358

CSYL: Líquido transparente de color ligeramente amarillo, FVP: Libre de partículas visibles.

Tabla 31 Resultados del estudio de agitación para el producto farmacológico de BAN2401 (F0, F8-F12)

Elemento de prueba	Criterio de aceptación	F0 (Control)		F8 PS80 0 % p/v		F9 PS80 0.02 % p/v		F10 PS80 0.05 % p/v		F11 PS80 0.08 % p/v		F12 PS80 0.10 % p/v	
		Inicial	Agitación a 250 rpm/3D	Inicial	Agitación a 250 rpm/3D	Inicial	Agitación a 250 rpm/3D	Inicial	Agitación a 250 rpm/3D	Inicial	Agitación a 250 rpm/3D	Inicial	Agitación a 250 rpm/3D
Aspecto	Informe de resultado	CSYL	CSYL	CSYL	OWL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL	CSYL
pH	Informe de	4.98	4.99	4.87	4.89	4.87	4.87	4.87	4.88	4.88	4.87	4.88	4.88

[illegible]

5

$\geq 25 \mu\text{m}$	1	3	24	NE ^a	3	1	0	0	1	0	0	1
10- 25 μm	4	10	555	NE ^a	4	5	3	5	3	6	3	6
5-10 μm	27	27	1242	NE ^a	25	22	18	45	67	34	28	27
2-5 μm	150	75	3209	NE ^a	62	50	67	176	145	335	182	250

CSYL: Líquido transparente de color ligeramente amarillo, OWL: Líquido de color blanco opalescente, FVP: Libre de partículas visibles, NE: No ensayado.

10

a: Los resultados no se informan ya que las partículas no se pudieron medir correctamente debido a la contaminación por burbujas debido a un volumen de muestra insuficiente.

15

(n) **Estudio de congelación-descongelación**

5 [00230] Como se muestra en la Tabla 30, no se observaron cambios significativos en ninguno de los elementos ensayados después de tres ciclos de prueba de congelación-descongelación. Los recuentos de partículas por MFI fueron relativamente altos en F8 (sin PS80).

(o) **Estudio de agitación**

10 [00231] Como se muestra en la Tabla 31, las formulaciones que contenían del 0.02 % (p/v) al 0.10 % (p/v) de PS80 (F9 a F12) eran estables después de la agitación. Se observaron cambios en F8 (sin PS80) en apariencia, concentración de proteína y cantidad de agregado por SEC después de la agitación. La apariencia cambió de líquido
15 transparente ligeramente amarillo a líquido de color blanco opalescente. La concentración de proteína disminuyó ligeramente de 206 a 195 mg/ml. La cantidad de agregado aumentó del 1.1 % al 3.8 %. Por lo tanto, F8 (sin PS80) no se consideró factible.

20 (p) **Concentración de PS80**

[00232] Basándose en los resultados que se muestran en la Tabla 30 (estudio de congelación-descongelación) y la Tabla 31 (estudio de agitación), las formulaciones que contenían del 0.02 % (p/v) al 0.10 % (p/v) de PS80 fueron
25 estables después de tres ciclos de congelación-descongelación y agitación hasta tres días. Por lo tanto, se seleccionó como objetivo una concentración de PS80 del 0.05 % (p/v).

(q) **Conclusión**

[00233] En conclusión, se seleccionó la siguiente formulación para la formulación de BAN2401 para estudios posteriores.

Tabla 32 Formulación para estudios posteriores

N.º de formula ción	BAN240 1	Tampón		Estabilizado r (arginina)		Polisorbat o 80		pH
	mg/ml	mmol/l	mg/m l	mmol/ l	mg/ml	% (p/v)	mg/m l	
F2	200	Histidi na 25	3.9	200	34.8	0.05	0.5	5.0

Ejemplo 9: Estudio de estabilidad para formulaciones de 200 mg/ml de BAN2401 con pH diferente

[00234] Se realizó un estudio de estabilidad para ensayar la estabilidad de las formulaciones de BAN2401 a 200 mg/ml con diferentes pH. Además, se ensayó el impacto de la adición de metionina en la estabilidad del producto farmacológico (DP).

A. Preparación de las muestras

[00235] Cada formulación candidata (Tabla 33) se preparó de la siguiente manera. Las formulaciones se equilibraron con el tampón de formulación correspondiente mediante unidades de filtro centrífugas. Solo para la preparación de F20, se usó un tampón de formulación a un pH de 3.5 hasta que el pH de la solución filtrada llegó a 4.0, ya que los protones son repelidos por la proteína cargada concentrada cerca de la membrana semipermeable, lo que se conoce como efecto Donnan. Después de la concentración y el equilibrio, se añadió PS80 disuelto en el tampón de formulación para lograr la concentración predeterminada y a continuación se ajustó la concentración de proteína a la concentración final. Cada formulación candidata se cargó en viales con un volumen de llenado de 0.5 ml. La formulación F0 (véase la Tabla 33) se evaluó como control.

Tabla 33 Composición de la sustancia farmacológica y las formulaciones SC candidatas

N.º	BAN2401	Tampón	Estabilizador	Polisorbato 80	pH	Volumen de
	1				a	

									llenado
									ml/Vial
5		mg/ml	mmol/l	mg/ml	mmol/l	mg/ml	% (p/v)	mg/ml	
	F0	100	Citrato 50	9.6	Arg 350	61.0	0.05	0.5	5.0
	F13	200	Histidina 25	3.9	Arg 200	34.8	0.05	0.5	4.5
10	F15	200	Histidina 25	3.9	Arg 200	34.8	0.05	0.5	5.0
	F17	200	Histidina 25	3.9	Arg 200	34.8	0.05	0.5	5.5
15	F18	200	Histidina 25	3.9	Arg 200 Met 10	34.8 1.5	0.05	0.5	5.0
	F20	200	Histidina 25	3.9	Arg 200	34.8	0.05	0.5	4.0
20	F21 ^b	200	Histidina 25	3.9	Arg 200	34.8	0.05	0.5	5.0
	F22	200	Histidina 25	3.9	Arg 200	34.8	0.05	0.5	6.0

Arg: Arginina, Met: Metionina

- 25 a: Para ajustar el pH, se combinaron arginina y clorhidrato de arginina para F0 y se añadió clorhidrato para F13 a F22.
b: F21 es la misma formulación que F15

B. Protocolo de almacenamiento

[00236] Los protocolos de almacenamiento se muestran en la Tabla 34, Tabla 35 y Tabla 36. Una vez retirados del almacenamiento, los viales se almacenaron a 5 °C hasta que comenzaron las pruebas. Las condiciones de almacenamiento son las siguientes:

- Condición a largo plazo: almacenados a 5 °C ± 3 °C en vertical
 - Condición acelerada: Almacenados a 25 °C ± 2 °C, 60 % de HR ± 5 % de HR en vertical
 - Condición estresada (congelación-descongelación): Congelados a -30 °C y descongelados a temperatura ambiente, en vertical
- 1000 lx: 25 °C ± 2 °C, 60 % de HR ± 5 % de HR, tumbados con exposición a la luz de 1000 lx
- Oscuridad: 25 °C ± 2 °C, 60 % de HR ± 5 % de HR, tumbados sin exposición a la luz cubriéndolos con papel de aluminio

[00237] Para confirmar el nivel de agregado después de un almacenamiento de tres meses o más, se evaluó adicionalmente la HPLC de exclusión por tamaño como muestras de almacenamiento prolongado a los nueve meses para el estudio de estabilidad a largo plazo y tres meses para la acelerada. Las últimas muestras se analizaron después de almacenarse en el frigorífico durante seis meses.

Tabla 34 Programa de muestreo para estudio de estabilidad a largo plazo (5 °C ± 3 °C, en vertical)

5		F13, F17			F0, F15, F18			F20, F21, F22	
		Inicial	5 °C		Inicial	5 °C		Inicial	5 °C
			2M	9M ^a		2M	9M ^a		
	Color	X	X	NE	X	X	NE	X	X
	Claridad	X	X	NE	X	X	NE	X	X
10	Partículas	X	X	NE	X	X	NE	X	X
	pH	X	X	NE	X	X	NE	X	X
	Conc. de proteína	X	X	NE	X	X	NE	X	X
15	ELISA	X	X	NE	X	X	NE	NE	NE
	FcR	X	X	NE	X	X	NE	NE	NE
	cSDS-R	X	X	NE	X	X	NE	NE	NE

cSDS-NR	X	X	NE	X	X	NE	NE	NE
SEC	X	X	X	X	X	X	X	X
IEX	X	X	NE	X	X	NE	X	X
Viscosidad	X	NE	NE	X	NE	NE	X	NE
Osmolalidad	X	NE	NE	X	NE	NE	X	NE
PS80	X	X	NE	X	X	NE	X	X
MFI	X	X	NE	X	X	NE	X	NE
PMAP-R	NE	NE	NE	X	X	NE	NE	NE

X: Realizado, NE: No ensayado

Color: Grado de coloración de los líquidos, Claridad: Claridad y grado de opalescencia,
 Con. de proteína: Concentración de proteína, ELISA: ELISA de unión a antígeno, FcR: Ensayo
 de unión (CD32a), cSDS: Electroforesis capilar en gel con SDS R: Reducida, NR: No reducida,
 SEC: HPLC de exclusión por tamaño, IEX: HPLC de intercambio iónico, PS80: Contenido de
 polisorbato 80, MFI: Imágenes de microflujo, PMAP: Mapa de péptidos
 a: Evaluación extendida

Tabla 35 Programa de muestreo para estudio de estabilidad acelerada (25 °C ± 2 °C, 60 % de HR ± 5 % de HR, en vertical)

5	Elementos de prueba	F13, F17			F0. F15, F18			F20, F21, F22		
		Inicia l	25 °C		Inicia l	25 °C		Inicia l	25 °C	
			1M, 2M	Ex		1M	2M	Ex	1M	3M
10	Color	X	X	NE	X	X	X	NE	X	X
	Claridad	X	X	NE	X	X	X	NE	X	X
	Partículas	X	X	NE	X	X	X	NE	X	X
15	pH	X	X	NE	X	X	X	NE	X	X
	Conc. de proteína	X	X	NE	X	X	X	NE	X	X
	ELISA	X	X	NE	X	X	X	NE	NE	NE

	FcR	X	X	NE	X	X	X	NE	NE	NE	NE
	cSDS-R	X	X	NE	X	X	X	NE	NE	NE	NE
	cSDS-NR	X	X	NE	X	X	X	NE	NE	NE	NE
	SEC	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
5	IEX	X	X	NE	X	X	X	NE	X	X	X
	Viscosidad	X	NE	NE	X	NE	NE	NE	X	NE	NE
	Osmolalidad	X	NE	NE	X	NE	NE	NE	X	NE	NE
10	PS80	X	X	NE	X	X	X	NE	X	X	X
	MFI	X	X	NE	X	X	X	NE	X	X	NE
	PMAP-R	NE	NE	NE	X	NE	X	NE	NE	NE	NE

Ex: Evaluación extendida, almacenamiento durante 3M a 25 °C y durante 6M a 5 °C después de la extracción de la muestra

X: Realizado, NE: No ensayado

Color: Grado de coloración de los líquidos, Claridad: Claridad y grado de opalescencia, Con. de proteína: Concentración de proteína, ELISA: ELISA de unión a antígeno, FcR: Ensayo de

unión (CD32a), cSDS: Electroforesis capilar en gel con SDS R: Reducida, NR: No reducida, SEC: HPLC de exclusión por tamaño, IEX: HPLC de intercambio iónico, PS80: Contenido de polisorbato 80, MFI: Imágenes de microflujo, PMAP: Mapa de péptidos

5

10

15

Tabla 36 Programa de muestreo para estudio de congelación-descongelación y fotoestabilidad

5	Elementos de prueba	F15				F18			
		Inicial	FT	Oscuridad	1000lx	Inicial	FT	Oscuridad	1000lx
			3 ciclos	7D	7D		3 ciclos	7D	7D
10	Color	X	X	X	X	X	X	X	X
	Claridad	X	X	X	X	X	X	X	X
	Partículas	X	X	X	X	X	X	X	X
	Conc. de prot.	X	X	X	X	X	X	X	X
15	pH	X	X	X	X	X	X	X	X
	PS80	X	X	X	X	X	X	X	X
	ELISA	X	X	X	X	X	X	X	X
	FcR	X	X	X	X	X	X	X	X
	cSDS-R	X	X	X	X	X	X	X	X

cSDS-NR	X	X	X	X	X	X	X	X
SEC	X	X	X	X	X	X	X	X
IEX	X	X	X	X	X	X	X	X
PMAP-R	X	NE	X	X	X	NE	X	X

5 FT: Congelación-Descongelación (Congelación a -30 °C y descongelación a temperatura ambiente, en vertical), Oscuridad: 25 °C ± 2 °C, 60 % de HR ± 5 % de HR, tumbadas sin exposición a la luz cubriéndolas con papel de aluminio, 1000 lx: 25 °C ± 2 °C, 60 % de HR ± 5 % de HR, tumbadas con exposición a la luz de 1000 lx por luz fluorescente, X: Realizado, Color: Grado de coloración de los líquidos, Claridad: Claridad y grado de opalescencia, MFI: Imágenes de microflujo, Conc. de prot.: Concentración de proteína, PS80: Contenido de polisorbato 80, ELISA: ELISA de unión a antígeno, FcR: Ensayo de unión (CD32a), cSDS: Electroforesis capilar en gel con SDS, R: Reducida, NR: No reducida, SEC: HPLC de exclusión por tamaño, IEX: HPLC de intercambio iónico, PMAP: Mapa de péptidos

C. Resultados y análisis

[00238] Se evaluaron las propiedades físicas y se realizaron estudios a largo plazo y acelerados para formulaciones candidatas que incluían variación de pH (pH 4.0 a pH 6.0) y adición de metionina. También se realizaron estudios de congelación-descongelación y fotoestabilidad para evaluar la eficiencia de la adición de metionina.

D. Variación del pH

[00239] Como se muestra en la Tabla 37, la Tabla 38A y 38B, la Tabla 39 y la Tabla 40, no se observaron diferencias significativas entre las formulaciones candidatas (F13, F15, F17 y F20 a F22) para ningún elemento de prueba excepto para HPLC de exclusión por tamaño (SEC). La formulación F20 (es decir, una formulación con un pH inferior a 4.0) mostró una menor cantidad de agregados por SEC en el punto temporal inicial. Además, se observó una tasa ligeramente más baja de formación de agregados y una tasa más alta de formación de fragmentos en un estudio de estabilidad acelerada. Se confirmó que los resultados de las formulaciones con pH de 4.5 a 5.5 eran comparables.

25

30

Tabla 37 Resultados del estudio de estabilidad para formulaciones de BAN2401 con pH de 4.0 a 6.0, almacenadas a 5 °C ± 3 °C, en posición vertical

5	Elemento de prueba	Criterio de aceptación	(Control)		F0 pH 4.5		F13 pH 5.0		F15 pH 5.5		F17 pH 4.0		F20 pH 5.0		F21 pH 6.0	
			Inicial	5 °C/2M	Inicial	5 °C/2M	Inicial	5 °C/2M	Inicial	5 °C/2M	Inicial	5 °C/3M	Inicial	5 °C/3M	Inicial	5 °C/3M
10	Color	Informe de resultado	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5
	Claridad	Informe de resultado	≤RS2	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3
15	Partículas	Informe de resultado	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP
	pH	Informe de resultado	4.95	4.98	4.63	4.64	4.94	4.96	5.68	5.73	4.03	4.05	4.91	4.92	5.90	5.91

5	Conc. de proteína	Informe de resultado (mg/ml)	104	102	200	201	197	195	204	204		197	195	200	195	207	195
	ELISA	Informe de resultado	101.3%	102.6%	109.2%	104.5%	102.1%	123.1%	107.0%	125.7%		NE	NE	NE	NE	NE	NE
	FcR	Informe de resultado	91.7%	93.8%	101.0%	100.4%	108.8%	99.0%	116.6%	103.4%		NE	NE	NE	NE	NE	NE
	cSDS-R	Informe de resultado	98.3%	97.7%	98.8%	98.2%	98.9%	98.5%	98.8%	98.4%		NE	NE	NE	NE	NE	NE
	cSDS-NR	Informe de resultado	91.2%	91.9%	91.5%	92.5%	91.2%	92.9%	91.3%	92.6%		NE	NE	NE	NE	NE	NE
10	SEC	Monómero ≥ 95.0 %	98.6%	98.7%	99.2%	99.2%	99.1%	99.1%	98.8%	98.8%		99.3%	99.1%	99.2%	99.0%	98.8%	98.6%
		Agregado ≤ 5.0 %	1.0%	0.9%	0.8%	0.8%	0.9%	0.9%	1.2%	1.2%		0.7%	0.7%	0.8%	1.0%	1.2%	1.4%

[illegible]

5

$\geq 25 \mu\text{m}$	1	5	3	3	7	3	0	0	0	NE	0	NE	0	NE
10-25 μm	4	81	99	5	26	26	17	10	10	NE	5	NE	14	NE
5-10 μm	27	283	537	67	335	170	214	207	152	NE	5	NE	76	NE
2-5 μm	150	1452	980	276	1246	977	1365	1273	698	NE	95	NE	322	NE

BY5: Equivalente a la solución de referencia BY5. RS2: Suspensión de referencia II, RS3: Suspensión de referencia III, FVP: Libre de partículas visibles, NE: No ensayado.

10

Tabla 38A Resultados del estudio de estabilidad para formulaciones de BAN2401 con pH de 4.0 a 6.0, almacenadas a 25 °C $\pm$ 2 °C, 60 % de HR $\pm$ 5 % de HR, en posición vertical

15

Elem ento de prue ba	Criter io de acepta ción	F0 (Contro l)			F13 pH 4.5			F15 pH 5.0			F17 pH 5.5			F20 pH 4.0			F21 pH 5.0			F22 pH 6.0		
		Ini cia l	25 °C/ 1M	25 °C/ 2M	Ini cia l	25 °C/ 1M	25 °C/ 2M	Ini cia l	25 °C/ 1M	25 °C/ 2M	Ini cia l	25 °C/ 1M	25 °C/ 2M	Ini cia l	25 °C/ 1M	25 °C/ 3M	Ini cia l	25 °C/ 1M	25 °C/ 3M	Ini cia l	25 °C/ 1M	25 °C/ 3M

[illegible]

[illegible]

5	Informe de fragmento	0.5 %	0.5 %	0.7 %	<0.1 %	0.2 %	0.4 %	<0.1 %	0.1 %	0.3 %	<0.1 %	0.1 %	0.1 %	0.1 %	0.6 %	1.7 %	<0.1 %	0.1 %	0.4 %	<0.1 %	0.1 %	0.2 %
10	IEX Principal al 50 %-90 %	71.3 %	69.4 %	67.7 %	77.2 %	75.4 %	74.1 %	76.7 %	75.2 %	71.4 %	76.8 %	76.0 %	72.9 %	76.8 %	68.9 %	64.3 %	76.7 %	71.2 %	67.5 %	76.6 %	71.2 %	67.6 %
15	Ácido	24.4 %	26.3 %	28.2 %	19.1 %	20.3 %	22.0 %	19.4 %	20.6 %	23.2 %	19.4 %	20.2 %	22.5 %	18.8 %	23.9 %	32.0 %	18.9 %	21.9 %	28.5 %	19.1 %	22.1 %	28.3 %
	Básico	4.2 %	4.4 %	4.1 %	3.7 %	4.3 %	3.8 %	3.9 %	4.2 %	5.4 %	3.8 %	3.8 %	4.6 %	4.4 %	7.2 %	3.7 %	4.3 %	7.0 %	4.0 %	4.3 %	6.7 %	4.0 %

BY5: Equivalente a la solución de referencia BY₅. RS2: Suspensión de referencia II, RS3: Suspensión de referencia III, FVP: Libre de partículas visibles, NE: No ensayado. Informe: Informe de resultado

5	Elemento de prueba	Criterio de aceptación	F0 (Control)			F13 pH 4.5			F15 pH 5.0			F17 pH 5.5			F20 pH 4.0			F21 pH 5.0			F22 pH 6.0		
10			Inicial	25 °C/1M	25 °C/2M	Inicial	25 °C/1M	25 °C/2M	Inicial	25 °C/1M	25 °C/2M	Inicial	25 °C/1M	25 °C/2M	Inicial	25 °C/1M	25 °C/3M	Inicial	25 °C/1M	25 °C/3M	Inicial	25 °C/1M	25 °C/3M
15	Viscosidad	Informe (cP)	2.6	NE	NE	8.1	NE	NE	7.9	NE	NE	10.0	NE	NE	8.0	NE	NE	9.4	NE	NE	11.6	NE	NE
	Osmolalidad	Informe	512	NE	NE	416	NE	NE	407	NE	NE	402	NE	NE	420	NE	NE	423	NE	NE	396	NE	NE

		(mOsm/kg)																					
5	Polisorbat 80	Informe (% p/v)	0.048%	0.052%	0.050%	0.044%	0.047%	0.045%	0.044%	0.047%	0.043%	0.043%	0.041%	0.042%	0.052%	0.049%	0.042%	0.052%	0.053%	0.051%	0.051%	0.048%	0.043%
10	MFI	≥25 μm	1	5	0	3	0	3	7	0	0	0	10	5	0	0	NE	0	0	NE	0	0	NE
		10-25 μm	4	3	35	99	51	23	26	49	35	17	46	49	10	26	NE	5	3	NE	14	3	NE
		5-10 μm	27	81	292	537	769	163	335	959	714	214	597	553	152	246	NE	5	7	NE	76	35	NE
2-5 μm		150	457	1830	980	3139	647	1246	2919	1963	1365	2243	1778	698	454	NE	95	69	NE	322	285	NE	
15																							

NE: No ensayado, Informe: Informe de resultado

Tabla 39 Resultados del estudio de estabilidad extendida para formulaciones con pH de 4.5 a 5.5, almacenadas a 5 °C ± 3 °C, en posición vertical

Elemento de prueba		F0 (Control)			F13 pH 4.5			F15 pH 5.0			F17 pH 5.5		
		Inicial	5 °C/2M	5 °C/9M	Inicial	5 °C/2M	5 °C/9M	Inicial	5 °C/2M	5 °C/9M	Inicial	5 °C/2M	5 °C/9M
HPLC de exclusión por tamaño	Monómero	98.6%	98.7%	98.6%	99.2%	99.2%	98.8%	99.1%	99.1%	98.6%	98.8%	98.8%	98.3%
	Agregado	1.0%	0.9%	1.0%	0.8%	0.8%	1.1%	0.9%	0.9%	1.4%	1.2%	1.2%	1.7%
	Fragmento	0.5%	0.4%	0.5%	<0.1%	<0.1%	0.1%	<0.1%	<0.1%	0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%

Tabla 40 Resultados del estudio de estabilidad extendida para una formulación actual y principal con pH de 4.5 a 5.5, almacenada a 25 °C ± 2 °C, 60 % de HR ± 5 % de HR, en posición vertical

Elemento de prueba		F0 (Control)				F13 pH 4.5				F15 pH 5.0				F17 pH 5.5			
		Inicial	25 °C/1M	25 °C/2M	25 °C/3M +5 °C/6M	Inicial	25 °C/1M	25 °C/2M	25 °C/3M +5 °C/6M	Inicial	25 °C/1M	25 °C/2M	25 °C/3M +5 °C/6M	Inicial	25 °C/1M	25 °C/2M	25 °C/3M +5 °C/6M
HPLC de exclusión	Monómero	98.6%	98.4%	98.4%	98.0%	99.2%	98.6%	98.4%	97.7%	99.1%	98.4%	98.2%	97.7%	98.8%	98.2%	98.2%	97.7%
	Agregado	1.0%	1.0%	0.9%	1.0%	0.8%	1.1%	1.2%	1.5%	0.9%	1.4%	1.5%	1.8%	1.2%	1.8%	1.7%	2.0%

por tamaño	Fragme nto	0.5%	0.5%	0.7%	0.9%	<0.1%	0.2%	0.4%	0.8%	<0.1%	0.1%	0.3%	0.5%	<0.1%	0.1%	0.1%	0.3%
---------------	---------------	------	------	------	------	-------	------	------	------	-------	------	------	------	-------	------	------	------

5

10

15

E. Adición de metionina

[00240] Como se muestra en las Tablas 41A y 41B, y la Tabla 42 a la Tabla 46, no se observaron diferencias significativas entre las formulaciones con o sin metionina (F18 y F15). La formulación con metionina (F18) mostró una tasa de formación de agregados ligeramente más baja en un estudio de estabilidad a largo plazo extendida, un estudio de estabilidad acelerada y un estudio de fotoestabilidad. F18 también mostró una oxidación ligeramente inferior del residuo de metionina (por ejemplo, en la posición 259 en las cadenas pesadas) en exposición a la luz con 1000 lux hasta siete días. El estudio de congelación-descongelación no mostró ninguna diferencia. El efecto de 10 mmol/l de metionina como estabilizador fue limitado.

15

20

25

30

Tabla 41A Resultados del estudio de estabilidad para formulaciones con o sin Met, almacenadas a 5 °C ± 3 °C, en posición vertical

5	Elemento de prueba	Criterio de aceptación	F0 (Control)		F15 Met (-)		F18 Met (+)	
			Inicial	5 °C/2M	Inicial	5 °C/2M	Inicial	5 °C/2M
	Color	Informe de resultado	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5
10	Claridad	Informe de resultado	≤RS2	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3
	Partículas	Informe de resultado	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP
15	pH	Informe de resultado (mg/ml)	4.95	4.98	4.94	4.96	4.95	4.98

5	Conc. de proteína	Informe de resultado	104	102	197	195	191	189
	ELISA	Informe de resultado	101.3%	102.6%	102.1%	123.1%	108.2%	118.1%
	FcR	Informe de resultado	91.7%	93.8%	108.8%	99.0%	92.4%	94.7%
	cSDS-R	Informe de resultado	98.3%	97.7%	98.9%	98.5%	98.9%	98.5%
10	cSDS-NR	Informe de resultado	91.2%	91.9%	91.2%	92.9%	91.5%	92.7%
15	SEC	Monómero ≥ 95.0 %	98.6%	98.7%	99.1%	99.1%	99.2%	99.1%
		Agregado ≤ 5.0 %	1.0%	0.9%	0.9%	0.9%	0.8%	0.9%
		Informe de fragmento	0.5%	0.4%	<0.1%	<0.1%	<0.1%	<0.1%

IEX	Principal al 50 %-90 %	71.3%	70.8%	76.7%	72.9%	77.2%	75.9%
	Ácido	24.4%	25.2%	19.4%	19.7%	19.0%	19.2%
	Básico	4.2%	4.0%	3.9%	7.4%	3.8%	4.9%

Met: Metionina, BY5: Equivalente a la solución de referencia BY₅. RS2: Suspensión de referencia II, RS3: Suspensión de referencia III, FVP: Libre de partículas visibles

Tabla 41B

5	Elemento de prueba	Criterio de aceptación	F0	(Control)	F15	Met (-)	F18	Met (+)
			Inicial	5 °C/2M	Inicial	5 °C/2M	Inicial	5 °C/2M
10	Viscosidad	Informe de resultado (cP)	2.6	NE	7.9	NE	7.3	NE
	Osmolalidad	Informe de resultado (mOsm/kg)	512	NE	407	NE	416	NE
15	Polisorbato 80	Informe de resultado (% p/v)	0.048%	0.051%	0.044%	0.047%	0.045%	0.039%
	MFI	≥25 µm	1	5	7	3	0	0
		10-25 µm	4	81	26	26	3	0

WO 2021/186245

- 147 -

PCT/IB2021/000155

	5-10 μm	27	283	335	170	131	159
	2-5 μm	150	1452	1246	977	691	163

Met: Metionina, NE: No ensayado.

5

10

15

Tabla 42 Resultados del estudio de estabilidad para formulaciones con o sin Met, almacenadas a 25 °C ± 2 °C, 60 % de HR ± 5 % de HR, en posición vertical

	Elemento de prueba	Criterio de aceptación	F0 (Control)			F15 Met (-)			F18 Met (+)		
			Inicial	25 °C/1M	25 °C/2M	Inicial	25 °C/1M	25 °C/2M	Inicial	25 °C/1M	25 °C/2M
5	Color	Informe de resultado	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5	BY5
10	Claridad	Informe de resultado	≤RS2	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3	≤RS3
	Partículas	Informe de resultado	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP	FVP
15	pH	Informe de resultado	4.95	4.94	4.99	4.94	4.96	4.98	4.95	4.94	4.97
	Conc. de proteína	Informe de resultado	104	103	101	197	194	192	191	192	189

5	ELISA	Informe de resultado	101.3%	102.7%	91.8%	102.1%	103.6%	96.9%	108.2%	97.0%	97.8%
	FcR	Informe de resultado	91.7%	95.5%	93.5%	108.8%	98.3%	102.2%	92.4%	91.9%	92.9%
	cSDS-R	Informe de resultado	98.3%	98.1%	97.2%	98.9%	98.8%	98.0%	98.9%	98.8%	98.1%
	cSDS-NR	Informe de resultado	91.2%	89.7%	90.4%	91.2%	89.5%	90.0%	91.5%	89.8%	90.6%
10	SEC	Monómero ≥95.0 %	98.6%	98.4%	98.4%	99.1%	98.4%	98.2%	99.2%	98.6%	98.5%
		Agregado ≤5.0 %	1.0%	1.0%	0.9%	0.9%	1.4%	1.5%	0.8%	1.2%	1.2%
15		Informe de fragmento	0.5%	0.5%	0.7%	<0.1%	0.1%	0.3%	<0.1%	0.1%	0.3%

5	IEX	Principal al 50 %-90 %	71.3%	69.4%	67.7%	76.7%	75.2%	71.4%	77.2%	76.1%	72.9%
		Ácido	24.4%	26.3%	28.2%	19.4%	20.6%	23.2%	19.0%	20.2%	22.6%
		Básico	4.2%	4.4%	4.1%	3.9%	4.2%	5.4%	3.8%	3.7%	4.4%
10	Viscosidad	Informe de resultado (cP)	2.6	NE	NE	7.9	NE	NE	7.3	NE	NE
	Osmolalidad	Informe de resultado (mOsm/kg)	512	NE	NE	407	NE	NE	416	NE	NE
15	Polisorbato 80	Informe de resultado (% p/v)	0.048%	0.052%	0.050%	0.044%	0.047%	0.043%	0.045%	0.043%	0.038%
	MFI	≥25 μm	1	5	0	7	0	0	0	0	3
		10-25 μm	4	3	35	26	49	35	3	7	65

	5-10 μm	27	81	292	335	959	714	131	230	647
	2-5 μm	150	457	1830	1246	2919	1963	691	792	2516

Met: Metionina, NE: No ensayado, BY5: Equivalente a la solución de referencia BY₅. RS2:

Suspensión de referencia II, RS3: Suspensión de referencia III, FVP: Libre de partículas
visibles, NE: No ensayado.

Tabla 43 Resultados del estudio de estabilidad extendida para una formulación actual y principal con o sin Met, a partir de DS1 o DS2, almacenada a 5 °C $\pm$ 3 °C, en posición vertical

Elemento de prueba		F0 (Control)			F15 Met (-)			F18 Met (+)		
		Inicial	5 °C/ 2M	5 °C/ 9M	Inicial	5 °C/ 2M	5 °C/ 9M	Inicial	5 °C/ 2M	5 °C/ 9M
HPLC de exclusión	Monómero	98.6%	98.7%	98.6%	99.1%	99.1%	98.6%	99.2%	99.1%	98.7%
	Agregado	1.0%	0.9%	1.0%	0.9%	0.9%	1.4%	0.8%	0.9%	1.2%
	Fragmento	0.5%	0.4%	0.5%	<0.1%	<0.1%	0.1%	<0.1%	<0.1%	0.1%

por tamaño										
---------------	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

Met: Metionina

5

Tabla 44 Resultados del estudio de estabilidad extendida para formulaciones con o sin Met, almacenadas a 25 °C ± 2 °C, 60 % de HR ± 5 % de HR, en posición vertical

10	Elemento de prueba		F0 (Control)				F15 Met (-)				F18 Met (+)			
			Inicia 1	25 °C / 1M	25 °C / 2M	25 °C / 3M +5 °C / 6M	Inicia 1	25 °C / 1M	25 °C / 2M	25 °C / 3M +5 °C / 6M	Inicia 1	25 °C / 1M	25 °C / 2M	25 °C / 3M +5 °C / 6M
15														
		Monómero	98.6%	98.4%	98.4%	98.0%	99.1%	98.4%	98.2%	97.7%	99.2%	98.6%	98.5%	98.0%

HPLC de exclusión por tamaño	Agregado	1.0%	1.0%	0.9%	1.0%	0.9%	1.4%	1.5%	1.8%	0.8%	1.2%	1.2%	1.5%
	Fragmento	0.5%	0.5%	0.7%	0.9%	<0.1%	0.1%	0.3%	0.5%	<0.1%	0.1%	0.3%	0.5%

Met: Metionina

[illegible]

	pH	Informe de resultado	4.94	4.94	4.94	4.94	4.95	4.94	4.93	4.92
5	Conc. de proteína	Informe de resultado	197	197	190	193	191	190	189	190
10	ELISA	Informe de resultado	102.1%	107.7%	107.0%	100.9%	108.2%	105.8%	104.7%	109.1%
	FcR	Informe de resultado	108.8%	107.5%	104.0%	117.6%	106.0%	105.6%	104.8%	109.4%
15	cSDS-R	Informe de resultado	98.9%	99.3%	99.3%	98.7%	98.9%	99.1%	99.3%	98.7%

	cSDS-NR	Informe de resultado	91.2%	93.0%	92.6%	92.0%	91.5%	92.8%	92.9%	91.4%
5	HPLC de exclusión por tamaño	Monómero $\geq 95.0\%$	99.1%	99.0%	98.9%	97.5%	99.2%	99.1%	98.9%	97.9%
		Agregado $\leq 5.0\%$	0.9%	1.0%	1.0%	2.4%	0.8%	0.9%	1.0%	2.0%
10		Informe de fragmento	<0.1%	<0.1%	0.1%	0.1%	<0.1%	<0.1%	0.1%	0.1%
15	IEX	Principal al 50 %-90 %	76.7%	73.5%	74.8%	65.5%	77.2%	77.3%	76.2%	62.7%
		Ácido	19.4%	20.8%	20.9%	20.3%	19.0%	18.8%	19.8%	20.0%
		Básico	3.9%	5.8%	4.4%	14.2%	3.8%	3.9%	3.9%	17.3%

5	Viscosidad	Informe de resultado	7.9	NE	NE	NE	7.3	NE	NE	NE
	Osmolalidad	Informe de resultado	407	NE	NE	NE	416	NE	NE	NE
10	Polisorbato 80	Informe de resultado (% p/v)	0.044%	0.047%	0.046%	0.046%	0.045%	0.047%	0.042%	0.046%
15	MFI	≥25 μm	7	0	NE	44	0	5	NE	14
		10-25 μm	26	76	NE	278	3	44	NE	99
		5-10 μm	335	661	NE	1074	131	294	NE	698
		2-5 μm	1246	2704	NE	3293	691	1289	NE	2491

FT: Congelación-descongelación, (Congelación a -30°C y descongelación a temperatura ambiente, en vertical), 25°C : $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60 % de HR $\pm$ 5 % de HR, 1000 lx: tumbadas con

exposición a la luz de 1000 lx, Oscuridad: tumbadas sin exposición a la luz cubriéndolas con papel de aluminio, Met: Metionina, BY5: Equivalente a la solución de referencia BY₅, RS3: Suspensión de referencia III, FVP: Libre de partículas visibles, NE: No ensayado

5

Tabla 46 Resultados del mapa de péptidos reducido

10

15

N.° de formulación		F0			F15 Met (-)					F18 Met (+)				
		Inic ial	5 ° C 2M	25 °C 2M	Inic ial	5 ° C 2M	25 °C 2M	25 °C Oscuri dad, 7D	25 °C 1000 l ux, 7D	Inic ial	5 ° C 2M	25 °C 2M	25 °C Oscuri dad, 7D	25 °C 1000 l ux, 7D
Secuenc ia	HC	100. 0%	100 .0%	100 .0%	100. 0%	100 .0%	100 .0%	100.0%	100.0%	100. 0%	100 .0%	100 .0%	100.0%	100.0%
Cobertu ra	LC	99.5 %	100 .0%	100 .0%	100. 0%	98. 6%	100 .0%	100.0%	98.6%	98.6 %	100 .0%	100 .0%	98.6%	98.6%

5	Desamidación	HC N33 2	8.7%	8.4%	8.3%	8.2%	7.6%	7.6%	7.6%	7.8%	7.7%	7.2%	7.2%	7.7%	7.6%
		LC N33	11.0%	11.6%	12.3%	11.1%	10.4%	11.3%	10.8%	10.5%	11.0%	10.9%	11.3%	10.3%	10.7%
10	Oxidación	HC M25 9	<1%	4.5%	5.0%	3.5%	4.0%	5.8%	4.3%	12.4%	2.7%	2.7%	2.8%	3.1%	9.4%
		HC M35 6	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%	1.9%	<1%	<1%	<1%	<1%	<1%
15		HC M43 5	3.4%	2.4%	2.8%	1.9%	2.1%	2.7%	2.7%	9.6%	1.7%	1.4%	1.5%	0.8%	8.2%
		LC M4	1.5%	1.5%	1.5%	1.6%	1.8%	1.7%	1.8%	2.2%	1.6%	1.5%	1.4%	1.7%	1.7%

Met: Metionina, 5 °C: 5 °C ± 3 °C, 25 °C: 25 °C ± 2 °C, 60 % de HR ± 5 % de HR, 1000 lx: tumbada con exposición a la luz de 1000 lx, Oscuridad: tumbada sin exposición a la luz cubriéndola con papel de aluminio, HC: cadena pesada, LC: cadena ligera

F. Conclusión

[00241] Los atributos de calidad fueron comparables entre las formulaciones de BAN2401 con una variación de pH de pH 4.5 a pH 5.5. s a pH 4.0 mostró una menor tasa de formación de agregados y, por el contrario, una mayor tasa de formación de fragmentos durante el almacenamiento. No se observaron diferencias significativas entre las formulaciones con y sin metionina a una concentración de 10 mmol/l basándose en las evaluaciones de calidad, estudios de estabilidad que incluyen a largo plazo, acelerada, congelación-descongelación y fotoestabilidad. Aunque se observaron una tasa de formación de agregados ligeramente más lenta y una menor supresión en la oxidación del residuo de aminoácidos, las diferencias no fueron significativas. En conclusión, se determinó que F15 y F21, que estaban compuestos por 200 mg/ml de BAN2401, 25 mmol/l de L-histidina/clorhidrato de histidina, 200 mmol/l de L-arginina, 0.05 % (p/v) de polisorbato 80 a un pH de 5.0 ± 0.5 , eran buenos candidatos a sustancia farmacológica para un mayor desarrollo.

Ejemplo 10: Investigación sobre el efecto de la concentración de arginina en la estabilidad de la formulación de BAN2401

[00242] Se evaluó el efecto de la concentración de arginina (0, 50, 100 y 200 mmol/l) sobre la estabilidad de BAN2401 a 200 mg/ml. Las muestras de cada nivel de concentración de arginina se almacenaron en condiciones aceleradas (25 °C/60 % de HR) y se analizaron a los 0, 1 y 2 meses.

A. Preparación de las muestras

[00243] Las muestras (F1-F4) se prepararon mediante intercambio de tampón del intermedio de proceso de sustancia farmacológica de BAN2401 concentrado mediante ultrafiltración. Después de la filtración aséptica, cada muestra de 0.4 ml se cargó en un vial. La información de las muestras se muestra en la Tabla 47.

Tabla 47 Información de las muestras

N.º de formulación	BAN2401	Tampón	Estabilizador (arginina)	Polisorbato 80	pH
F1	200 mg/ml	Histidina 25 mmol/l	0 mmol/l	0.05 % (p/v)	5.0
F2	200 mg/ml	Histidina 25 mmol/l	50 mmol/l	0.05 % (p/v)	5.0
F3	200 mg/ml	Histidina 25 mmol/l	100 mmol/l	0.05 % (p/v)	5.0
F4	200 mg/ml	Histidina 25 mmol/l	200 mmol/l	0.05 % (p/v)	5.0

B. Resultados

[00244] Los resultados de este estudio de estabilidad para las muestras F1 a F4 se muestran en las Tablas 48 a 51. No hubo diferencia en el pH y la concentración de proteína entre las muestras, y el nivel de concentración de arginina fue consistente con el objetivo para las muestras iniciales.

[00245] El % de agregados para muestras que contenían arginina (F2 a F4) fue menor que el de la muestra sin arginina (F1).

Tabla 48 Resultados de prueba de la muestra F1 (arginina 0 mmol/l objetivo)

Elementos de prueba		Inicial	1M	2M
pH		5.1	–	–
Concentración de proteína (mg/ml)		195	–	–
SEC	% de área de monómero	98.3%	98.0%	97.8%
	% de área de agregados	1.6%	1.7%	1.9%
	% de área de fragmentos	0.1%	0.2%	0.3%
Concentración de arginina (mmol/l)		1	–	–

Tabla 49 Resultados de prueba de la muestra F2 (arginina 50 mmol/l objetivo)

Elementos de prueba		Inicial	1M	2M
pH		5.0	–	–
Concentración de proteína (mg/ml)		192	–	–
SEC	% de área de monómero	98.4%	98.1%	97.8%
	% de área de agregados	1.5%	1.7%	1.8%
	% de área de fragmentos	0.1%	0.2%	0.4%
Concentración de arginina (mmol/l)		47	–	–

Tabla 50 Resultados de prueba de la muestra F3
(arginina 100 mmol/l objetivo)

Elementos de prueba		Inicial	1M	2M
pH		5.0	–	–
Concentración de proteína (mg/ml)		198	–	–
SEC	% de área de monómero	98.4%	98.1%	97.8%
	% de área de agregados	1.5%	1.7%	1.8%
	% de área de fragmentos	0.1%	0.2%	0.4%
Concentración de arginina (mmol/l)		87	–	–

Tabla 51 Resultados de prueba de la muestra F4
(arginina 200 mmol/l objetivo)

Elementos de prueba		Inicial	1M	2M
pH		5.0	–	–
Concentración de proteína (mg/ml)		191	–	–
SEC	% de área de monómero	98.4%	98.1%	97.9%
	% de área de agregados	1.5%	1.6%	1.7%
	% de área de fragmentos	0.1%	0.2%	0.4%

Concentración de arginina (mmol/l)	173	-	-
------------------------------------	-----	---	---

C. Análisis y conclusión

[00246] Los resultados de este estudio indicaron que las concentraciones de arginina de 50 a 200 mmol/ previenen aumentos de agregados de proteína en la formulación de 200 mg/ml de BAN2401. La variación de la concentración de arginina entre lotes puede resultar en una variación en el % de agregado entre lotes. Además, la concentración de arginina puede afectar a la tendencia de aumento del % de agregados en el estudio de estabilidad.

[00247] La formulación que comprende tampón de histidina pareció mostrar un efecto en la reducción de la fragmentación de BAN2401 en comparación con el porcentaje de fragmentación en la muestra F1 con el porcentaje de fragmentación que se muestra en la Figura 11 en el Ejemplo 2, en el que se usaron las muestras que comprenden 200 mg/ml de BAN2401, citrato de sodio 50 mM y cloruro de sodio 100 mM.

LISTADO DE SECUENCIAS

Tabla 52. Secuencias de aminoácidos de regiones variables de mAb

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
BAN2401	Cadena pesada	1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCSASG FTFSSFGMHWRQAPGKGLEWVAYIS SGSSTIYYGDTVKGRTISRDNKNS LFLQMSSLRAEDTAVYYCAREGGYYY GRSYTMDYWGQGTITVTVSS
BAN2401	Cadena ligera	2	DVVMTQSPLSLPVTGPAPASISCRSS QSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLL IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL RISRVEAEDVGIYYCFQGSHVPPTFG PGTKLEIK

Tabla 53. Secuencias de aminoácidos de regiones constantes de mAb

mAb	Cadena de IgG	Clase	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
BAN2401	Cadena pesada	IgG1	3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVD KRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQYNSTYRVSVLT

				VLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKS LSLSPGK
BAN2401	Cadena ligera	kappa	4	RTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVT EQDSKSTYSLSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC

Tabla 54. Secuencias de aminoácidos de CDR de mAb

mAb	Cadena de IgG	SEQ ID NO	Secuencia de aminoácidos
BAN2401	HCDR1	5	SFGMH
	HCDR2	6	YISSGSSTIYYGDTVKG
	HCDR3	7	EGGYYYGRSYYTMDY
BAN2401	LCDR1	8	RSSQSIVHSNGNTYLE
	LCDR2	9	KVSNRFS
	LCDR3	10	FQGSHVPPT

Cadena pesada (SEQ ID NO: 11) :

evqlvesggglvqpqgslrlscsasgftfssfgmhwvrqapgkglewvayissgsstiy
ygdtvkgrftisrdnaknslflqmsslraedtavyycaregggyygrsyytmdywgqgt
tvtvssastkgpsvfplapsskstsggtaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtf
pavlqssglyslssvvtvpssslgtqtyicnvnhkpsntkvdkrvepkscdkthtccpc
papellggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvdgvevhnak

tkpreeqynstyrvvsvltvltvhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiskakggpprepq
vytlppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavewesngqpennykttpvldsdgsffl
yskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsislspgk

Cadena ligera (SEQ ID NO: 12) :

dvvmtqsplslpvtpgapasiscrssqsivhsngntylewylqkpgqspklliykvsnr
fsgvpdrfsgsgsgtdftlrisrveaedvgiyycfqgshvpptfgpgtkleikrtvaap
svfifppsdeqlksgtasvvcllnnfypreakvqwkvdnalqsgnsqesvteqdsdst
yslsstltliskadyekhkvyacevthqglsspvtksfnrgec

Se hace constar que con relación a esta fecha, el mejor método conocido por la solicitante para llevar a la práctica la citada invención, es el que resulta claro de la presente descripción de la invención.