

FORMULACIONES ESTABILIZADAS QUE CONTIENEN ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS ANTI-MUC16 x ANTI-CD3

REFERENCIA A UN LISTADO DE SECUENCIAS

5 Esta solicitud incorpora como referencia el Listado de secuencias presentado en forma legible por computadora como el archivo 10820WO01-Sequence.txt, creado el 1 de abril de 2022 y que contiene 25,436 bytes.

CAMPO DE LA INVENCION

10 La presente invención se refiere al campo de formulaciones de anticuerpos terapéuticos. Más específicamente, la presente invención se refiere al campo de las formulaciones farmacéuticas que comprenden un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano.

ANTECEDENTES

15 Las macromoléculas terapéuticas (por ejemplo, anticuerpos) deben formularse de manera que no solo hagan que las moléculas sean adecuadas para la administración a los pacientes, sino que también mantengan su estabilidad durante el almacenamiento y el uso subsecuente. Por ejemplo, los anticuerpos terapéuticos en solución líquida tienden a la degradación, agregación y/o modificaciones químicas no deseadas a menos que la solución se formule adecuadamente. La estabilidad de un
20 anticuerpo en la formulación líquida no solo depende de los tipos de excipientes usados en la formulación, sino también de las cantidades y proporciones de los excipientes entre sí. Además, al preparar una formulación líquida de anticuerpo se deben tener en cuenta otras consideraciones además de la estabilidad. Los ejemplos de tales consideraciones adicionales incluyen la concentración de anticuerpo que puede contener una formulación dada, y la calidad o el aspecto
25 visual de la formulación. Por lo tanto, al formular un anticuerpo terapéutico, debe tenerse mucho cuidado para llegar a una formulación que permanezca estable, que contenga una concentración adecuada de anticuerpo, y que posea otras propiedades que permiten que la formulación se administre convenientemente a los pacientes.

30 Mucina 16 (MUC16), también conocida como antígeno 125 de cáncer, antígeno 125 de carcinoma, antígeno 125 de carbohidrato, o CA-125, es una glicoproteína de membrana integral altamente glicosilada de dominio único de transmembrana que se expresa en gran medida en el cáncer de

ovario. CD3 es un antígeno homodimérico o heterodimérico expresado en linfocitos T en asociación con el complejo de receptores de linfocitos T (TCR) y es necesario para la activación de linfocitos T.

Los anticuerpos biespecíficos contra MUC16 humana y CD3 humano son un ejemplo de macromoléculas terapéuticamente relevantes que necesitan una formulación adecuada. Tales anticuerpos son clínicamente útiles para, por ejemplo, el tratamiento del cáncer (por ejemplo, cánceres que expresan MUC16, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer pancreático, y cáncer de pulmón de células no pequeñas).

Aunque los anticuerpos biespecíficos anti-MUC16 x anti-CD3 se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, el documento WO 2018/067331), sigue existiendo una necesidad de formulaciones farmacéuticas que comprendan anticuerpos biespecíficos anti-MUC16 x anti-CD3 que sean suficientemente estables y adecuados para la administración a los pacientes.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se proporcionan formulaciones farmacéuticas líquidas estables que comprenden un anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 y uno o más excipientes, así como también kits, formas de dosificación unitaria, y contenedores que comprenden tales formulaciones y usos de estos.

En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica líquida estable que comprende: (a) un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada (A1-HCDR1, A1-HCDR2 y A1-HCDR3) contenidas en una región variable de cadena pesada (HCVR) y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas en una región variable de cadena ligera (LCVR), y el segundo dominio de unión a antígeno comprende tres CDR de cadena pesada (A2-HCDR1, A2-HCDR2 y A2-HCDR3) contenidas en una región variable de cadena pesada (HCVR) y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas en una región variable de cadena ligera (LCVR), en donde A1-HCDR1, A1-HCDR2 y A1-HCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente, de las SEQ ID NO: 7, 8 y 9, A2-HCDR1, A2-HCDR2 y A2-HCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente, de las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, y LCDR1, LCDR2 y LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente, de las SEQ ID NO: 13, 14 y 15; (b) un amortiguador que comprende acetato de sodio; (c) un cosolvente

orgánico que comprende polisorbato; y (d) un estabilizador que comprende un azúcar; en donde la formulación tiene un pH de 5.0 ± 0.5 .

En algunos casos, la concentración de anticuerpos es de $1 \text{ mg/ml} \pm 0.1 \text{ mg/ml}$ a $200 \text{ mg/ml} \pm 20 \text{ mg/ml}$. En algunos casos, la concentración de anticuerpos es de $5 \text{ mg/ml} \pm 0.5 \text{ mg/ml}$ a $50 \text{ mg/ml} \pm 5 \text{ mg/ml}$. En algunos casos, la concentración de anticuerpos es de $5 \text{ mg/ml} \pm 0.5 \text{ mg/ml}$. En algunos casos, la concentración de anticuerpos es de $50 \text{ mg/ml} \pm 5 \text{ mg/ml}$. En algunos casos, la concentración de anticuerpos es de $150 \text{ mg/ml} \pm 15 \text{ mg/ml}$.

En algunos casos, la concentración del amortiguador de acetato es de $10 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ a $50 \text{ mM} \pm 5 \text{ mM}$. En algunos casos, la concentración del amortiguador de acetato es de $25 \text{ mM} \pm 2.5 \text{ mM}$ a $35 \text{ mM} \pm 3.5 \text{ mM}$. En algunos casos, la concentración del amortiguador de acetato es de $30 \text{ mM} \pm 3 \text{ mM}$.

En algunos casos, la concentración de polisorbato es de $0.01 \% \pm 0.005 \%$ a $0.5 \% \pm 0.05 \% \text{ p/v}$. En algunos casos, la concentración de polisorbato es de $0.1 \% \pm 0.05 \%$ a $0.3 \% \pm 0.03 \% \text{ p/v}$. En algunos casos, la concentración de polisorbato es $0.2 \% \pm 0.02 \% \text{ p/v}$. En algunos casos, la concentración de polisorbato es de $0.05 \% \pm 0.01 \% \text{ p/v}$. En algunas modalidades, el polisorbato es polisorbato 20.

En algunas modalidades, el azúcar es sacarosa. En algunos casos, la concentración de sacarosa es de $5 \% \pm 1 \%$ a $20 \% \pm 4 \% \text{ p/v}$. En algunos casos, la concentración de sacarosa es de $7 \% \pm 0.5 \%$ a $12 \% \pm 0.5 \% \text{ p/v}$. En algunos casos, la concentración de sacarosa es de $10 \% \pm 1 \% \text{ p/v}$. En algunos casos, la concentración de sacarosa es del $7 \% \pm 0.7 \% \text{ p/v}$. En algunos casos, la concentración de sacarosa es de $8 \% \pm 0.8 \% \text{ p/v}$.

En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende: (a) $5 \text{ mg/ml} \pm 0.5 \text{ mg/ml}$ de anticuerpo, (b) de $25 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ a $35 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ de amortiguador de acetato, (c) de $0.1 \% \pm 0.05 \%$ a $0.3 \% \pm 0.05 \% \text{ p/v}$ de polisorbato, y (d) de $5 \% \pm 1 \%$ a $15 \% \pm 3 \% \text{ p/v}$ de sacarosa, a pH 5.0 ± 0.5 .

En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende: (a) $5 \text{ mg/ml} \pm 0.5 \text{ mg/ml}$ de anticuerpo (b) $30 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ de amortiguador de acetato, (c) $0.2 \% \pm 0.02 \% \text{ p/v}$ de polisorbato y (d) $10 \% \pm 1 \% \text{ p/v}$ de sacarosa, a pH 5.0 ± 0.3 .

En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende: (a) $50 \text{ mg/ml} \pm 5 \text{ mg/ml}$ de anticuerpo, (b) de $25 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ a $35 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ de amortiguador de acetato, (c) de $0.1 \% \pm 0.05$

% a $0.3 \% \pm 0.05 \%$ p/v de polisorbato, y (d) de $5 \% \pm 1 \%$ a $15 \% \pm 3 \%$ p/v de sacarosa, a pH 5.0 ± 0.5 .

En algunas modalidades, la formulación farmacéutica comprende: (a) $50 \text{ mg/ml} \pm 0.5 \text{ mg/ml}$ de anticuerpo (b) $30 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ de amortiguador de acetato, (c) $0.2 \% \pm 0.02 \%$ p/v de polisorbato y (d) $10 \% \pm 1 \%$ p/v de sacarosa, a pH 5.0 ± 0.3 .

En cualquiera de estas modalidades, el polisorbato puede ser polisorbato 20.

En cualquiera de las diversas modalidades descritas anteriormente, la formulación contiene no más de 2.5% de especies de alto peso molecular (HMW) después de 12 meses o 24 meses de almacenamiento a 5°C , según lo determinado por cromatografía líquida de ultra rendimiento de exclusión por tamaño (SE-UPLC). En algunos casos, la formulación contiene no más de 3.5% de especies de alto peso molecular (HMW) después de 6 meses de almacenamiento a 25°C y 60% de humedad relativa, según lo determinado por SE-UPLC. En algunos casos, la formulación contiene no más de 1.5% de especies de alto peso molecular (HMW) después de 12 meses de almacenamiento a -30°C , o no más de 2.0% de especies de HMW después de 24 meses de almacenamiento a -30°C , según lo determinado por SE-UPLC. En algunos casos, la formulación contiene no más de 1.5% de especies de alto peso molecular (HMW) después de 12 meses de almacenamiento a -80°C , o no más de 2.0% de especies de HMW después de 24 meses de almacenamiento a -30°C , según lo determinado por SE-UPLC.

En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica líquida estable reconstituida a partir de un liofilizado, que comprende: (a) un anticuerpo biespecífico a una concentración de 1 mg/ml a 30 mg/ml , en donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de cadena pesada (A1-HCDR1, A1-HCDR2 y A1-HCDR3) contenidas en una región variable de cadena pesada (HCVR) y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas en una región variable de cadena ligera (LCVR), y el segundo dominio de unión a antígeno comprende tres CDR de cadena pesada (A2-HCDR1, A2-HCDR2 y A2-HCDR3) contenidas en una región variable de cadena pesada (HCVR) y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas en una región variable de cadena ligera (LCVR), en donde A1-HCDR1, A1-HCDR2 y A1-HCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente, de las SEQ ID NO: 7, 8 y 9, A2-HCDR1 A2-HCDR2

y A2-HCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente, de las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, y LCDR1, LCDR2 y LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente, de las SEQ ID NO: 13, 14 y 15; (b) un amortiguador que comprende histidina; (c) un cosolvente orgánico que comprende polisorbato; y (d) un estabilizador que comprende un azúcar; en donde la formulación tiene un pH de 6.0 ± 0.5 .

En algunos casos, la concentración de anticuerpos es de $2 \text{ mg/ml} \pm 0.5 \text{ mg/ml}$. En algunos casos, la concentración de anticuerpos es de $20 \text{ mg/ml} \pm 2 \text{ mg/ml}$. En algunos casos, la concentración del amortiguador de histidina es de $5 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ a $15 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$. En algunos casos, la concentración del amortiguador de histidina es de $10 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$. En algunos casos, la concentración de polisorbato es de 0.01% a 0.1% p/v. En algunos casos, la concentración de polisorbato es de 0.05% , $\pm 0.01 \%$ p/v. En algunas modalidades, el polisorbato es polisorbato 20. En algunas modalidades, el azúcar es sacarosa. En algunos casos, la concentración de sacarosa es de $8 \% \pm 0.5 \%$ a $12 \% \pm 0.5 \%$ p/v. En algunos casos, la concentración de sacarosa es de $10 \% \pm 1 \%$ p/v.

En cualquiera de las modalidades de este aspecto de la invención: (a) al menos el 95% del anticuerpo tiene conformación nativa después de 12 meses, después de 18 meses, después de 24 meses, o después de 36 meses de almacenamiento a 5°C ; (b) al menos 95% del anticuerpo tiene conformación nativa después de 6 meses de almacenamiento a 25°C y 60% de humedad relativa; (c) al menos 95% del anticuerpo tiene conformación nativa después de 3 meses de almacenamiento a 37°C ; (d) la formulación contiene no más de 1% de especies de alto peso molecular (HMW) después de 12 meses, después de 18 meses, después de 24 meses, o después de 36 meses de almacenamiento a 5°C ; (e) la formulación contiene no más de 1% de especies de HMW después de 6 meses de almacenamiento a 25°C y 60% de humedad relativa; o (f) la formulación contiene no más de 1% de especies de HMW después de 3 meses de almacenamiento a 37°C ; según lo determinado por SE-UPLC.

En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica líquida estable que comprende: (a) un anticuerpo biespecífico a una concentración de 100 mg/ml a 200 mg/ml , en donde el anticuerpo biespecífico comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada (A1-HCDR1, A1-HCDR2 y A1-HCDR3) contenidas en una región variable de cadena pesada (HCVR) y tres CDR de cadena

5 ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas en una región variable de cadena ligera (LCVR), y el segundo dominio de unión a antígeno comprende tres CDR de cadena pesada (A2-HCDR1, A2-HCDR2 y A2-HCDR3) contenidas en una región variable de cadena pesada (HCVR) y tres CDR de cadena ligera (LCDR1, LCDR2 y LCDR3) contenidas en una región variable de cadena ligera (LCVR), en donde A1-HCDR1, A1-HCDR2 y A1-HCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente, de las SEQ ID NO: 7, 8 y 9, A2-HCDR1 A2-HCDR2 y A2-HCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente, de las SEQ ID NO: 10, 11 y 12, y LCDR1, LCDR2 y LCDR3 comprenden las secuencias de aminoácidos, respectivamente, de las SEQ ID NO: 13, 14 y 15; (b) un amortiguador que comprende acetato; (c) un estabilizador que comprende un azúcar; y (d) un surfactante que comprende polisorbato, en donde la formulación tiene un pH de 10 5.0 ± 0.5 .

En algunos casos, la concentración de anticuerpos es de 125 mg/ml a 175 mg/ml. En algunos casos, la concentración de anticuerpos es de 150 mg/ml $\pm$ 10 mg/ml. En algunas modalidades, el azúcar es sacarosa. En algunos casos, la concentración de sacarosa es de 4 % a 12 % p/v. En algunos casos, la concentración de sacarosa es de 8 % p/v $\pm$ 1 % p/v. En algunos casos, la concentración del amortiguador de acetato es de 25 mM a 35 mM. En algunos casos, la concentración del amortiguador de acetato es de 30 mM $\pm$ 1 mM. En algunos casos, el polisorbato es polisorbato 20. En algunos casos, la concentración de polisorbato 20 es de 0.01 % p/v a 0.1 % p/v. La concentración de polisorbato 20 es 0.05 % p/v $\pm$ 0.01 % p/v.

En cualquiera de las modalidades de este aspecto de la invención: (a) la formulación contiene no más de 2.5 % de especies de alto peso molecular (HMW) después de 12 meses o después de 24 meses de almacenamiento a -30 °C o -80 °C; (b) la formulación contiene no más de 4 % de especies de HMW después de 6 meses de almacenamiento a 5 °C; o (c) la formulación contiene no más de 6 % de especies de HMW después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C y 60 % de humedad relativa, según se determina por SE-UPLC.

En cualquiera de las diversas modalidades descritas anteriormente, o en la presente descripción, la formulación contiene no más de 40 %, no más de 39 %, no más de 38 %, no más de 37 %, no más de 36 %, o no más de 35 % de una variante de especie glicada, en donde la variante de especie glicada comprende la glicación en el residuo 98 de la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 4, o el residuo 2 de la SEQ ID NO: 9.

En cualquiera de las diversas modalidades descritas anteriormente, o en la presente descripción, el primer dominio de unión a antígeno comprende una HCVR con al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR con al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y el segundo dominio de unión a antígeno comprende una HCVR con al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR con al menos 90 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En cualquiera de las diversas modalidades descritas anteriormente, o en la presente descripción, el primer dominio de unión a antígeno comprende una HCVR con al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR con al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y el segundo dominio de unión a antígeno comprende una HCVR con al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR con al menos 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En cualquiera de las diversas modalidades descritas anteriormente, o en la presente descripción, el primer dominio de unión a antígeno comprende una HCVR con al menos 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR con al menos 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y el segundo dominio de unión a antígeno comprende una HCVR con al menos 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR con al menos 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En cualquiera de las diversas modalidades descritas anteriormente, o en la presente descripción, el primer dominio de unión a antígeno comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y el segundo dominio de unión a antígeno comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica estable que comprende: (a) 5 mg/ml $\pm$ 0.5 mg/ml de un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y el segundo dominio de unión a antígeno comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (b) 30 mM

± 1 mM de amortiguador de acetato de sodio, pH 5.0 ± 0.2 , (c) $0.2 \% \pm 0.02 \%$ p/v de polisorbato 20, y (d) $10 \% \pm 1 \%$ p/v de sacarosa.

En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica estable que comprende: (a) $50 \text{ mg/ml} \pm 5 \text{ mg/ml}$ de un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y el segundo dominio de unión a antígeno comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (b) $30 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ de amortiguador de acetato de sodio, pH 5.0 ± 0.2 , (c) $0.2 \% \pm 0.02 \%$ p/v de polisorbato 20, y (d) $10 \% \pm 1 \%$ p/v de sacarosa.

En un aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica estable que comprende: (a) $150 \text{ mg/ml} \pm 15 \text{ mg/ml}$ de un anticuerpo biespecífico que comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano, en donde el primer dominio de unión a antígeno comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y el segundo dominio de unión a antígeno comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6; (b) $30 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ de amortiguador de acetato de sodio, pH 5.0 ± 0.2 , (c) $0.05 \% \pm 0.01 \%$ p/v de polisorbato 20, y (d) $8 \% \pm 1 \%$ p/v de sacarosa.

En cualquiera de las diversas modalidades descritas anteriormente, o en la presente descripción, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada de IgG humana unida, respectivamente, a la HCVR de cada uno del primer dominio de unión a antígeno y del segundo dominio de unión a antígeno. En algunos casos, la región constante de cadena pesada es del isotipo IgG1. En algunos casos, la región constante de cadena pesada es del isotipo IgG4.

En algunas modalidades, la región constante de cadena pesada unida a la HCVR del primer dominio de unión a antígeno o la región constante de cadena pesada unida a la HCVR del segundo dominio de unión a antígeno, pero no ambos, contiene una modificación de aminoácidos que reduce la unión a la Proteína A con relación a una cadena pesada del mismo isotipo sin la modificación. En algunos

casos, la modificación comprende una sustitución H435R (numeración EU) en una cadena pesada de isotipo IgG1 o IgG4. En algunos casos, la modificación comprende una sustitución H435R y una sustitución Y436F (numeración EU) en una cadena pesada de isotipo IgG1 o IgG4.

En cualquiera de las diversas modalidades descritas anteriormente, o en la presente descripción, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, y SEQ ID NO: 19. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:16 y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 17. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 18 y una región constante de cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19.

En cualquiera de las diversas modalidades descritas anteriormente, o en la presente descripción, el anticuerpo comprende una primera cadena pesada que contiene la HCVR del primer dominio de unión a antígeno y una segunda cadena pesada que contiene la HCVR del segundo dominio de unión a antígeno, en donde la primera cadena pesada comprende los residuos 1-442 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y la segunda cadena pesada comprende los residuos 1-449 de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunas modalidades, el anticuerpo comprende una cadena ligera común que contiene la LCVR del primer y segundo dominios de unión a antígeno, en donde la cadena ligera común comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

En cualquiera de las diversas modalidades descritas anteriormente o en la presente descripción, la formulación farmacéutica puede considerarse estable al medir el cambio porcentual en “especies glicadas”, en donde el cambio porcentual en las especies glicadas es: (i) no más de 1.5 % después de 6 meses de almacenamiento a 5 °C; (ii) no más del 3 % después de 12 meses de almacenamiento a 5 °C; (iii) no más de 1.5 % después de 12 meses, después de 18 meses, o después de 24 meses de almacenamiento a -30 °C; o no más de 1 % después de 12 meses, después de 18 meses, o después de 24 meses de almacenamiento a -80 °C, según lo determinado por cromatografía líquida de ultra rendimiento de intercambio catiónico (CEX-UPLC), y/o mediante cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS).

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica, en donde la composición comprende la formulación farmacéutica como se describió anteriormente o en la presente descripción, y la composición está contenida en un contenedor.

En algunas modalidades, el contenedor es un vial. En algunos casos, el vial es un vial de vidrio transparente de tipo 1 de 2 ml, 5 ml o 10 ml. En algunas modalidades, el contenedor es una jeringa. En algunos casos, la jeringa es de vidrio de tungsteno bajo. En algunas modalidades, el contenedor es una jeringa precargada. En algunas modalidades, la composición farmacéutica está contenida en un autoinyector.

5 En un aspecto, la presente invención proporciona un kit que comprende (i) un contenedor que contiene una composición que comprende la formulación farmacéutica como se describió anteriormente o en la presente descripción, e instrucciones de uso de la composición.

En algunas modalidades, el contenedor es un vial de vidrio. En algunas modalidades, el contenedor es una jeringa precargada. En algunas modalidades, el contenedor es un autoinyector.

10 En algunas modalidades, las instrucciones indican la administración subcutánea de la composición. En algunas modalidades, las instrucciones indican la administración intravenosa de la composición. En un aspecto, la presente invención proporciona una forma de dosificación unitaria que comprende la formulación farmacéutica descrita anteriormente o en la presente descripción, en donde el anticuerpo está presente en una cantidad de 0.1 mg a 500 mg. En algunos casos, el anticuerpo está
15 presente en una cantidad de 5 ± 1 mg a 50 ± 5 mg. En algunos casos, el anticuerpo está presente en una cantidad de 10 ± 1 mg a 200 ± 20 mg. En algunas modalidades, el anticuerpo está presente en una amplificación de 4 mg, 5 mg, 10 mg, 12.5 mg, 40 mg, 50 mg, 150 mg, o 180 mg.

En algunas modalidades, la forma de dosificación unitaria es un vial de vidrio, una jeringa precargada, o un autoinyector.

20 En un aspecto, la presente invención proporciona un contenedor que contiene una composición que comprende la formulación farmacéutica como se describió anteriormente o en la presente descripción. En varias modalidades, el contenedor es un vial de vidrio, una jeringa precargada, o un autoinyector.

25 En varias modalidades, cualquiera de las características o componentes de las modalidades descritas anteriormente o en la presente descripción pueden combinarse, y dichas combinaciones se abarcan dentro del alcance de la presente descripción. Cualquier valor específico descrito anteriormente o en la presente descripción puede combinarse con otro valor relacionado descrito anteriormente o en la presente descripción para recitar un intervalo con los valores que representan los extremos superior e inferior del intervalo, y dichos intervalos y todos los valores que caen dentro de dichos intervalos
30 se abarcan dentro del alcance de la presente descripción. Cada uno de los valores descritos anteriormente o en la presente descripción puede expresarse con una variación de 1 %, 5 %, 10 % o

20 %. Por ejemplo, una concentración de 10 mM puede expresarse como $10 \text{ mM} \pm 0.1 \text{ mM}$ (1 % de variación), $10 \text{ mM} \pm 0.5 \text{ mM}$ (5 % de variación), $10 \text{ mM} \pm 1 \text{ mM}$ (10 % de variación) o $10 \text{ mM} \pm 2 \text{ mM}$ (20 % de variación).

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

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 ilustra la relación entre la potencia relativa del Acml y el nivel de glicación del HCDR3-Lys98. Los niveles de glicación se generaron mediante purificación del Acml glicado y no glicado mediante cromatografía de intercambio catiónico preparativa y mezcla de ambas especies en diferentes relaciones. Los datos de potencia indican que la potencia depende del nivel de glicación.

10 Las Figuras 2A, 2B, 2C y 2D ilustran el efecto del pH en el nivel de especies glicadas y de alto peso molecular (HMW) para el Acml formulado en amortiguador de histidina. Las formulaciones incluyeron 2 mg/ml de Acml en 10 mM de histidina, 10 % p/v de sacarosa, y 0.05 % p/v de polisorbato 20 con diferentes valores de pH, y se incubaron a 5 °C durante un máximo de 36 meses o a 25 °C durante un máximo de 2 meses. Los niveles de glicación se monitorearon mediante
15 cromatografía de intercambio catiónico (CEX-UPLC) a 5 °C (Figura 2A) o 25 °C (Figura 2B), y los niveles de HMW se monitorearon mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SE-UPLC) a 5 °C (Figura 2C) o 25 °C (Figura 2D).

Las Figuras 3A y 3B ilustran el efecto del pH en el nivel de especies glicadas y de HMW para el Acml formulado en amortiguador de acetato. Las formulaciones incluyeron 50 mg/ml de Acml en
20 10 mM de acetato y 5 % p/v de sacarosa con diferentes valores de pH, y se incubaron a 40 °C durante 28 días. Los niveles de glicación se monitorearon mediante CEX-UPLC (Figura 3A), y los niveles de HMW se monitorearon mediante SE-UPLC (Figura 3B).

La Figura 4 ilustra el efecto de la concentración de Acml, la concentración de sacarosa y la concentración de arginina sobre la viscosidad de las formulaciones de Acml. Los gráficos
25 representan el modelado estadístico de los datos experimentales.

La Figura 5 ilustra el efecto de la concentración de Acml, la concentración de sacarosa y la concentración de arginina sobre la osmolalidad de las formulaciones de Acml. Los gráficos representan el modelado estadístico de los datos experimentales.

La Figura 6 ilustra el efecto de la concentración de Acml, la concentración de sacarosa y la
30 concentración de arginina sobre la estabilidad de las formulaciones de Acml. Los gráficos representan el modelado estadístico de los datos experimentales.

Las Figuras 7A y 7B ilustran la estabilidad de dos formulaciones de Acm1 para la administración subcutánea. Ambas formulaciones demuestran una estabilidad comparable cuando se incuban bajo las condiciones evaluadas: 3 meses a 40 °C/75 % de humedad relativa (HR); 6 meses a 25 °C/60 % de HR; y 6 meses a 2-8 °C. Como se muestra en las Figuras, F1 contiene 150 mg/ml de Acm1, 30 mM de acetato a pH 5.0, 8 % p/v de sacarosa, y 0.05 % p/v de polisorbato 80, y F2 contiene 150 mg/ml de Acm1, 30 mM de acetato a pH 5.0, 7 % p/v de sacarosa, 50 mM de arginina, y 0.05 % p/v de polisorbato 80.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Antes de describir la presente invención, debe entenderse que esta invención no se limita a los métodos y condiciones experimentales particulares descritos, ya que tales métodos y condiciones pueden variar. Debe entenderse también que la terminología que se usa en la presente descripción es solamente a efectos de describir únicamente modalidades particulares, y no pretende ser limitante, ya que el alcance de la presente invención solo se limitará por las reivindicaciones adjuntas.

A menos que se defina de cualquier otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en la presente descripción tienen el mismo significado que entiende comúnmente un experto en la técnica a la que pertenece esta invención. Como se usa en la presente descripción, el término "aproximadamente", cuando se usa en referencia a un valor numérico mencionado particular o intervalo de valores, significa que el valor puede variar del valor mencionado en no más de 1 %. Por ejemplo, como se usa en la presente descripción, la expresión "aproximadamente 100" incluye 99 y 101 y todos los valores entre ellos (por ejemplo, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4, etc.).

Aunque cualquiera de los métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en la presente descripción pueden usarse en la práctica o prueba de la presente invención, se describen ahora métodos y materiales ilustrativos. Todas las patentes, solicitudes y publicaciones que no son patentes mencionadas en esta memoria descriptiva se incorporan en la presente descripción mediante referencia en su totalidad.

FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Como se usa en la presente descripción, la expresión "formulación farmacéutica" significa una combinación de al menos un ingrediente activo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3, que es capaz de ejercer un efecto biológico en un animal humano o no humano), y al menos un ingrediente inactivo que, cuando se combina con el ingrediente activo y/o uno o más

ingredientes inactivos adicionales, es adecuado para la administración terapéutica a un animal humano o no humano. El término "formulación", como se usa en la presente descripción, significa "formulación farmacéutica" a menos que se indique específicamente de cualquier otra manera. La presente invención proporciona formulaciones farmacéuticas que comprenden al menos un polipéptido terapéutico. De acuerdo con determinadas modalidades de la presente invención, el polipéptido terapéutico es un anticuerpo biespecífico que se une específicamente a MUC16 humana y CD3 humano o un fragmento de unión al antígeno de esta. Más específicamente, la presente invención incluye, entre otras, formulaciones farmacéuticas que comprenden: (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano; (ii) un amortiguador que comprende acetato; (iii) un cosolvente orgánico que comprende polisorbato; y (iv) un estabilizador que comprende un azúcar. Los componentes adicionales pueden incluirse en las formulaciones de la presente invención si tales componentes no interfieren significativamente con la estabilidad de la formulación. Los componentes ilustrativos específicos y formulaciones incluidos dentro de la presente invención se describen en detalle más abajo.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden, en determinadas modalidades, ser formulaciones fluidas. Como se usa en la presente descripción, la expresión "formulación fluida" significa una mezcla de al menos dos componentes que existe predominantemente en el estado fluido a aproximadamente 2 °C a aproximadamente 45 °C. Las formulaciones fluidas incluyen, entre otros, formulaciones líquidas. Las formulaciones fluidas pueden ser de baja, moderada o alta viscosidad en dependencia de sus constituyentes particulares.

ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS QUE SE UNEN ESPECÍFICAMENTE A MUC16 HUMANA Y A CD3 HUMANO

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender un anticuerpo biespecífico humano, o un fragmento de unión al antígeno de este, que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano.

El término "anticuerpo," tal como se usa en la presente descripción, que incluye un "anticuerpo biespecífico," generalmente pretende referirse a moléculas de inmunoglobulina que comprenden cuatro cadenas polipeptídicas, dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) interconectadas por uniones disulfuro, así como también multímeros de estas (por ejemplo, IgM); sin embargo, las moléculas de inmunoglobulina que consisten de solo cadenas pesadas (es decir, que carecen de cadenas ligeras) también se incluyen dentro de la definición del término "anticuerpo." Cada cadena

pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción como HCVR o VH) y una región constante de cadena pesada. La región constante de cadena pesada comprende tres dominios, CH1, CH2 y CH3. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como LCVR o VL) y una región constante de cadena ligera. La región constante de cadena ligera comprende un dominio (CL1). Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que son más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino al extremo carboxilo en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4.

En determinadas modalidades de la invención, los anticuerpos biespecíficos anti-MUC16 x anti-CD3 de la invención son anticuerpos humanos. El término "anticuerpo humano", tal como se usa en la presente descripción, pretende incluir anticuerpos que tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. Los anticuerpos humanos de la invención pueden incluir residuos de aminoácidos no codificados por secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana (por ejemplo, mutaciones introducidas por mutagénesis aleatoria o específica de sitio *in vitro* o por mutación somática *in vivo*), por ejemplo en las CDR y en particular CDR3. Sin embargo, el término "anticuerpo humano", tal como se usa en la presente descripción, no pretende incluir los anticuerpos en los que las secuencias de CDR derivadas de la línea germinal de otras especies de mamíferos, tales como un ratón, se han injertado en secuencias de marco humanas. En varias modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 es un anticuerpo IgG humano. En varias modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 es un anticuerpo humano del isotipo IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4 o isotipo mixto. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 es un anticuerpo IgG1 humano (es decir, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada de IgG1 humana unida, respectivamente, a la HCVR de cada uno del primer dominio de unión a antígeno y el segundo dominio de unión a antígeno). En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 es un anticuerpo IgG4 humano (es decir, el anticuerpo comprende una región constante de cadena pesada de IgG4 humana unida, respectivamente, a la HCVR de cada uno del primer dominio de unión a antígeno y del segundo dominio de unión a antígeno. En cualquiera de las modalidades descritas anteriormente o en la presente descripción, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 puede comprender una cadena ligera kappa humana. En cualquiera de las modalidades descritas

anteriormente o en la presente descripción, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 puede comprender una cadena ligera lambda humana.

En cualquier modalidad, el anticuerpo biespecífico puede incluir una modificación en una o ambas cadenas pesadas para facilitar la purificación del anticuerpo biespecífico (es decir, el heterodímero) a partir de impurezas homodiméricas. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos incluyen la primera y segunda cadenas pesadas (es decir, la cadena pesada del grupo de unión anti-MUC16, y la cadena pesada del grupo de unión anti-CD3) que son idénticas (por ejemplo, ambas del isotipo IgG1 o IgG4) excepto por una modificación en el dominio CH3 de una o la otra cadena pesada que reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la Proteína A según se compara con un anticuerpo que carece de la modificación. En algunos casos, el dominio CH3 de la primera cadena pesada (por ejemplo, del grupo de unión a anti-MUC16) se une a la Proteína A y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada (por ejemplo, del grupo de unión a anti-CD3) contiene una mutación que reduce o anula la unión a la Proteína A. En algunos casos, la mutación es una modificación de H435R (mediante numeración de la EU; H95R mediante numeración de exones de IMGT). En algunos casos, la mutación es una modificación de H435R (mediante numeración de la EU; H95R mediante numeración de exones de IMGT) y una modificación de Y436F (mediante numeración de la EU; Y96F mediante IMGT). Las modificaciones adicionales que pueden encontrarse dentro del segundo dominio CH3 incluyen: D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, y V422I mediante EU (D16E, L18M, N44S, K52N, V57M, y V82I mediante IMGT) en el caso de los dominios CH3 de IgG1; y Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, y V422I mediante EU (Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, y V82I mediante IMGT) en el caso de los dominios CH3 de IgG4.

En cualquiera de las modalidades, el anticuerpo biespecífico puede incluir una bisagra quimérica. El término “bisagra quimérica” pretende incluir una proteína quimérica que comprende una primera secuencia de aminoácidos derivada de la región de bisagra de una molécula de Ig y una segunda secuencia de aminoácidos derivada de la región de bisagra de una clase o subclase diferente de molécula de Ig. Por ejemplo, la bisagra quimérica comprende, en una modalidad, una primera secuencia de aminoácidos, o una secuencia de “bisagra superior”, derivada de una región de bisagra de IgG1 humana o una región de bisagra de IgG4 humana, y una segunda secuencia de aminoácidos, o una secuencia de “bisagra inferior”, derivada de una región de bisagra de IgG2 humana. En determinadas modalidades, la primera secuencia o “bisagra superior” comprende residuos de aminoácidos de las posiciones 216 a 227 de acuerdo con la numeración de la EU. En algunas modalidades, la segunda secuencia de “bisagra inferior” comprende residuos de aminoácidos de las

posiciones 228 a 236 de acuerdo con la numeración de la EU.

Los anticuerpos de la invención pueden, en algunas modalidades, ser anticuerpos humanos recombinantes. El término "anticuerpo humano recombinante," como se usa en la presente descripción, pretende incluir todos los anticuerpos humanos que se preparan, expresan, crean o aíslan por medios recombinantes, tales como anticuerpos expresados mediante el uso de un vector de expresión recombinante transfectado en una célula huésped, anticuerpos aislados de una biblioteca de anticuerpos humanos combinatoria, anticuerpos aislados de un animal (por ejemplo, un ratón) que es transgénico para los genes de inmunoglobulina humana (véase, por ejemplo, Taylor y otros (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287-6295) o anticuerpos preparados, expresados, creados o aislados por cualquier otro medio que implique el empalme de secuencias génicas de inmunoglobulina humana a otras secuencias de ADN. Tales anticuerpos humanos recombinantes tienen regiones variables y constantes derivadas de secuencias de inmunoglobulinas de la línea germinal humana. En determinadas modalidades, sin embargo, tales anticuerpos humanos recombinantes se someten a mutagénesis *in vitro* (o, cuando se usa un transgénico animal para secuencias de Ig humanas, mutagénesis somática *in vivo*) y por lo tanto las secuencias de aminoácidos de las regiones V_H y V_L de los anticuerpos recombinantes son secuencias que, si bien se derivan de secuencias de línea germinal humana V_H y V_L y se relacionan con estas, pueden no existir naturalmente dentro del repertorio de línea germinal de anticuerpos humanos *in vivo*.

El término "porción de unión al antígeno" o "fragmento de unión al antígeno" de un anticuerpo (o simplemente "porción de anticuerpo" o "fragmento de anticuerpo"), como se usa en la presente descripción, se refiere a uno o más fragmentos de un anticuerpo que retienen la capacidad de unirse específicamente a MUC16 humana o CD3 humano.

Un "anticuerpo aislado", tal como se usa en la presente descripción, pretende referirse a un anticuerpo que está sustancialmente libre de otros anticuerpos que tienen especificidades antigénicas diferentes (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico aislado que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano está sustancialmente libre de anticuerpos que se unen específicamente a antígenos distintos a MUC16 humana y CD3 humano).

El término "se une específicamente", o similares, significa que un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno de este forma un complejo con un antígeno que es relativamente estable bajo condiciones fisiológicas. La unión específica puede caracterizarse por una constante de disociación de al menos aproximadamente 1×10^{-6} M o mayor. Los métodos para determinar si dos moléculas se unen específicamente se conocen bien en la técnica e incluyen, por ejemplo, diálisis de equilibrio,

resonancia de plasmones superficiales, y similares. Un anticuerpo aislado que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano puede, sin embargo, tener reactividad cruzada con otros antígenos, tales como moléculas de MUC16 o CD3 de otras especies (ortólogos). En el contexto de la presente invención, los anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, biespecíficos) que se unen a MUC16 humana y a CD3 humano, así como también a uno o más antígenos adicionales se considera que "se unen específicamente" a MUC16 humana y a CD3 humano. Además, un anticuerpo aislado puede estar sustancialmente libre de otros materiales celulares y/o sustancias químicas.

Los anticuerpos biespecíficos anti-MUC16 x anti-CD3 ilustrativos que pueden incluirse en las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se exponen en el documento WO 2018/067331, cuya descripción se incorpora en su totalidad como referencia.

De acuerdo con determinadas modalidades de la presente invención, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3, o fragmento de unión al antígeno de este, comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano, en el que el primer dominio de unión a antígeno comprende regiones determinantes de complementariedad (CDR) de cadena pesada A1-HCDR1, A1-HCDR2 y A1-HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 7, 8, y 9, y el segundo dominio de unión a antígeno comprende CDR de cadena pesada A2-HCDR1, A2-HCDR2 y A2-HCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 10, 11, y 12. De acuerdo con determinadas modalidades de la presente invención, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 o fragmento de unión a antígenos de este, comprende las regiones determinantes de complementariedad de cadena ligera comunes (tanto para el primer como para el segundo dominio de unión a antígeno) LCDR1-LCDR2-LCDR3, respectivamente, que comprenden las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 13, 14, y 15.

En determinadas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 o fragmento de unión a antígenos de este, comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a la CD3 humano, en el que el primer dominio de unión a antígeno comprende una región variable de cadena pesada (HCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4, y el segundo dominio de unión a antígeno comprende un HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5. En determinadas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 o fragmento de unión a antígenos de este, comprende una

región variable de cadena ligera común (LCVR) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6. En determinadas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 o fragmento de unión a antígenos de este, comprende un primer dominio de unión a antígeno que comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 4/6, y un segundo dominio de unión a antígeno que comprende un par de secuencias de aminoácidos de HCVR/LCVR que comprende las secuencias de aminoácidos de las SEQ ID NO: 5/6. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 comprende los pares de secuencias HCVR/LCVR mencionados anteriormente, y una región constante de cadena pesada de IgG1 humana. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 comprende los pares de secuencias HCVR/LCVR mencionados anteriormente, y una región constante de cadena pesada de IgG4 humana. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 comprende los pares de secuencias HCVR/LCVR mencionados anteriormente, y una región constante de cadena pesada de IgG humana. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 comprende los pares de secuencias de HCVR/LCVR mencionados anteriormente, y una región constante de cadena pesada de IgG1 o IgG4 humana. En algunas modalidades, el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 y una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, una cadena ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. Un anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 con un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana y comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano y comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 se refieren en la presente descripción como Acm1. Este anticuerpo tiene una primera cadena pesada (que incluye la HCVR que se une específicamente a MUC16 humana) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una segunda cadena pesada (que incluye la HCVR que se une específicamente a CD3 humano) que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y una cadena ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3. En algunos casos, la forma madura del anticuerpo puede no incluir los residuos de lisina del extremo C-terminal de las SEQ ID NO: 1 y 2. Por lo tanto, en algunos casos, el grupo de unión anti-MUC16 del Acm1 comprende una

cadena pesada que comprende los residuos 1-442 de la SEQ ID NO: 1, y el grupo de unión anti-CD3 del Acml comprende una cadena pesada que comprende los residuos 1-449 de la SEQ ID NO: 2.

La cantidad de anticuerpo, o fragmento de unión a antígenos de este, contenida dentro de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención puede variar en dependencia de las propiedades específicas deseadas de las formulaciones, así como también las circunstancias y propósitos particulares para los cuales se prevé usar las formulaciones. En determinadas

modalidades, las formulaciones farmacéuticas pueden contener de aproximadamente 0.1 mg/ml a aproximadamente 500 mg/ml de anticuerpo; de aproximadamente 0.5 mg/ml a aproximadamente 400 mg/ml de anticuerpo; de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml de anticuerpo; de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 100 mg/ml; de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 5 mg/ml de anticuerpo; de aproximadamente 10 mg/ml a aproximadamente 30 mg/ml de anticuerpo; de aproximadamente 75 mg/ml a aproximadamente 125 mg/ml; de aproximadamente 5 mg/ml a aproximadamente 50 mg/ml; de aproximadamente 4 mg/ml a aproximadamente 60 mg/ml; o de aproximadamente 2 mg/ml a aproximadamente 55 mg/ml de anticuerpo. Por ejemplo, las formulaciones de la presente invención pueden ser formulaciones

líquidas que comprenden aproximadamente 0.5 mg/ml; aproximadamente 1 mg/ml; aproximadamente 2 mg/ml; aproximadamente 3 mg/ml; aproximadamente 4 mg/ml; aproximadamente 5 mg/ml; aproximadamente 6 mg/ml; aproximadamente 7 mg/ml, aproximadamente 8 mg/ml; aproximadamente 9 mg/ml; aproximadamente 10 mg/ml; aproximadamente 11 mg/ml; aproximadamente 12 mg/ml; aproximadamente 13 mg/ml; aproximadamente 14 mg/ml; aproximadamente 15 mg/ml; aproximadamente 16 mg/ml; aproximadamente 17 mg/ml; aproximadamente 18 mg/ml; aproximadamente 19 mg/ml; aproximadamente 20 mg/ml; aproximadamente 21 mg/ml; aproximadamente 22 mg/ml; aproximadamente 23 mg/ml; aproximadamente 24 mg/ml; aproximadamente 25 mg/ml; aproximadamente 26 mg/ml; aproximadamente 27 mg/ml; aproximadamente 28 mg/ml; aproximadamente 29 mg/ml; aproximadamente 30 mg/ml; aproximadamente 35 mg/ml; aproximadamente 40 mg/ml; aproximadamente 45 mg/ml; aproximadamente 50 mg/ml; aproximadamente 55 mg/ml; aproximadamente 60 mg/ml; aproximadamente 65 mg/ml; aproximadamente 70 mg/ml; aproximadamente 75 mg/ml; aproximadamente 80 mg/ml; aproximadamente 85 mg/ml; aproximadamente 90 mg/ml; aproximadamente 95 mg/ml; aproximadamente 96 mg/ml; aproximadamente 97 mg/ml; aproximadamente 98 mg/ml; aproximadamente 99 mg/ml; aproximadamente 100 mg/ml; aproximadamente 101 mg/ml;

aproximadamente 102 mg/ml; aproximadamente 103 mg/ml; aproximadamente 104 mg/ml; aproximadamente 105 mg/ml; aproximadamente 110 mg/ml; aproximadamente 115 mg/ml; aproximadamente 120 mg/ml; aproximadamente 125 mg/ml; aproximadamente 130 mg/ml; aproximadamente 135 mg/ml; aproximadamente 140 mg/ml; aproximadamente 145 mg/ml; aproximadamente 150 mg/ml; aproximadamente 155 mg/ml; aproximadamente 160 mg/ml; aproximadamente 165 mg/ml; aproximadamente 170 mg/ml; aproximadamente 175 mg/ml; aproximadamente 180 mg/ml; aproximadamente 185 mg/ml; aproximadamente 190 mg/ml; aproximadamente 195 mg/ml; o aproximadamente 200 mg/ml de un anticuerpo o un fragmento de unión a antígenos de este, que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano. En determinadas modalidades, las formulaciones farmacéuticas son formulaciones líquidas que pueden contener 1 ± 0.1 mg/ml a 200 ± 20 mg/ml de anticuerpo; 2 ± 0.2 mg/ml a 10 ± 1 mg/ml de anticuerpo; 1 ± 0.5 mg/ml a 30 ± 5 mg/ml de anticuerpo; 40 ± 4 mg/ml a 60 ± 6 mg/ml de anticuerpo; 1 ± 0.1 mg/ml a 3 ± 0.3 mg/ml de anticuerpo; 3 ± 0.5 mg/ml a 7 ± 0.5 mg/ml de anticuerpo; 45 ± 1 mg/ml a 55 ± 1 mg/ml de anticuerpo; 140 ± 5 mg/ml a 160 ± 5 mg/ml de anticuerpo; o 175 ± 5 mg/ml a 185 ± 5 mg/ml de anticuerpo. En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas contienen 5 ± 0.5 mg/ml de anticuerpo. En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas contienen 50 ± 5 mg/ml de anticuerpo. En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas contienen 150 ± 15 mg/ml de anticuerpo. En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas contienen 2 ± 0.2 mg/ml de anticuerpo. En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas contienen 20 ± 2 mg/ml de anticuerpo. En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas contienen 180 ± 10 mg/ml de anticuerpo.

Bioequivalentes

La presente invención abarca anticuerpos que tienen secuencias de aminoácidos que varían de las de las moléculas ilustrativas descritas en la presente descripción, pero que retienen la capacidad de unirse a MUC16 humana y a CD3 humano. Tales variantes de moléculas pueden comprender una o más adiciones, eliminaciones, o sustituciones de aminoácidos cuando se comparan con la secuencia parental, pero presentan actividad biológica que es esencialmente equivalente a la de los anticuerpos descritos en la presente descripción.

La presente invención incluye moléculas de unión a antígenos que son bioequivalentes a cualquiera de los anticuerpos ilustrativos expuestos en la presente descripción. Dos anticuerpos se consideran bioequivalentes si, por ejemplo, son equivalentes farmacéuticos o alternativas farmacéuticas cuya

velocidad y grado de absorción no muestran una diferencia significativa cuando se administran a la misma dosis molar en condiciones experimentales similares, ya sea dosis única o dosis múltiples. Algunos anticuerpos se considerarán equivalentes o alternativas farmacéuticas si son equivalentes en el grado de su absorción pero no en su velocidad de absorción y aún pueden considerarse bioequivalentes porque tales diferencias en la velocidad de absorción son intencionales y se reflejan en la etiqueta, no son esenciales para la obtención de concentraciones corporales efectivas de fármacos en, por ejemplo, el uso crónico, y se consideran médicamente insignificantes para el producto farmacéutico particular estudiado.

En una modalidad, dos anticuerpos son bioequivalentes si no existen diferencias clínicamente significativas en su seguridad, pureza, y potencia.

En una modalidad, dos anticuerpos son bioequivalentes si un paciente puede cambiarse una o más veces entre el producto de referencia y el producto biológico sin un aumento esperado en el riesgo de efectos adversos, que incluye un cambio clínicamente significativo en la inmunogenicidad, o disminución de la efectividad, en comparación con la terapia continuada sin tal cambio.

La bioequivalencia puede demostrarse mediante métodos *in vivo* e *in vitro*. Las medidas de bioequivalencia incluyen, por ejemplo, (a) una prueba *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos, en la que la concentración del anticuerpo o sus metabolitos se miden en sangre, plasma, suero, u otro fluido biológico en función del tiempo; (b) una prueba *in vitro* que se ha correlacionado con datos de biodisponibilidad *in vivo* de seres humanos y que los predice razonablemente; (c) una prueba *in vivo* en seres humanos u otros mamíferos en la que el efecto farmacológico agudo adecuado del anticuerpo (o su diana) se mide en función del tiempo; y (d) en un ensayo clínico bien controlado que establece la seguridad, eficacia, o biodisponibilidad o bioequivalencia de una proteína de unión a antígeno.

EXCIPIENTES DE FORMULACIÓN y pH

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención comprenden uno o más excipientes. El término "excipiente," como se usa en la presente descripción, significa cualquier agente no terapéutico añadido a la formulación para proporcionar una consistencia, viscosidad o efecto estabilizador deseados.

En determinadas modalidades, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención comprenden uno o más carbohidratos, por ejemplo, uno o más azúcares. El azúcar puede ser un azúcar reductor o un azúcar no reductor. Los "azúcares reductores" incluyen, por ejemplo, azúcares

con un grupo cetona o aldehído y contienen un grupo hemiacetal reactivo, que permite que el azúcar actúe como un agente reductor. Ejemplos específicos de azúcares reductores incluyen fructosa, glucosa, gliceraldehído, lactosa, arabinosa, manosa, xilosa, ribosa, ramnosa, galactosa y maltosa. Los azúcares no reductores pueden comprender un carbono anomérico que es un acetal y no es sustancialmente reactivo con aminoácidos o polipéptidos para iniciar una reacción de Maillard. Los

5 ejemplos específicos de azúcares no reductores incluyen sacarosa, trehalosa, sorbosa, sucralosa, melezitosa y rafinosa. Los ácidos de azúcar incluyen, por ejemplo, ácidos sacáricos, gluconato y otros azúcares polihidroxi y sales de estos. En algunas modalidades, el azúcar es sacarosa. En algunos casos, el azúcar (por ejemplo, sacarosa) actúa como un estabilizador térmico para el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3.

10 La cantidad de azúcar (por ejemplo, sacarosa) contenida dentro de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención variará en dependencia de las circunstancias específicas y los propósitos previstos para los cuales se usan las formulaciones. En ciertas modalidades, las formulaciones pueden contener aproximadamente de 0.1 % a aproximadamente 20 % de azúcar; de

15 aproximadamente 0.5 % a aproximadamente 20 % de azúcar; de aproximadamente 1 % a aproximadamente 20 % de azúcar; de aproximadamente 2 % a aproximadamente 15 % de azúcar; de aproximadamente 5 % a aproximadamente 15 % de azúcar; de aproximadamente 7.5 % a aproximadamente 12.5 % de azúcar; o de aproximadamente 9 % a aproximadamente 11 % de azúcar. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden comprender

20 aproximadamente 0.5 %; aproximadamente 1.0 %; aproximadamente 1.5 %; aproximadamente 2.0 %; aproximadamente 2.5 %; aproximadamente 3.0 %; aproximadamente 3.5 %; aproximadamente 4.0 %; aproximadamente 4.5 %; aproximadamente 5.0 %; aproximadamente 5.5 %; aproximadamente 6.0 %; aproximadamente 6.5 %; aproximadamente 7.0 %; aproximadamente 7.5 %; aproximadamente 8.0 %; aproximadamente 8.5 %; aproximadamente 9.0 %; aproximadamente 9.5 %; aproximadamente 10.0 %; aproximadamente 10.5 %; aproximadamente 11.0 %;

25 aproximadamente 11.5 %; aproximadamente 12.0 %; aproximadamente 12.5 %; aproximadamente 13.0 %; aproximadamente 13.5 %; aproximadamente 14.0 %; aproximadamente 14.5 %; aproximadamente 15 %; o aproximadamente 20 % de azúcar (por ejemplo, sacarosa). En algunas modalidades, las formulaciones contienen aproximadamente 10 % de azúcar (*por ejemplo*, sacarosa). En algunas modalidades, las formulaciones contienen aproximadamente 5 % de azúcar (*por ejemplo*,

30 sacarosa). Cada uno de los porcentajes indicados anteriormente corresponde a un por ciento de peso/volumen (p/v). En algunos casos, las formulaciones contienen de 5 % $\pm$ 1 % a 20 % $\pm$ 4 % p/v

de sacarosa. En algunos casos, las formulaciones contienen de 5 % a 10 % p/v de sacarosa. En algunos casos, las formulaciones contienen de 8 % $\pm$ 0.5 % a 12 % $\pm$ 0.5 % p/v de sacarosa. En algunos casos, las formulaciones contienen 10 % $\pm$ 1 % p/v de sacarosa.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender uno o más cosolventes orgánicos (o estabilizador interfacial) en un tipo y en una cantidad que estabiliza el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 en condiciones de manipulación o agitación brusca, tal como, por ejemplo, agitado orbital. En algunas modalidades, el cosolvente orgánico es un surfactante. Como se usa en la presente descripción, el término "surfactante" significa una sustancia que reduce la tensión superficial de un fluido en el que se disuelve y/o reduce la tensión interfacial entre el aceite y el agua. Los surfactantes pueden ser iónicos o no iónicos. Los surfactantes no iónicos ilustrativos que pueden incluirse en las formulaciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, poli(óxido de etileno) alquilo, poliglucósidos alquilos (por ejemplo, octil glucósido y decil maltósido), alcoholes grasos tales como alcohol cetílico y alcohol oleílico, cocamida MEA, cocamida DEA, y cocamida TEA. Los surfactantes no iónicos específicos que pueden incluirse en las formulaciones de la presente invención incluyen, por ejemplo, polisorbatos tales como polisorbato 20, polisorbato 28, polisorbato 40, polisorbato 60, polisorbato 65, polisorbato 80, polisorbato 81 y polisorbato 85; poloxámeros tales como poloxámero 188 (también conocido como Pluronic F68), poloxámero 407, polipropilén-polietilenglicol; o polietilenglicol (PEG). El polisorbato 20 también se conoce como TWEEN 20, monolaurato de sorbitán y monolaurato de polioxietilénosorbitán. En algunas modalidades, el surfactante es polisorbato 20.

La cantidad de surfactante contenido dentro de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención puede variar en dependencia de las propiedades específicas deseadas de las formulaciones, así como también las circunstancias y propósitos particulares para los cuales se prevé usar las formulaciones. En determinadas modalidades, las formulaciones pueden contener de aproximadamente 0.01 % a aproximadamente 1 % de surfactante; de aproximadamente 0.01 % a aproximadamente 0.5 % de surfactante; de aproximadamente 0.1 % a aproximadamente 0.3 %; de aproximadamente 0.15 % a aproximadamente 0.25 % de surfactante; o de aproximadamente 0.19 % a aproximadamente 0.21 % de surfactante. Por ejemplo, las formulaciones de la presente invención pueden comprender aproximadamente 0.01 %; aproximadamente 0.02 %; aproximadamente 0.03 %; aproximadamente 0.04 %; aproximadamente 0.05 %; aproximadamente 0.06 %; aproximadamente 0.07 %; aproximadamente 0.08 %; aproximadamente 0.09 %; aproximadamente 0.10 %; aproximadamente 0.11 %; aproximadamente 0.12 %; aproximadamente 0.13 %; aproximadamente

0.14 %; aproximadamente 0.15 %; aproximadamente 0.16 %; aproximadamente 0.17 %; aproximadamente 0.18 %; aproximadamente 0.19 %; aproximadamente 0.20 %; aproximadamente 0.21 %; aproximadamente 0.22 %; aproximadamente 0.23 %; aproximadamente 0.24 %; aproximadamente 0.25 %; aproximadamente 0.26 %; aproximadamente 0.27 %; aproximadamente 0.28 %; aproximadamente 0.29 %; o aproximadamente 0.30 % de surfactante (por ejemplo, polisorbato 20). En algunas modalidades, las formulaciones contienen aproximadamente 0.2 % de surfactante (por ejemplo, polisorbato 20). En algunas modalidades, las formulaciones contienen aproximadamente 0.05 % de surfactante (por ejemplo, polisorbato 20). Cada uno de los porcentajes indicados anteriormente corresponde a un por ciento de peso/volumen (p/v). En algunos casos, las formulaciones contienen de 0.01 % $\pm$ 0.005 % a 0.5 % $\pm$ 0.25 % p/v de polisorbato 20. En algunos casos, las formulaciones contienen 0.2 % $\pm$ 0.05 % p/v de polisorbato 20. En algunos casos, las formulaciones contienen 0.2 % $\pm$ 0.01 % p/v de polisorbato 20.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender un amortiguador o sistema amortiguador, que sirve para mantener un pH estable y ayudar a estabilizar el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3. En algunas modalidades, el amortiguador o sistema amortiguador comprende al menos un amortiguador que tiene un intervalo de amortiguación que se superpone completamente o en parte con el intervalo de pH 4.5 a 5.5. En determinadas modalidades, el amortiguador comprende un amortiguador de acetato (por ejemplo, acetato de sodio). En determinadas modalidades, el amortiguador (por ejemplo, acetato) está presente a una concentración de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 50 mM, de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 40 mM, de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 35 mM; de aproximadamente 28 mM a aproximadamente 32 mM; o de aproximadamente 29 mM a aproximadamente 31 mM. En algunas modalidades, el amortiguador (por ejemplo, acetato) está presente a una concentración de aproximadamente 20 mM; aproximadamente 21 mM; aproximadamente 22 mM; aproximadamente 23 mM; aproximadamente 24 mM; aproximadamente 25 mM; aproximadamente 26 mM; aproximadamente 27 mM; aproximadamente 28 mM; aproximadamente 29 mM; aproximadamente 30 mM; aproximadamente 31 mM; aproximadamente 32 mM; aproximadamente 33 mM; aproximadamente 34 mM; aproximadamente 35 mM; aproximadamente 36 mM; aproximadamente 37 mM; aproximadamente 38 mM; aproximadamente 39 mM; o aproximadamente 40 mM. En algunos casos, el amortiguador es un amortiguador de histidina presente a una concentración de aproximadamente 1 mM; aproximadamente 2 mM; aproximadamente 3 mM; aproximadamente 4 mM; aproximadamente 5 mM; aproximadamente 6

mM; aproximadamente 7 mM; aproximadamente 8 mM; aproximadamente 9 mM; aproximadamente 10 mM; aproximadamente 11 mM; aproximadamente 12 mM; aproximadamente 13 mM; aproximadamente 14 mM; aproximadamente 15 mM; aproximadamente 16 mM; aproximadamente 17 mM; aproximadamente 18 mM; aproximadamente 19 mM; o aproximadamente 20 mM. En algunos casos, las formulaciones contienen un amortiguador de histidina a una concentración de 5 mM $\pm$ 1 mM a 15 mM $\pm$ 3 mM. En algunos casos, las formulaciones contienen un amortiguador de histidina a una concentración de 10 mM $\pm$ 1 mM. En algunas modalidades, las formulaciones contienen un amortiguador de acetato (*por ejemplo*, a cualquiera de las concentraciones descritas anteriormente o en la presente descripción). En algunas modalidades, las formulaciones contienen un amortiguador de fosfato (*por ejemplo*, a cualquiera de las concentraciones descritas anteriormente o en la presente descripción).

En algunas modalidades, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención también pueden comprender arginina. En algunos casos, la arginina está presente a una concentración de 1 a 100 mM. En algunas modalidades, la arginina está presente a una concentración de 25 a 75 mM. En algunos casos, la arginina está presente a una concentración de 50 mM $\pm$ 5 mM. En una modalidad, la formulación farmacéutica comprende 30 mM $\pm$ 3 mM de acetato a pH 5.0 $\pm$ 0.1, 7 % $\pm$ 0.7 % p/v de sacarosa, 0.05 % $\pm$ 0.01 % p/v de polisorbato (*por ejemplo*, polisorbato 20), y 50 mM $\pm$ 5 mM de arginina. En algunos casos, el anticuerpo está presente a una concentración de 1 mg/ml a 200 mg/ml, o 150 mg/ml $\pm$ 10 mg/ml.

Durante el proceso de purificación de anticuerpos, puede desearse o ser necesario intercambiar un amortiguador por otro para lograr concentraciones de excipientes, concentración de anticuerpos, pH, etc., adecuados. El intercambio de amortiguador puede lograrse, *por ejemplo*, mediante ultrafiltración/diafiltración (UF/DF) mediante el uso, *por ejemplo*, de una membrana de filtración de flujo tangencial semipermeable. El uso de dichas técnicas, sin embargo, tiene el potencial de provocar el efecto Gibbs-Donnan (Bolton y otros, 2011, *Biotechnol. Prog.* 27(1):140-152). La acumulación de carga positiva en el lado del producto de la membrana durante la concentración de proteína se contrarresta eléctricamente mediante el movimiento preferencial de los iones positivos hacia el lado opuesto de la membrana. La posible consecuencia de este fenómeno es que las concentraciones finales de determinados componentes (*por ejemplo*, acetato) pueden ser menores que las concentraciones objetivo previstas de estos componentes debido a la repulsión electrostática de los excipientes amortiguadores de diafiltración con carga positiva a la proteína de anticuerpo con carga positiva durante la etapa de UF/DF. Por lo tanto, la presente invención incluye formulaciones

en las que la concentración de, por ejemplo, acetato varía respecto a las cantidades o intervalos mencionados en la presente descripción debido al efecto Gibbs-Donnan.

La exclusión por volumen describe el comportamiento de muestras altamente concentradas en las que el soluto capta una porción significativa del volumen total de la solución, especialmente moléculas grandes tales como proteínas, que excluyen el solvente de este espacio. Esto disminuye por tanto el volumen total de solvente disponible para otros solutos a disolver, lo que puede dar como resultado una distribución desigual a través de la membrana de ultrafiltración. Por lo tanto, la presente invención incluye formulaciones en las que la concentración, por ejemplo, de acetato puede variar respecto a las cantidades o intervalos mencionados en la presente descripción debido al efecto de exclusión por volumen.

Durante la fabricación de las formulaciones de la presente invención, pueden producirse variaciones en la composición de la formulación. Estas variaciones pueden incluir la concentración del ingrediente activo, la concentración de los excipientes y/o el pH de la formulación. La presente invención incluye formulaciones que comprenden anticuerpos biespecíficos anti-MUC16 x anti-CD3 que son estables y retienen la potencia con hasta al menos 10 % de variación en la concentración de excipientes. Por ejemplo, en la presente descripción se incluyen formulaciones de anticuerpos biespecíficos anti-MUC16 x anti-CD3, en donde la estabilidad y potencia de las formulaciones no se ve afectada por una variación de $\pm 10\%$, o $\pm 20\%$, en la concentración de anticuerpo, sacarosa, amortiguador de acetato y/o polisorbato.

ESTABILIDAD DE LAS FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención exhiben altos niveles de estabilidad. El término "estable," como se usa en la presente descripción en referencia a las formulaciones farmacéuticas, significa que los anticuerpos dentro de las formulaciones farmacéuticas retienen un grado aceptable de estructura y/o función y/o actividad biológica después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida. Una formulación puede ser estable aunque el anticuerpo contenido en ella no mantenga el 100 % de su estructura y/o función y/o actividad biológica después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida. En ciertas circunstancias, el mantenimiento de aproximadamente 90 %, aproximadamente 95 %, aproximadamente 96 %, aproximadamente 97 %, aproximadamente 98 % o aproximadamente 99 % de la estructura y/o función y/o actividad biológica de un anticuerpo después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida puede considerarse como "estable."

La estabilidad puede medirse, entre otras, mediante la determinación del porcentaje de anticuerpo nativo que permanece en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura dada. El porcentaje de anticuerpo nativo puede determinarse entre otras, mediante cromatografía de exclusión por tamaño (por ejemplo, cromatografía líquida de ultra rendimiento de exclusión por tamaño [SE-HPLC]). Un "grado aceptable de estabilidad," tal como se usa esa frase en la presente descripción, significa que al menos 90 % de la forma nativa del anticuerpo puede detectarse en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura dada. En determinadas modalidades, al menos aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de la forma nativa del anticuerpo puede detectarse en la formulación después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura dada. La cantidad de tiempo definida después de la cual se mide la estabilidad puede ser de al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, al menos 30 meses, al menos 36 meses, o más. La temperatura a la que puede almacenarse la formulación farmacéutica cuando se evalúa la estabilidad puede ser cualquier temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente 45 °C, por ejemplo, almacenamiento a aproximadamente -80 °C, aproximadamente -30 °C, aproximadamente -20 °C, aproximadamente 0 °C, aproximadamente 4 °-8 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 25 °C, aproximadamente 35 °C, aproximadamente 37 °C, o aproximadamente 45 °C. Por ejemplo, una formulación farmacéutica puede considerarse estable si después de 3 meses de almacenamiento a 5 °C, se detecta más de aproximadamente 90 %, 95 %, 96 % o 97 % de anticuerpo nativo mediante SE-HPLC. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 6 meses de almacenamiento a 5 °C, se detecta más de aproximadamente 90 %, 95 %, 96 % o 97 % de anticuerpo nativo mediante SE-HPLC. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 9 meses de almacenamiento a 5 °C, se detecta más de aproximadamente 90 %, 95 %, 96 %, 96.5 %, 97 %, 97.5 %, 98 %, 98.5 %, 99 % o 99.5 % de anticuerpo nativo mediante SE-HPLC. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 12 meses de almacenamiento a 5 °C, se detecta más de aproximadamente 90 %, 95 %, 96 %, 96.5 %, 97 %, 97.5 %, 98 %, 98.5 %, 99 % o 99.5 % de anticuerpo nativo mediante SE-HPLC. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 24 meses de almacenamiento a 5 °C, se detecta más de aproximadamente 90 %, 95 %, 96 %, 96.5 %, 97 %, 97.5 %, 98 %, 98.5 %, 99 % o 99.5 % de

anticuerpo nativo mediante SE-HPLC. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 36 meses de almacenamiento a 5 °C, se detecta más de aproximadamente 90 %, 95 %, 96 %, 96.5 %, 97 %, 97.5 %, 98 %, 98.5 %, 99 % o 99.5 % de anticuerpo nativo mediante SE-HPLC. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 3 meses de almacenamiento a 25 °C (y opcionalmente 60 % de humedad relativa), se detecta más de aproximadamente 90 %, 95 %, 96 %, 96.5 %, 97 %, 97.5 %, 98 %, 98.5 %, 99 % o 99.5 % de anticuerpo nativo mediante SE-HPLC. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C (y opcionalmente 60 % de humedad relativa), se detecta más de aproximadamente 90 %, 95 %, 96 %, 96.5 %, 97 %, 97.5 %, 98 %, 98.5 %, 99 % o 99.5 % de anticuerpo nativo mediante SE-HPLC. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 9 meses de almacenamiento a 25 °C (y opcionalmente 60 % de humedad relativa), se detecta más de aproximadamente 90 %, 95 %, 96 %, 96.5 %, 97 %, 97.5 %, 98 %, 98.5 %, 99 % o 99.5 % de anticuerpo nativo mediante SE-HPLC. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 3 meses de almacenamiento a 37 °C, se detecta más de aproximadamente 90 %, 95 %, 96 % o 97 % de anticuerpo nativo mediante SE-HPLC. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de 1 mes de almacenamiento a 45 °C, (y opcionalmente 75 % de humedad relativa) se detecta más de aproximadamente 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 % o 98 % de anticuerpo nativo mediante SE-HPLC.

Otros métodos pueden usarse para evaluar la estabilidad de las formulaciones de la presente invención tales como, por ejemplo, calorimetría diferencial de barrido (DSC) para determinar la estabilidad térmica, la agitación controlada para determinar la estabilidad mecánica y la absorbancia a aproximadamente 350 nm o aproximadamente 405 nm para determinar las turbidez de la solución. Por ejemplo, una formulación de la presente invención puede considerarse estable si, después de 6 o más meses de almacenamiento de aproximadamente 5 °C a aproximadamente 25 °C, el cambio en la DO₄₀₅ de la formulación es menor que aproximadamente 0.05 (por ejemplo, 0.04, 0.03, 0.02, 0.01 o menos) respecto a la DO₄₀₅ de la formulación en t=0.

La medición de la afinidad de unión del anticuerpo a su diana también puede usarse para evaluar la estabilidad. Por ejemplo, una formulación de la presente invención puede considerarse estable si, después del almacenamiento a, por ejemplo, -80 °C, -30 °C, -20 °C, 5 °C, 25 °C, 37 °C, 45 °C, etc. durante una cantidad de tiempo definida (por ejemplo, de 14 días a 9 meses), el anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 contenido dentro de la formulación se une a MUC16 humana

0.25 %, o 0.1 % del anticuerpo se detecta en una forma agregada. En algunos casos, una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de seis meses de almacenamiento a 5 °C, menos de aproximadamente 5 %, 4.75 %, 4.5 %, 4.25 %, 4 %, 3.75 %, 3.5 %, 3.25 %, 2 % o 1 % del anticuerpo se detecta en una forma agregada. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de seis meses de almacenamiento a 25 °C y 60 % de humedad relativa, menos de aproximadamente 6 %, 5.75 %, 5.5 %, 5.25 %, 5 %, 4.5 %, 4 %, 3.5 %, 3 %, 2.5 %, 2 %, 1.75 %, 1.5 %, 1.25 %, 1 %, 0.75 %, 0.5 %, 0.25 %, o 0.1 % del anticuerpo se detecta en una forma agregada. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de tres meses de almacenamiento a 37 °C, menos de aproximadamente 6 %, 5.75 %, 5.5 %, 5.25 %, 5 %, 4.5 %, 4 %, 3.5 %, 3 %, 2.5 %, 2 %, 1.75 %, 1.5 %, 1.25 %, 1 %, 0.75 %, 0.5 %, 0.25 %, o 0.1 % del anticuerpo se detecta en una forma agregada. Una formulación farmacéutica también puede considerarse estable si después de doce meses de almacenamiento a -30 °C, o -80 °C, menos de aproximadamente 3 %, 2.75 %, 2.5 %, 2.25 %, 2 %, 1.9 %, 1.8 %, 1.7 %, 1.6 %, 1.5 %, 1 %, 0.5 %, o 0.1 % del anticuerpo se detecta en una forma agregada.

La estabilidad puede medirse, entre otras cosas, al determinar el porcentaje de anticuerpo que permanece en la forma de una especie glicada. El porcentaje de “especie glicadas” del anticuerpo puede determinarse mediante cromatografía de intercambio iónico (por ejemplo, cromatografía líquida de alto rendimiento de intercambio catiónico [CEX-HPLC] o cromatografía líquida de ultra rendimiento de intercambio catiónico [CEX-UPLC]) y/o mediante LC-MS. Un "grado aceptable de estabilidad", ya que esa frase se usa en la presente descripción, significa que el cambio porcentual en el porcentaje de anticuerpo en la forma de unas “especies glicadas” no excede una cantidad especificada después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura definida. En determinadas modalidades, un grado aceptable de estabilidad significa que el cambio porcentual en “especies glicadas” es no más de 25 %, no más de 20 %, no más de 15 %, no más de 10 %, no más de 9 %, no más de 8 %, no más de 7 %, no más de 6 %, no más de 5 %, no más de 4 %, no más de 3 %, no más de 2.5 %, no más de 2 %, no más de 1.5 %, o no más de 1 % después del almacenamiento durante una cantidad de tiempo definida a una temperatura dada. La cantidad de tiempo definida después de la cual se mide la estabilidad puede ser de al menos 2 semanas, al menos 28 días, al menos 1 mes, al menos 2 meses, al menos 3 meses, al menos 4 meses, al menos 5 meses, al menos 6 meses, al menos 7 meses, al menos 8 meses, al menos 9 meses, al menos 10 meses, al menos 11 meses, al menos 12 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, al menos 30 meses, al menos 36 meses, o más. La temperatura a la que puede almacenarse la formulación farmacéutica

cuando se evalúa la estabilidad puede ser cualquier temperatura de aproximadamente -80 °C a aproximadamente 45 °C, por ejemplo, almacenamiento a aproximadamente -80 °C, aproximadamente -30 °C, aproximadamente -20 °C, aproximadamente 0 °C, aproximadamente 4 °-8 °C, aproximadamente 5 °C, aproximadamente 25 °C o aproximadamente 45 °C. Por ejemplo, una formulación farmacéutica puede considerarse estable si después de doce meses de almacenamiento a -80 °C o -30 °C, el cambio porcentual en “especies glicadas” no es mayor que 5 %, no es mayor que 4 %, no es mayor que 3 %, no es mayor que 2 %, o no mayor que 1.5 %. En otro ejemplo, una formulación farmacéutica puede considerarse estable si después de seis meses de almacenamiento a 5 °C, el cambio porcentual en “especies glicadas” no es mayor que 5 %, no es mayor que 4 %, no es mayor que 3 %, no es mayor que 2 %, o no es mayor que 1.5 %. En otro ejemplo, una formulación farmacéutica puede considerarse estable si después de doce meses de almacenamiento a 5 °C, el cambio porcentual en “especies glicadas” no es mayor que 5 %, no es mayor que 4 %, o no es mayor que 3 %. En cada caso, la medición puede realizarse mediante el uso de cromatografía líquida de intercambio catiónico de ultra rendimiento (CEX-UPLC) y/o mediante LC-MS.

Las referencias a la estabilidad de las formulaciones farmacéuticas “después” de un período de tiempo específico pretenden significar que se realiza una medición de un parámetro de estabilidad (por ejemplo, % de forma nativa, % de especies HMW, o % de forma ácida) en o aproximadamente al final del período de tiempo específico, y no pretende significar que la formulación farmacéutica necesariamente mantiene el mismo grado de estabilidad para el parámetro medido a partir de entonces. Por ejemplo, la referencia a una estabilidad particular después de 12 meses significa que la medición de la estabilidad se realizó aproximadamente 12 meses después del inicio del estudio. Los métodos adicionales para evaluar la estabilidad de un anticuerpo en la formulación se demuestran en los ejemplos que se presentan más abajo.

Como se ilustra en los ejemplos más abajo, la presente invención se basa, en parte, en el descubrimiento de que la combinación de excipientes reivindicados con un anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 produce una formulación que es estable.

FORMULACIONES ILUSTRATIVAS

De acuerdo con un aspecto de la presente invención, la formulación farmacéutica comprende: (i) un anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano; (ii) un amortiguador que comprende acetato (por ejemplo, acetato de sodio); (iii) un cosolvente orgánico que comprende polisorbato; y (iv) un estabilizador que

comprende un azúcar. De acuerdo con otro aspecto, la formulación farmacéutica comprende: (i) un anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano; (ii) un amortiguador que comprende acetato; y (iii) un estabilizador que comprende un azúcar. De acuerdo con otro aspecto, la formulación farmacéutica comprende: (i) un anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano; (ii) un amortiguador que comprende histidina; (iii) un cosolvente orgánico que comprende polisorbato; y (iv) un estabilizador que comprende un azúcar.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 35 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.1 % p/v a aproximadamente 0.3 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 5 % p/v a aproximadamente 15 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 ± 0.3 .

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, en donde el anticuerpo tiene regiones constantes de cadena pesada del isotipo IgG1 (opcionalmente en las que una de las dos cadenas pesadas tiene una modificación que reduce la unión a la Proteína A con relación a una cadena pesada no modificada del mismo isotipo, y opcionalmente en la que una o ambas de las dos cadenas pesadas tienen una bisagra quimérica); (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 35 mM; (iii)

polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.1 % p/v a aproximadamente 0.3 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 5 % p/v a aproximadamente 15 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 ± 0.3 .

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, en donde el anticuerpo tiene regiones constantes de cadena pesada del isotipo IgG4 (opcionalmente en las que una de las dos cadenas pesadas tiene una modificación que reduce la unión a la Proteína A con relación a una cadena pesada no modificada del mismo isotipo, y opcionalmente en la que una o ambas de las dos cadenas pesadas tienen una bisagra quimérica); (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 35 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.1 % p/v a aproximadamente 0.3 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 5 % p/v a aproximadamente 15 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 ± 0.3 .

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y una cadena ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 25 mM a aproximadamente 35 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.1 % p/v a aproximadamente 0.3 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 5 % p/v a aproximadamente 15 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 ± 0.3 .

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que

comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v $\pm$ 0.02 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v $\pm$ 1 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.3.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, en donde el anticuerpo tiene regiones constantes de cadena pesada del isotipo IgG1 (opcionalmente en las que una de las dos cadenas pesadas tiene una modificación que reduce la unión a la Proteína A con relación a una cadena pesada no modificada del mismo isotipo, y opcionalmente en la que una o ambas de las dos cadenas pesadas tienen una bisagra quimérica); (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v $\pm$ 0.02 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v $\pm$ 1 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.3.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a

aproximadamente 200 mg/ml, en donde el anticuerpo tiene regiones constantes de cadena pesada del isotipo IgG4 (opcionalmente en las que una de las dos cadenas pesadas tiene una modificación que reduce la unión a la Proteína A con relación a una cadena pesada no modificada del mismo isotipo, y opcionalmente en la que una o ambas de las dos cadenas pesadas tienen una bisagra quimérica); (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una
5 concentración de aproximadamente 0.2 % p/v $\pm$ 0.02 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v $\pm$ 1 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.3.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humana y comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una
10 segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y una cadena ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v $\pm$ 0.02 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente
15 10 % p/v $\pm$ 1 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.3.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una
20 LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM; (iii)
25 polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.1.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que
30 comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de

unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, en donde el anticuerpo tiene regiones constantes de cadena pesada del isotipo IgG1 (opcionalmente en las que una de las dos cadenas pesadas tiene una modificación que reduce la unión a la Proteína A con relación a una cadena pesada no modificada del mismo isotipo, y opcionalmente en la que una o ambas de las dos cadenas pesadas tienen una bisagra quimérica); (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 ± 0.1 .

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml, en donde el anticuerpo tiene regiones constantes de cadena pesada del isotipo IgG4 (opcionalmente en las que una de las dos cadenas pesadas tiene una modificación que reduce la unión a la Proteína A con relación a una cadena pesada no modificada del mismo isotipo, y opcionalmente en la que una o ambas de las dos cadenas pesadas tienen una bisagra quimérica); (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 ± 0.1 .

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y una cadena ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml; (ii) histidina a una concentración de 10 mM; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM; (iii)

polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 ± 0.1 .

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de 3 mg/ml $\pm$ 1 mg/ml a 7 mg/ml $\pm$ 1 mg/ml; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v $\pm$ 0.02 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v $\pm$ 1 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 ± 0.3 .

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de 5 mg/ml $\pm$ 0.5 mg/ml; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v $\pm$ 0.02 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v $\pm$ 1 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 ± 0.3 .

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la

secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de 40 mg/ml $\pm$ 2 mg/ml a 60 mg/ml $\pm$ 2 mg/ml; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v $\pm$ 0.02 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v $\pm$ 1 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.3.

5 En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de
10 unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de 50 mg/ml $\pm$ 5 mg/ml; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v $\pm$ 0.02 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de
15 aproximadamente 10 % p/v $\pm$ 1 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.3.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una
20 LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de 5 mg/ml $\pm$ 0.5 mg/ml, en donde el anticuerpo tiene regiones constantes de cadena pesada del isotipo IgG4 (opcionalmente, en
25 las que una de las dos cadenas pesadas tiene una modificación que reduce la unión a la Proteína A con relación a una cadena pesada no modificada del mismo isotipo, y opcionalmente en la que una o ambas de las dos cadenas pesadas tienen una bisagra quimérica); (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v $\pm$ 0.02 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v $\pm$ 1 %
30 p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.3.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de 50 mg/ml $\pm$ 5 mg/ml, en donde el anticuerpo tiene regiones constantes de cadena pesada del isotipo IgG4 (opcionalmente, en las que una de las dos cadenas pesadas tiene una modificación que reduce la unión a la Proteína A con relación a una cadena pesada no modificada del mismo isotipo, y opcionalmente en la que una o ambas de las dos cadenas pesadas tienen una bisagra quimérica); (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v $\pm$ 0.02 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v $\pm$ 1 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.3.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de 5 mg/ml $\pm$ 0.5 mg/ml, en donde el anticuerpo tiene regiones constantes de cadena pesada del isotipo IgG4, y en donde una de las dos cadenas pesadas tiene una modificación (por ejemplo, H435R y Y436F mediante numeración en la EU) en el dominio CH3 que reduce la unión a la Proteína A con relación a un dominio CH3 de IgG4 no modificado; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v $\pm$ 0.02 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v $\pm$ 1 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.3.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende

un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de 50 mg/ml $\pm$ 0.5 mg/ml, en donde el anticuerpo tiene regiones constantes de cadena pesada del isotipo IgG4, y en donde una de las dos cadenas pesadas tiene una modificación (*por ejemplo*, H435R y Y436F mediante numeración en la EU) en el dominio CH3 que reduce la unión a la Proteína A con relación a un dominio CH3 de IgG4 no modificado; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v $\pm$ 0.02 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v $\pm$ 1 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.3.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y una cadena ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 a una concentración de 5 mg/ml $\pm$ 0.5 mg/ml; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v $\pm$ 0.02 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v $\pm$ 1 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.3.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende una primera cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, una segunda cadena pesada que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2, y una cadena ligera común que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3 a una concentración de 50 mg/ml $\pm$ 5 mg/ml; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.2 % p/v $\pm$ 0.02 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v $\pm$ 1 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.3.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de aproximadamente 1 mg/ml a aproximadamente 3 mg/ml; (ii) histidina a una concentración de aproximadamente 10 mM $\pm$ 1 mM; (iii) polisorbato 20 a una concentración de aproximadamente 0.05 % p/v $\pm$ 0.01 % p/v; y (iv) sacarosa a una concentración de aproximadamente 10 % p/v $\pm$ 1 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 6.0 $\pm$ 0.3.

En algunos casos, la formulación farmacéutica líquida estable comprende (i) un anticuerpo biespecífico humano que se une específicamente a MUC16 humana y a CD3 humano y comprende un primer dominio de unión a antígeno que se une específicamente a MUC16 humana que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6, y un segundo dominio de unión a antígeno que se une específicamente a CD3 humano que comprende una HCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5 y una LCVR que comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6 a una concentración de aproximadamente 150 mg/ml a aproximadamente 200 mg/ml; (ii) acetato a una concentración de aproximadamente 30 mM $\pm$ 1 mM; y (iii) sacarosa a una concentración de aproximadamente 5 % p/v $\pm$ 0.5 % p/v, en donde la formulación tiene un pH de 5.0 $\pm$ 0.3.

En cualquiera de estas formulaciones ilustrativas, “estable” puede definirse como: (a) la formulación contiene no más de 2.5 % de especies de alto peso molecular (HMW) después de 12 meses de almacenamiento a 5 °C, según lo determinado por SE-UPLC; (b) la formulación contiene no más de 3.5 % de especies de alto peso molecular (HMW) después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C y 60 % de humedad relativa, según lo determinado por SE-UPLC; (c) la formulación contiene no más de 1.5 % de especies de alto peso molecular (HMW) después de 12 meses de almacenamiento a -30 °C, según lo determinado por SE-UPLC; (d) la formulación contiene no más de 1.5 % de especies de alto peso molecular (HMW) después de 12 meses de almacenamiento a -80 °C, según lo determinado por SE-UPLC; (e) al menos 95 % del anticuerpo tiene conformación nativa después de

12 meses de almacenamiento a 5 °C según lo determinado por SE-UPLC; (f) al menos 95 % del anticuerpo tiene conformación nativa después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C y 60 % de humedad relativa según lo determinado por SE-UPLC; (g) al menos 95 % del anticuerpo tiene conformación nativa después de 3 meses de almacenamiento a 37 °C según lo determinado por SE-UPLC; (h) la formulación contiene no más de 1 % de especies de alto peso molecular (HMW) después de 12 meses de almacenamiento a 5 °C según lo determinado por SE-UPLC; (i) la formulación contiene no más de 1 % de especies de HMW después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C y 60 % de humedad relativa según lo determinado por SE-UPLC; (j) la formulación contiene no más de 1 % de especies de HMW después de 3 meses de almacenamiento a 37 °C; según lo determinado por SE-UPLC; (k) la formulación contiene no más de 2 % de especies de alto peso molecular (HMW) después de 12 meses de almacenamiento a -30 °C o -80C según lo determinado por SE-UPLC; (l) la formulación contiene no más de 4 % de especies de HMW después de 6 meses de almacenamiento a 5 °C según lo determinado por SE-UPLC; o (m) la formulación contiene no más de 6 % de especies de HMW después de 6 meses de almacenamiento a 25 °C y 60 % de humedad relativa según lo determinado por SE-UPLC.

En cualquiera de estas formulaciones ilustrativas, el anticuerpo biespecífico puede incluir una modificación en una o ambas cadenas pesadas para facilitar la purificación del anticuerpo biespecífico (es decir, el heterodímero) a partir de impurezas homodiméricas. En algunas modalidades, los anticuerpos biespecíficos incluyen la primera y segunda cadenas pesadas (es decir, la cadena pesada del grupo de unión anti-MUC16, y la cadena pesada del grupo de unión anti-CD3) que son idénticas (por ejemplo, ambas del isotipo IgG1 o IgG4) excepto por una modificación en el dominio CH3 de una o la otra cadena pesada que reduce la unión del anticuerpo biespecífico a la Proteína A según se compara con un anticuerpo que carece de la modificación. En algunos casos, el dominio CH3 de la primera cadena pesada (por ejemplo, del grupo de unión a anti-MUC16) se une a la Proteína A y el dominio CH3 de la segunda cadena pesada (por ejemplo, del grupo de unión a anti-CD3) contiene una mutación que reduce o anula la unión a la Proteína A. En algunos casos, la mutación es una modificación de H435R (mediante numeración de la EU; H95R mediante numeración de exones de IMGT). En algunos casos, la mutación es una modificación de H435R (mediante numeración de la EU; H95R mediante numeración de exones de IMGT) y una modificación de Y436F (mediante numeración de la EU; Y96F mediante IMGT). Las modificaciones adicionales que pueden encontrarse dentro del segundo dominio CH3 incluyen: D356E, L358M, N384S, K392N, V397M, y V422I mediante EU (D16E, L18M, N44S, K52N,

V57M, y V82I mediante IMGT) en el caso de los dominios CH3 de IgG1; y Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q, y V422I mediante EU (Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q, y V82I mediante IMGT) en el caso de los dominios CH3 de IgG4.

Los ejemplos no limitantes adicionales de formulaciones farmacéuticas incluidas en la presente invención se exponen en otra parte en la presente descripción, que incluye los ejemplos de trabajo que se presentan más abajo.

CONTENEDORES Y MÉTODOS DE ADMINISTRACIÓN

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar contenidas dentro de cualquier contenedor adecuado para el almacenamiento de medicinas y otras composiciones terapéuticas. Por ejemplo, las formulaciones farmacéuticas pueden estar contenidas dentro de un contenedor de vidrio o plástico sellado y esterilizado que tiene un volumen definido tal como un vial, una ampolla, una jeringa, un cartucho, un frasco o una bolsa IV. Pueden usarse diferentes tipos de viales para contener las formulaciones de la presente invención que incluyen, por ejemplo, viales de vidrio o plástico transparentes y opacos (por ejemplo, ámbar). Igualmente, puede usarse cualquier tipo de jeringa para contener y/o administrar las formulaciones farmacéuticas de la presente invención. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica está contenida en una jeringa precargada. En algunas modalidades, la formulación farmacéutica está contenida en una jeringa de aguja fija precargada.

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención pueden estar contenidas dentro de jeringas de "contenido de tungsteno normal" o jeringas de "contenido de tungsteno bajo". Como apreciarán los expertos en la técnica, el proceso de fabricación de jeringas de vidrio generalmente implica el uso de una varilla de tungsteno caliente que funciona para perforar el vidrio, para crear de esta manera un orificio del cual se pueden extraer y expulsar líquidos de la jeringa. Este proceso da como resultado la deposición de cantidades traza de tungsteno en la superficie interior de la jeringa. Pueden usarse lavados y otras etapas de procesamiento subsecuentes para reducir la cantidad de tungsteno en la jeringa. Como se usa en la presente descripción, el término "contenido de tungsteno normal" significa que la jeringa contiene más de 500 partes por mil millones (ppb) de tungsteno. El término "contenido de tungsteno bajo" significa que la jeringa contiene menos de 500 ppb de tungsteno. Por ejemplo, una jeringa con contenido de tungsteno bajo, de acuerdo con la presente invención, puede contener menos de aproximadamente 490, 480, 470, 460, 450, 440, 430, 420, 410, 390, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20, 10 o menos ppb de tungsteno.

Los émbolos de goma usados en las jeringas y los tapones de goma usados para cerrar las aberturas de los viales pueden recubrirse para evitar la contaminación del contenido medicinal de la jeringa o el vial, y/o para conservar su estabilidad. Por lo tanto, las formulaciones farmacéuticas de la presente invención, de acuerdo con determinadas modalidades, pueden estar contenidas dentro de una jeringa que comprende un émbolo recubierto o dentro de un vial que está sellado con un tapón de goma recubierto. Por ejemplo, el émbolo o tapón puede recubrirse con una película de fluorocarbono. Los ejemplos de tapones y/o émbolos recubiertos adecuados para su uso con viales y jeringas que contienen las formulaciones farmacéuticas de la presente invención se mencionan, por ejemplo, en las patentes de los Estados Unidos núms. 4,997,423; 5,908,686; 6,286,699; 6,645,635; y 7,226,554, cuyos contenidos se incorporan en la presente descripción como referencia en su totalidad. Los tapones y émbolos de goma recubiertos ilustrativos particulares que pueden usarse en el contexto de la presente invención están disponibles comercialmente bajo el nombre comercial "FluroTec®," comercializado por West Pharmaceutical Services, Inc. (Lionville, PA). FluroTec® es un ejemplo de un recubrimiento de flurocarbono usado para minimizar o evitar que el producto farmacéutico se adhiera a las superficies de goma. De acuerdo con determinadas modalidades de la presente invención, las formulaciones farmacéuticas pueden estar contenidas dentro de una jeringa con contenido de tungsteno bajo que comprende un émbolo recubierto con fluorocarbono. En algunas modalidades, el contenedor es una jeringa, tal como una jeringa Ompi EZ-Fill™ o una jeringa BD Neopak™. En algunos casos, la jeringa es una jeringa de vidrio larga de 1 ml con un pistón iWest de 1 ml, una aguja de pared delgada 27G y un protector de aguja FM30 o un protector de aguja BD260. En algunos casos, la jeringa es una jeringa de vidrio de 2.25 ml con un pistón West NovaPure™ de 1-3 ml, una aguja de pared delgada de 27G y un protector de aguja FM30 o un protector de aguja BD260. En varias modalidades, la jeringa es una jeringa de 0.5 ml, 0.6 ml 0.7 ml, 0.8 ml, 0.9 ml, 1.0 ml, 1.1 ml, 1.2 ml, 1.3 ml, 1.4 ml, 1.5 ml, 1.6 ml, 1.7 ml, 1.8 ml, 1.9 ml, 2.0 ml, 2.1 ml, 2.2 ml, 2.3 ml, 2.4 ml, 2.5 ml, 2.6 ml, 2.7 ml, 2.8 ml, 2.9 ml, 3.0 ml, 3.5 ml, 4.0 ml, 4.5 ml, 5.0 ml, 5.5 ml, 6.0 ml, 6.5 ml, 7.0 ml, 7.5 ml, 8.0 ml, 8.5 ml, 9.0 ml, 9.5 ml, o 10 ml (por ejemplo, una jeringa de vidrio).

Las formulaciones farmacéuticas pueden administrarse a un paciente por vías parenterales tales como inyección (por ejemplo, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, etc.) o administración percutánea, mucosal, nasal, pulmonar y/u oral. Numerosos dispositivos de suministro autoinyectores y/o plumas reutilizables pueden usarse para suministrar por vía subcutánea las formulaciones farmacéuticas de la presente invención. Los ejemplos incluyen, pero no se limitan a,

AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Woodstock, Reino Unido), pluma DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Burghdorf, Suiza), pluma HUMALOG MIX 75/25™, pluma HUMALOG™, pluma HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Indianápolis, IN), NOVOPEN™ I, II y III (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Copenhagen, Dinamarca), pluma BD™ (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ), OPTIPEN™, OPTIPEN PRO™, OPTIPEN STARLET™ y OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Frankfurt, Alemania), solo para nombrar algunos. Los ejemplos de dispositivos de suministro autoinyectores y/o plumas desechables que tienen aplicaciones en el suministro subcutáneo de una composición farmacéutica de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, la pluma SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), el FLEXPEN™ (Novo Nordisk) y el KWIKPEN™ (Eli Lilly), el autoinyector SURECLICK™ (Amgen, Thousand Oaks, CA), el PENLET™ (Haselmeier, Stuttgart, Alemania), el EPIPEN (Dey, L.P.) y la pluma HUMIRA™ (Abbott Labs, Abbott Park, IL), solo para nombrar algunos. En algunos casos, la formulación farmacéutica está contenida en una jeringa específicamente adaptada para su uso con un autoinyector. Las inyecciones subcutáneas se pueden administrar con una aguja de calibre 20-30 o una aguja de calibre 25-30. En algunos casos, las inyecciones subcutáneas pueden administrarse mediante el uso de una aguja de calibre 25. En algunos casos, las inyecciones subcutáneas pueden administrarse mediante el uso de una aguja de calibre 27. En algunos casos, las inyecciones subcutáneas pueden administrarse mediante el uso de una aguja de calibre 29.

Otro tipo de dispositivo de suministro puede incluir un sistema de seguridad. Dichos dispositivos pueden ser relativamente económicos y funcionar para extender manual o automáticamente un manguito de seguridad sobre una aguja una vez que se completa la inyección. Algunos ejemplos de sistemas de seguridad pueden incluir el dispositivo ERIS de West Pharmaceutical o el dispositivo UltraSafe de Becton Dickinson. Además, en la presente descripción también se contempla el uso de un dispositivo de gran volumen ("LVD"), o inyector en bolo, para suministrar las formulaciones farmacéuticas de la presente invención. En algunos casos, el LVD o el inyector en bolo pueden configurarse para inyectar un medicamento en un paciente. Por ejemplo, un LVD o inyector en bolo puede configurarse para suministrar un volumen "grande" de medicamento (típicamente de aproximadamente 2 ml a aproximadamente 10 ml).

En determinadas modalidades, la formulación farmacéutica se administra por goteo por vía IV, de manera que la formulación se diluye en una bolsa IV que contiene una solución fisiológicamente aceptable. En una modalidad, la composición farmacéutica es una preparación estéril compuesta en una bolsa de infusión intravenosa, de manera que una dosis única del producto farmacológico se

diluye en 100 ml, 250 ml (u otra cantidad similar adecuada para el suministro por goteo intravenoso) de un amortiguador fisiológico (por ejemplo, solución salina al 0.9 %).

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención también pueden estar contenidas en una forma de dosificación unitaria. El término "forma de dosificación unitaria," tal como se usa en la presente descripción, se refiere a una unidad físicamente discreta adecuada como una dosificación unitaria para el paciente a tratar, cada unidad que contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculado para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador, diluyente o excipiente farmacéutico requerido. En varias modalidades, la forma de dosificación unitaria está contenida dentro de un contenedor como se describe en la presente descripción. Los niveles de dosificación reales del ingrediente activo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3) en las formulaciones de la presente invención pueden variar para obtener una cantidad del ingrediente activo que es efectiva para lograr la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición, y modo de administración particular, sin efecto adverso para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una variedad de factores farmacocinéticos que incluyen la actividad de las composiciones particulares de la presente invención empleada, la vía de administración, la hora de administración, la velocidad de excreción del compuesto particular que se emplea, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, sexo, peso, afección, salud general y antecedentes médicos previos del paciente que recibe tratamiento, y factores similares bien conocidos en las técnicas médicas. El término "diluyente" como se usa en la presente descripción se refiere a una solución adecuada para alterar o lograr una concentración o concentraciones ilustrativas o adecuadas como se describe en la presente descripción.

En varias modalidades, la forma de dosificación unitaria contiene una cantidad del ingrediente activo (por ejemplo, un anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3) destinado a un único uso. En varias modalidades, la cantidad del ingrediente activo en la forma de dosificación unitaria es de aproximadamente 0.1 mg a aproximadamente 5,000 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 1,000 mg, y de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 500 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 400 mg, de aproximadamente 100 mg a aproximadamente 200 mg, de aproximadamente 40 mg a aproximadamente 60 mg, de aproximadamente 125 mg a aproximadamente 175 mg, de aproximadamente 160 mg a aproximadamente 200 mg, aproximadamente 1 mg a aproximadamente 250 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 100 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente

50 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 25 mg, de aproximadamente 1 mg a aproximadamente 20 mg, de aproximadamente 5 mg a aproximadamente 15 mg, o rangos o intervalos de estos. Los intervalos intermedios a las cantidades mencionadas anteriormente, por ejemplo, de aproximadamente 2 mg a aproximadamente 100 mg o de 2 mg a 20 mg, también pretenden ser parte de esta invención. Por ejemplo, se pretende incluir intervalos de valores mediante el uso de una combinación de cualquiera de los valores mencionados anteriormente (o valores contenidos dentro de los intervalos mencionados anteriormente) como límites superiores y/o inferiores. En algunas modalidades, la forma de dosificación unitaria contiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, o 200 mg del anticuerpo. En algunas modalidades, la forma de dosificación unitaria contiene 5 mg del anticuerpo. En algunas modalidades, la forma de dosificación unitaria contiene 12.5 mg del anticuerpo. En una modalidad particular, la formulación a menudo se suministra como un líquido en forma de dosificación unitaria. En algunas modalidades, la forma de dosificación unitaria contiene de 3 a 7 mg, o de 8 a 12 mg, de 10 a 15 mg, de 35 a 45 mg, de 45 a 55 mg, de 140 a 160 mg, o de 170 a 190 mg. En algunas modalidades, una forma de dosificación unitaria de acuerdo con la presente invención es adecuada para la administración subcutánea a un paciente (por ejemplo, una forma de dosificación unitaria que contiene el anticuerpo a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml o aproximadamente 200 mg/ml, o 150 mg/ml $\pm$ 5 mg/ml).

La presente invención también incluye métodos para preparar una forma de dosificación unitaria. En una modalidad ilustrativa, un método para preparar una forma de dosificación unitaria farmacéutica incluye combinar la formulación de cualquiera de las modalidades anteriores en un contenedor adecuado (por ejemplo, aquellos contenedores descritos en la presente descripción).

USOS TERAPÉUTICOS DE LAS FORMULACIONES FARMACÉUTICAS

Las formulaciones farmacéuticas de la presente invención son útiles, entre otros, para el tratamiento, la prevención y/o la mejora de cualquier enfermedad o trastorno asociado con una célula que expresa la MUC16 humana. Las enfermedades y trastornos ilustrativos, no limitantes que pueden tratarse mediante la administración de las formulaciones farmacéuticas de la presente invención incluyen cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer pancreático, y cáncer de pulmón de células no pequeñas.

Los métodos terapéuticos de la presente invención comprenden administrar a un sujeto cualquier formulación que comprende un anticuerpo biespecífico anti-MUC16 x anti-CD3 como se describe

en la presente descripción. El sujeto al que se administra la formulación farmacéutica puede ser, por ejemplo, cualquier animal humano o no humano que necesite dicho tratamiento. Por ejemplo, el sujeto puede ser una persona diagnosticada con, o que se considera en riesgo de ser afligida por cualquiera de las enfermedades o trastornos mencionados anteriormente. La presente invención incluye además el uso de cualquiera de las formulaciones farmacéuticas descritas en la presente descripción en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de cualquier enfermedad o trastorno asociado con una célula que expresa la MUC16 humana, que incluye cualquiera de las enfermedades, trastornos y afecciones ilustrativas mencionadas anteriormente.

En algunas modalidades, la presente invención proporciona kits que comprenden una formulación farmacéutica (por ejemplo, un contenedor con la formulación o una forma de dosificación unitaria), como se describe en la presente descripción, y empaque o etiquetado (por ejemplo, un prospecto) con instrucciones para el uso de la formulación farmacéutica para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, como se describió anteriormente. En algunos casos, las instrucciones proporcionan el uso de una forma de dosificación unitaria, como se describe en la presente descripción, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

Un resumen de las secuencias y las SEQ ID NO correspondientes a las que se hace referencia en la presente descripción se muestra en la Tabla 1, más abajo.

Tabla 1: Resumen de secuencias

SEQ ID NO:	Descripción
1	Cadena pesada Anti-MUC16
2	Cadena pesada Anti-CD3
3	Cadena ligera Anti-MUC16 y Anti-CD3
4	HCVR Anti-MUC16
5	HCVR Anti-CD3
6	LCVR común Anti-MUC16 y Anti-CD3
7	HCDR1 Anti-MUC16
8	HCDR2 Anti-MUC16
9	HCDR3 Anti-MUC16
10	HCDR1 Anti-CD3
11	HCDR2 Anti-CD3
12	HCDR3 Anti-CD3
13	LCDR1 común Anti-MUC16 y Anti-CD3
14	LCDR2 común Anti-MUC16 y Anti-CD3
15	LCDR3 común Anti-MUC16 y Anti-CD3
16	Región constante de cadena pesada de IgG4
17	Región constante de cadena pesada de IgG4 con H435R/Y436F
18	Región constante de cadena pesada de IgG1

Ejemplos

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

Ejemplo 1: Desarrollo de formulaciones líquidas estables y liofilizadas de anticuerpos biespecíficos Anti-MUC16 x Anti-CD3

La estabilidad física de una formulación se refiere a propiedades tales como color, aspecto, pH, turbidez, partículas y concentración de proteína. La estabilidad química se refiere a la formación de especies de alto peso molecular (HMW), especies de bajo peso molecular (LMW), variantes de carga y otras modificaciones químicas de la proteína. Las estabilidades físicas y químicas del medicamento Acm1 se evaluaron mediante el uso de los siguientes ensayos: Color y aspecto mediante inspección visual; pH; turbidez medida por el aumento de la densidad óptica (DO) a 405 nm; Análisis de partículas subvisibles mediante Micro-Flow Imaging[™] (MFI); Concentración de proteínas mediante cromatografía líquida de ultra rendimiento de fase inversa (RP-UPLC); La pureza de cada producto farmacológico individual se evaluó mediante el uso de cromatografía líquida de ultra rendimiento de exclusión por tamaño (SE-UPLC), y microchip reducido y no reducido de electroforesis capilar-dodecil sulfato de sodio (MCESDS); El análisis de variante de carga se determinó mediante el uso de UPLC de intercambio catiónico (CEX-UPLC) (el Acm1 glicado se detectó mediante CEX-UPLC), e isoelectroenfoque capilar por imágenes (iCIEF); y se determinó la potencia por bioensayo (la potencia relativa de cada muestra mediante bioensayo y se define como: (Muestra de referencia IC₅₀/Muestra IC₅₀)×100 %; la potencia medida de las muestras de estabilidad de almacenamiento debe estar entre el 50 – 150 % de la potencia medida del estándar de referencia).

Se desarrolló una formulación liofilizada del Acm1 para la administración intravenosa (IV) o subcutánea (SC). El producto farmacológico liofilizado Acm1 se puede reconstituir con agua para inyección (WFI) estéril a una concentración de 2 mg/ml de Acm1 o 20 mg/ml de Acm1 para infusión

IV o inyección SC. Las actividades de desarrollo de la formulación incluyeron la evaluación de amortiguadores, pH, cosolventes orgánicos, surfactantes y sacarosa (como estabilizador térmico) para identificar excipientes que mejoran la estabilidad de las proteínas. Los resultados generados a partir de estos estudios se usaron para desarrollar una formulación liofilizada estable que fuera adecuada para la reconstitución a forma líquida.

5

Selección del amortiguador y pH

El efecto del amortiguador y el pH sobre la estabilidad térmica de Acm1 se examinó inicialmente en formulaciones líquidas mediante la incubación de 2 mg/ml de Acm1 a 45 °C durante 28 días en una serie de sistemas amortiguadores a pH variable. Se estudiaron los siguientes sistemas de pH y amortiguador: acetato (pH 4.5 a 5.5), histidina (pH 5.5 a 6.5) y fosfato (pH 6.5 a 7.5). Estos análisis
10 revelaron que la formación de especies de HMW y variantes de carga fueron las principales vías de degradación. En base a los resultados de la SE-UPLC, la velocidad más baja de formación de especies de HMW y la velocidad más baja de pérdida de monómero se observaron cuando el Acm1 se formuló entre pH 5.5 y 6.5 en amortiguador de histidina o entre pH 4.5 y 5.5 en amortiguador de acetato, como se muestra en la Tabla 2. El análisis de CEX-UPLC también indicó que el perfil de
15 variante de carga era más estable cuando el Acm1 se formuló entre pH 5.5 y 6.5 en amortiguador de histidina o entre pH 4.5 y 5.5 en amortiguador de acetato, como se muestra en la Tabla 2. En relación con el material inicial, se observó una disminución en la cantidad relativa de especies ácidas totales y un aumento concomitante en el pico de la variante de carga principal mediante el análisis de CEX-UPLC después de la incubación del Acm1 a 45 °C durante 28 días.

20

Se aisló un único pico que comprendió aproximadamente el 50 % de las variantes de carga ácida totales observadas en el cromatograma de CEX-UPLC. Los análisis adicionales identificaron el componente primario en este pico como proteína Acm1 que contiene una glicación de Lys98 de cadena pesada (HC) dentro de CDR3 del grupo de unión a MUC16 del anticuerpo biespecífico (la glicación se describe en detalle en el párrafo siguiente). Durante las actividades iniciales asociadas
25 con el desarrollo de la formulación del Acm1, se monitorearon la estabilidad de la variante de carga principal, las especies ácidas totales, las especies básicas totales y la forma glicada de la molécula. Se eligió el amortiguador de histidina, pH 6.0, para la formulación clínicamente favorable, ya que la velocidad de formación de especies de HMW, la velocidad de pérdida de monómero y la velocidad de formación de variantes de carga fueron mínimas en este amortiguador y pH.

30

Se observó un pico ácido derivado del Acm1 que comprende aproximadamente el 50 % de las variantes de carga ácida derivadas del Acm1 totales, mediante análisis de CEX-UPLC. Esta área del pico, detectada mediante CEX-UPLC, disminuyó tras la incubación a 45 °C durante 28 días. Este pico se identificó como una variante de Acm1 que contiene glicación en HC Lys98 dentro de CDR3 del grupo de unión a MUC16 del anticuerpo biespecífico. Junto con la disminución en el nivel de forma glicada del Acm1, se observó un aumento en la potencia mediante bioensayo (véase la Figura 1). Aunque la reacción de desglicación de Lys98 se produce fácilmente en solución, el nivel de glicación en el estado liofilizado permaneció sin cambios cuando la formulación se almacenó a 5 °C durante al menos 12 meses. Además, la potencia permaneció sin cambios cuando la formulación liofilizada se almacenó a 5 °C durante un máximo de 12 meses. Por lo tanto, se eligió una formulación liofilizada como la formulación para el Acm1.

Selección de surfactante/cosolvente orgánico

El efecto de los surfactantes, polisorbato 20 y polisorbato 80, sobre la estabilidad de estrés por agitación y la estabilidad térmica de 5 mg/ml de Acm1 se examinó en formulaciones líquidas (10 % de sacarosa estuvo presente en las formulaciones que contenían surfactantes). Se probaron el polisorbato 20 y el polisorbato 80 a concentraciones de 0 –0.1 % (p/v) para determinar la capacidad de estabilizar el Acm1, (véanse las Tablas 3 y 4, más abajo). El polisorbato 20 y el polisorbato 80 fueron ambos capaces de estabilizar el Acm1 al estrés de agitación cuando están presentes a niveles de 0.01 % o más, como se muestra en la Tabla 3. Cuando el surfactante no se incluyó en la formulación, se observaron aumentos en las especies de HMW de hasta 1.9 %. No se observaron aumentos en las especies de HMW cuando se incluyó ≥ 0.01 % de polisorbato 20 o polisorbato 80 en la formulación.

Se eligieron concentraciones de polisorbato 20 al 0.05 % y polisorbato 80 al 0.05 % para examinar el impacto del estrés térmico en la estabilidad del Acm1. Después de la incubación durante 28 días a 45 °C, se observaron aproximadamente 0.5 % menos especies de HMW y 1.6 % más de monómero de Acm1 para la formulación que contiene polisorbato 20 al 0.05 %, en comparación con la formulación que contiene polisorbato 80 al 0.05 %, como se muestra en la Tabla 4. Además, el Acm1 exhibió un perfil de estabilidad mejorado en presencia de polisorbato 20 al 0.05 %, según lo determinado por el análisis de CEX-UPLC después de la incubación a 45 °C durante 28 días. En relación con el Acm1 formulado en presencia de polisorbato 80 al 0.05 % (véase la Tabla 4), el Acm1 en presencia de polisorbato 20 al 0.05 % mostró (1) una disminución de aproximadamente el

5 % en la formación de especies ácidas, (2) una disminución de aproximadamente el 6 % en la pérdida de las formas de variantes de carga principal y (3) cambios aproximadamente equivalentes en los niveles de especies glicadas. Se eligió el polisorbato 20 al 0.05 % como el surfactante para la formulación del producto farmacéutico Acml porque estabilizó suficientemente la proteína para el estrés de la agitación.

5 Estabilizador térmico/Crioprotector

Los estabilizadores, tales como la sacarosa, a veces pueden añadirse a formulaciones líquidas y liofilizadas de anticuerpos para aumentar la estabilidad térmica y la estabilidad de la proteína al estrés por congelación/descongelación. La inclusión de sacarosa en la formulación del Acml fue necesaria para estabilizar el Acml al estrés por congelación/descongelación. En ausencia de
10 sacarosa, el nivel de especies de HMW aumentó en un 0.4 % después de que el Acml se sometió a cuatro ciclos de congelación y descongelación (véase la Tabla 5). La adición de sacarosa al 10 % a la formulación estabilizó el sustancia farmacológica Acml a cuatro ciclos de congelación/descongelación (véase la Tabla 5).

La sacarosa también fue necesaria como crioprotector para estabilizar el Acml durante el proceso de liofilización. Después de la reconstitución de las formulaciones liofilizadas de Acml, la cantidad
15 relativa de especies de HMW aumentó 0.2 % en ausencia de sacarosa, pero no mostró cambios apreciables cuando la formulación contenía 10 % de sacarosa, como se muestra en la Tabla 6.

Cuando el Acml liofilizado se incubó a 50 °C durante 28 días en ausencia de sacarosa, el nivel de especies de HMW aumentó en un 5.9 % y el nivel de monómero disminuyó en un 7.1 %, según lo
20 determinado por SE-UPLC, (véase la Tabla 7). Además, después de la incubación del Acml a 50 °C en ausencia de sacarosa, el nivel de especies ácidas disminuyó en un 13.8 %, el nivel de especies básicas aumentó en un 14.3 % y el nivel de especies glicadas disminuyó en un 14.7 %, según lo determinado por la CEX-UPLC (véase la Tabla 7). Sin embargo, en presencia de sacarosa al 10 %, no se observaron cambios apreciables en los niveles de variantes de peso molecular o variantes de
25 carga, como se muestra en la Tabla 7.

El diez por ciento de la sacarosa tuvo un impacto positivo en la estabilidad de congelación/descongelación, la estabilidad térmica y la estabilidad del Acml durante el proceso de liofilización. El diez por ciento de sacarosa también se usa como un agente de masa durante la liofilización. Por lo tanto, se eligió sacarosa al 10 % como el estabilizador para el desarrollo de la
30 formulación del Acml liofilizado.

Resumen de los componentes de la formulación seleccionados

El [0001] Acm1 exhibió estabilidad máxima cuando se formuló en presencia de 10 mM de histidina, 0.050 % de polisorbato 20 y 10 % de sacarosa con un pH de 6.0. Las principales vías de degradación identificadas durante el desarrollo de la formulación líquida del Acm1 fueron la formación de especies de HMW y variantes de carga. Una variante de carga observada de interés particular es la glicación de HC-CDR3-Lys98. Se ha demostrado que el nivel de Acm1 glicado permanece inalterado tras la incubación del Acm1 liofilizado bajo condiciones de estrés y condiciones de almacenamiento en tiempo real. La información obtenida durante los estudios de viabilidad de liofilización y desarrollo de la formulación líquida constituyó la base para desarrollar una formulación para el producto farmacológico liofilizado adecuado para aplicaciones clínicas. Para permitir la reconstitución del producto farmacológico liofilizado a una concentración de 2 mg/ml de Acm1 para administración IV, se desarrolló una sustancia farmacológica formulada que contiene 2 mg/ml de Acm1; 10 mM de histidina, pH 6.0, sacarosa al 10 % (p/v) y polisorbato 20 al 0.05 % (p/v).

Tabla 2: Efecto del amortiguador y el pH en la estabilidad de 2 mg/ml del Acm1 incubado a 45 °C durante 28 días

Formulación		2 mg/ml del Acm1 y 10 mM de amortiguador									
Volumen de carga		0.4 ml									
Contenedor/Cierre		Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con tapón de goma de butilo 4432/50 recubierto con FluorTec®									
pH/Amortiguador	Aspecto	Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm)	pH	% total recuperad o de Acm1 mediante RP-UPLC	Cambio en la pureza mediante SE-UPLC ^a			Cambio en las variantes de carga mediante CEX-UPLC ^a			
					% HMW	% Nativo	% LMW	% Ácidas	% Principal	% Básicas	% Glicosados
pH 4.5, acetato	Aprobado	0.00	4.6	104	0.8	-1.6	0.8	-14.5	8.5	6.0	-19.6
pH 5.0, acetato	Aprobado	0.00	5.1	101	1.0	-1.4	0.3	-11.0	9.6	1.5	-21.6
pH 5.5, acetato	Aprobado	0.00	5.7	100	1.4	-1.6	0.3	-7.8	9.4	-1.6	-22.0
pH 5.5, histidina	Aprobado	0.00	5.6	99	1.0	-1.4	0.4	-13.3	4.1	9.2	-22.1
pH 6.0, histidina	Aprobado	0.00	6.1	102	0.7	-0.9	0.2	-9.2	5.8	3.4	-23.2
pH 6.5, histidina	Aprobado	0.00	6.6	102	0.9	-1.1	0.3	-4.8	3.7	1.1	-22.5
pH 6.5, fosfato	Aprobado	0.00	6.4	100	3.8	-4.3	0.5	1.8	-10.1	8.3	-18.2
pH 7.0, fosfato	Aprobado	0.01	6.9	95	3.7	-4.5	0.8	10.5	-14.5	4.0	-19.1
pH 7.5, fosfato	Fallo ^b	0.08	7.4	91	5.3	-7.2	1.8	-19.5	12.9	6.6	ND ^c

^a Informado como un cambio en la pureza en relación con el material inicial. El material de partida (sin incubación) contiene ≥ 97.8 % del pico nativo por SE-UPLC y ≥ 42.6 % del pico principal por CEX-UPLC en todas las formulaciones.

^b La muestra estaba turbia sin partículas visibles.

^c No determinado debido a la extensa degradación de CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; LMW, bajo

peso molecular; ND, no determinado; OD, densidad óptica; RP, fase inversa; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 3: Efecto de la concentración del surfactante en la estabilidad del Acm1 de 5 mg/ml después de la agitación (120 min de la agitación con vórtex)

Formulación	5 mg/ml de Acm1, 10 mM de histidina, pH 6.0										
Volumen de carga	0.4 ml										
Contenedor/Cierre	Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con tapón de goma de butilo 4432/50 recubierto con FluorTec®										
Cosolvente orgánico/Surfactante/Sacarosa	Color y aspecto	Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm)	pH	% total recuperado de Acm1 mediante RP-UPLC	Cambio en la pureza mediante SE-UPLC ^a			Cambio en las variantes de carga mediante CEX-UPLC ^a			
					% HMW	% Nativo	% LMW	% Ácidas	% Principal	% Básicas	% Glicosados
Sin cosolvente/sacarosa	Aprobado	0.02	6.0	99	1.3	-1.3	0.0	-0.1	0.1	0	-0.8
10 % (p/v) de sacarosa	Aprobado	0.02	6.0	100	1.9	-1.9	0.0	1.1	-0.8	-0.2	-0.4
Polisorbato 20 al 0.01 % (p/v) y sacarosa al 10 % (p/v)	Aprobado	0.01	6.0	102	0.0	0.0	0.0	0.1	1.3	-1.5	0.0
Polisorbato 20 al 0.05 % (p/v) y sacarosa al 10 % (p/v)	Aprobado	0.01	6.0	103	0.0	0.0	0.0	-0.4	0.5	-0.1	0.7
Polisorbato 20 al 0.1 % (p/v) y sacarosa al 10 % (p/v)	Aprobado	0.01	6.0	103	0.0	0.0	0.0	-0.2	-1.2	1.3	-0.1
Polisorbato 80 al 0.01 % (p/v) y sacarosa al 10 % (p/v)	Aprobado	0.00	6.0	105	0.0	0.0	0.0	-1.1	0.4	0.7	1.0
Polisorbato 80 al 0.05 % (p/v) y sacarosa al 10 % (p/v)	Aprobado	0.00	6.0	104	0.0	0.0	0.0	0.5	-1.7	1.2	0.2
Polisorbato 80 al 0.1 % (p/v) y sacarosa al 10 % (p/v)	Aprobado	0.00	6.0	105	0.0	0.0	0.0	0.9	-0.6	-0.3	0.2

a Informado como un cambio en la pureza en relación con el material de partida; El material de partida (sin incubación) contiene ≥ 97.7 % del pico nativo mediante SE-UPLC y ≥ 46.8 % del pico principal mediante CEX-UPLC en todas las formulaciones.

CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; HMW, alto peso molecular; LMW, bajo peso molecular; OD, densidad óptica; RP, fase inversa; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 4: Evaluación de la concentración de polisorbato 20 y polisorbato 80: Efecto de la concentración del surfactante en la estabilidad de 5 mg/ml de Acm1 cuando se incuba a 45 °C durante 28 días

Formulación		5 mg/ml de Acm1, 10 mM de histidina, pH 6.0									
Volumen de carga		0.4 ml									
Contenedor/Cierre		Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con tapón de goma de butilo 4432/50 recubierto con FluorTec®									
Cosolvente orgánico/Surfactante/ Sacarosa	Color y aspecto	Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm)	pH	% total recuperado de Acm1 mediante RP-UPLC	Cambio en la pureza mediante SE-UPLC ^a			Cambio en las variantes de carga mediante CEX-UPLC ^a			
					% de HMW	% de Nativo	% de LMW	% de Ácidas	% de Principal	% de Básicas	% de Glicos
Polisorbato 20 al 0.05 % (p/v) y sacarosa al 10 % (p/v)	Aprobado	0.02	6.0	101	9.3	-10.1	0.7	1.1	-0.2	-0.9	-17.6
Polisorbato 80 al 0.05 % (p/v) y sacarosa al 10 % (p/v)	Aprobado	0.01	6.0	100	9.8	-11.7	1.9	6.0	-6.5	0.5	-16.1

a Informado como un cambio en la pureza en relación con el material de partida; El material de partida (sin incubación) contiene ≥ 97.6 % del pico nativo mediante SE-UPLC y ≥ 46.0 % del pico principal mediante CEX-UPLC en todas las formulaciones.

CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; HMW, alto peso molecular; LMW, bajo peso molecular; OD, densidad óptica; RP, fase inversa; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 5: Efecto de la sacarosa al 10 % en la estabilidad del Acm1 de 5 mg/ml después de cuatro ciclos de congelación y descongelación

Formulación		5 mg/ml de Acm1, 10 mM de histidina, pH 5.5 ^a										
Volumen de carga		0.4 ml										
Contenedor/Cierre		Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con tapón de goma de butilo 4432/50 recubierto con FluorTec®										
Cosolvente orgánico/Surfactante/ Sacarosa	Color y aspecto	Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm)	pH a	% total recuperado de Acm1 mediante RP-UPLC	Cambio en la pureza mediante SE-UPLC ^b			Cambio en las variantes de carga mediante CEX-UPLC ^b				
					% de HMW	% de Nativo	% de LMW	% de Ácidas	% de Principal	% de Básicas	% de Glicosados	
Sin sacarosa	Aprobado	0.01	5.5	99	0.4	-0.4	0.1	3.3	-2.9	-0.3	-1.4	
10 % (p/v) de sacarosa	Aprobado	0.00	5.5	101	0.0	0.0	0.0	-0.4	0.3	0.1	0.4	

a Para el desarrollo de la formulación inicial, se usó un pH de 5.5. El pH no se optimizó hasta después de seleccionar el surfactante inicial.

b Informado como un cambio en la pureza en relación con el material inicial; El material inicial (sin incubación) contiene ≥ 97.4 % de pico nativo mediante SE-UPLC y ≥ 42.8 % de pico principal mediante CEX-UPLC en todas las formulaciones.

CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; HMW, alto peso molecular; LMW, bajo peso molecular; OD, densidad óptica; RP, fase inversa; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 6: Estabilización del Acm1 durante la liofilización mediante la inclusión de sacarosa al 10 %

Formulación preliofilizada		5 mg/ml de Acm1, 10 mM de histidina, pH 6.0, 0.05 % (p/v) de polisorbato 20									
Formulación reconstituida		5 mg/ml de Acm1, 10 mM de histidina, pH 6.0, 0.05 % (p/v) de polisorbato 20									
Volumen de carga		0.5 ml									
Contenedor/Cierre		Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con tapón de goma de butilo 4432/50 recubierto con FluorTec®									
Estabilizador térmico	Color y aspecto	Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm)	pH	% total recuperado de Acm1 mediante RP-UPLC	Cambio en la pureza mediante SE-UPLC ^c			Cambio en las variantes de carga mediante CEX-UPLC ^c			
					% de HMW	% de Nativo	% de LMW	% de Ácidas	% de Principal	% de Básicas	% de Glicosados
Sin sacarosa	Aprobado	0.01	6.1	105	0.2	-0.1	-0.1	-0.4	0.2	0.1	0.2
10 % (p/v) de sacarosa	Aprobado	0.02	6.1	104	0.0	0.1	-0.1	-0.6	0.5	0.1	0.2

(El Acm1 se reconstituyó y analizó inmediatamente después de que se completó la liofilización)

c Informado como un cambio en la pureza en relación con el material inicial; El material inicial (sin liofilización) contiene ≥ 98.7 % de pico nativo mediante SE-UPLC y ≥ 45.1 % de pico principal por CEX-UPLC en ambas formulaciones.

CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; HMW, alto peso molecular; LMW, bajo peso molecular; OD, densidad óptica; RP, fase inversa; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 7: Efecto de la presencia de sacarosa al 10 % en la estabilidad del DP del Acm1 liofilizado incubado a 50 °C durante 28 días

Formulación preliofilizada		5 mg/ml de Acm1, 10 mM de histidina, pH 6.0, 0.05 % (p/v) de polisorbato 20									
Formulación reconstituida		5 mg/ml de Acm1, 10 mM de histidina, pH 6.0, 0.05 % (p/v) de polisorbato 20									
Volumen de carga		0.5 ml									
Contenedor/Cierre		Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 2 ml con tapón de goma de butilo 4432/50 recubierto con FluorTec®									
Estabilizador térmico	Color y aspecto	Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm)	pH	% total recuperado de Acm1 mediante RP-UPLC	Cambio en la pureza mediante SE-UPLC ^a			Cambio en las variantes de carga mediante CEX-UPLC ^a			
					% de HMW	% de Nativo	% de LMW	% de Ácidas	% de Principal	% de Básicas	% de Glicosados
Sin sacarosa	Aprobado	0.00	6.1	94	5.9	-7.1	1.1	-13.8	-0.5	14.3	-14.7
10 % (p/v) de sacarosa	Aprobado	0.01	6.1	98	0.0	-0.3	0.3	-1.1	0.8	0.4	-0.9

a Informado como un cambio en la pureza en relación con el material inicial; El material inicial (sin liofilización) contiene ≥ 98.7 % de pico nativo por SE-UPLC y ≥ 45.1 % de pico principal por CEX-UPLC en ambas formulaciones.

CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; HMW, alto peso molecular; LMW, bajo peso molecular; OD, densidad óptica; RP, fase inversa; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Ejemplo 2: Almacenamiento y estabilidad al estrés de las formulaciones

Se realizaron estudios para evaluar el almacenamiento, la estabilidad acelerada y la estabilidad al estrés (agitación) de formulaciones líquidas, liofilizadas y reconstituidas del producto farmacológico Acm1.

Los resultados del análisis del producto farmacológico liofilizado Acm1 muestran que el producto farmacológico Acm1 fue física y químicamente estable cuando se almacenó a 5 °C durante al menos 36 meses (véase las Tablas 8, 10 y 12). No se detectó ningún cambio apreciable en la estabilidad física o química en ninguno de los atributos monitoreados. Los resultados del análisis del producto farmacológico liofilizado Acm1 después de la incubación en condiciones aceleradas se proporcionan en las Tablas 9, 11 y 13. Después de la incubación durante 3 meses a 37 °C, no se detectó ningún

cambio apreciable en la estabilidad física o química de Acm1 en ninguno de los atributos monitoreados. De manera similar, no se detectó ningún cambio apreciable en la estabilidad física o química en ninguno de los atributos monitoreados después de la incubación durante 6 meses a 25 °C/60 % de humedad relativa (HR). Después de la incubación durante 3 meses a 50 °C, se observaron aumentos menores en las especies de HMW (0.3 %) y las especies básicas (7.6 % mediante CEX-UPLC y 4.0 % mediante iCIEF). El Acm1 mantuvo la potencia, según lo determinado por el análisis de bioensayo después de la incubación en condiciones aceleradas.

Tabla 8: Estabilidad en investigación del producto farmacológico liofilizado Acm1, almacenado a 5 °C

Formulación preliofilizada		2 mg/ml de Acm1, 10 mM de histidina, pH 6.0, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.05 % (p/v) de polisorbato 20								
Volumen de carga		2.5 ml								
Contenedor/Cierre		Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 5 ml con tapón West V10-F597W 4432/50 B2-TR								
		Duración del almacenamiento a 5 °C (meses)								
Ensayo ^a		0	1	3 ^b	6	9	12	18	24	36
Análisis del producto farmacológico liofilizado										
Aspecto del pastel		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
% de humedad		0.68	NR	0.81	0.81	NR	0.75	NR	0.76	1.15
Tiempo de reconstitución (segundos)		62	55	55	54	55	54	56	55	33
Análisis del producto farmacológico reconstituido ^c										
Color y aspecto		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pH		6.0	6.0	6.0	6.1	6.0	6.1	6.1	6.0	6.1
Análisis de partículas mediante MFI (partículas / contenedor)	2-10 µm	200	NR	84	424	NR	232	NR	759	429
	≥ 10 µm	10	NR	7	10	NR	17	NR	30	21
	≥ 25 µm	5	NR	2	2	NR	1	NR	5	5
% de Proteína recuperada mediante RP-UPLC		100	99	104	101	100	100	103	101	96
Pureza mediante MCE-SDS	Sin reducción; % del pico principal	100	NR	100	100	NR	100	NR	100	100
	Reducido; % de cadena pesada + ligera	100	NR	100	100	NR	100	NR	100	100
Pureza mediante SE-UPLC	% de HMW	0.6	0.5	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.5
	% de Nativo	99.0	99.1	99.1	99.0	99.0	99.0	99.0	98.8	99.1
	% de LMW	0.4	0.4	0.4	0.5	0.4	0.5	0.4	0.6	0.4
Análisis de variantes de carga mediante CEX-UPLC	% de Ácidas	50.2	51.9	50.5	51.8	51.3	52.1	51.6	51.7	51.3
	% de Principal	47.3	45.5	46.9	44.5	45.5	44.8	44.9	45.0	46.1
	% de Básicas	2.5	2.7	2.6	3.7	3.2	3.1	3.5	3.4	2.6
	% de Glicosados	28.4	27.9	28.5	27.6	27.4	27.6	27.5	27.1	26.4
Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de Ácidas	47.0	NR	48.9	48.1	NR	48.9	NR	48.6	48.2
	% de Principal	44.6	NR	43.2	43.7	NR	43.0	NR	43.8	43.6
	% de Básicas	8.5	NR	8.0	8.2	NR	8.1	NR	7.6	8.3
% de Potencia relativa (bioensayo)		125	NR	73	NR	NR	89	NR	67	106

^a CEX, intercambio catiónico; DS: sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, enfoque isoeléctrico capilar por imágenes; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; MFI, Micro-Flow Imaging™; NR, no se requiere; OD, densidad óptica; RP, fase inversa; SDS, dodecil sulfato de sodio; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

^b La duración real del almacenamiento de estas muestras es de 4 meses

^c Las muestras se reconstituyeron con WFI estéril hasta 2 mg/ml de Acm1

Tabla 9: Estabilidad en investigación del producto farmacológico liofilizado Acm1, almacenado en condiciones aceleradas

Formulación preliofilizada			2 mg/ml de Acm1, 10 mM de histidina, pH 6.0, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.05 % (p/v) de polisorbato 20				
Volumen de carga			2.5 ml				
Contenedor/Cierre			Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 5 ml con tapón West V10-F597W 4432/50 B2-TR				
			Sin almacenam iento	Almacenamiento a 25 °C/60 % de HR (meses)		Almacenamiento a 37 °C (meses)	
Ensayo			t=0	3	6	1	3
Análisis del producto farmacológico liofilizado							
Aspecto del pastel			Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
% de humedad			0.68	1.01 ^a	0.97	NR	0.89
Tiempo de reconstitución (segundos)			62	54	52	54	55
Análisis del producto farmacológico reconstituido ^b							
Color y aspecto			Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm)			0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pH			6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Análisis de partículas mediante MFI (partículas/contenedor)	2-10 µm		200	68a	332	NR	800
	≥ 10 µm		10	8a	5	NR	52
	≥ 25 µm		5	3a	2	NR	25
% de Proteína recuperada mediante RP-UPLC			100	104	102	99	104
Pureza mediante MCE-SDS	Sin reducción; % del pico principal		100	100	100	NR	100
	Reducido; % de cadena pesada + ligera		100	100	100	NR	100
Pureza mediante SE-UPLC	% de HMW		0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
	% de Nativo		99.0	99.0	99.0	99.1	98.9
	% de LMW		0.4	0.4	0.5	0.4	0.5
Análisis de variantes de carga mediante CEX-UPLC	% de Ácidas		50.2	50.3	51.8	51.4	50.0
	% de Principal		47.3	47.0	44.3	46.0	47.1
	% de Básicas		2.5	2.7	3.9	2.7	2.9
	% de Glicosados		28.4	28.4	27.2	28.0	28.2
	% de Ácidas		47.0	48.1	48.4	NR	46.8
	% de Principal		44.6	43.2	42.7	NR	44.3

Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de Básicas	8.5	8.7	9.0	NR	9.0
% de Potencia relativa (bioensayo)		125	102	NR	NR	93

a La duración real del almacenamiento es de 4 meses

b Las muestras se reconstituyeron con WFI estéril a 2 mg/ml de Acm1

CEX, intercambio catiónico; DS: sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, enfoque isoelectrico capilar por imágenes; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; MFI, imágenes de microflujo; NR, no se requiere; OD, densidad óptica; RP, fase inversa; SDS: dodecil sulfato de sodio; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 10: Estabilidad en investigación del producto farmacológico liofilizado Acm1, almacenado a 5 °C

Formulación preliofilizada		2 mg/ml de Acm1, 10 mM de histidina, pH 6.0, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.05 % (p/v) de polisorbato 20								
Volumen de carga		2.5 ml								
Contenedor/Cierre		Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 5 ml con tapón West V10-F597W 4432/50 B2-TR								
		Duración del almacenamiento a 5 °C (meses)								
Ensayo ^a		0	1	3	6	9	12	18	24	36
Análisis del producto farmacológico liofilizado										
Aspecto del pastel		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
% de humedad		0.44	NR	0.28	0.40	NR	0.52	NR	0.26	0.74
Tiempo de reconstitución (segundos)		49	49	48	46	48	45	53	49	44
Análisis del producto farmacológico reconstituido ^b										
Color y aspecto		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.01
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Análisis de partículas mediante MFI (partículas/contenedor)	2-10 µm	176	NR	129	207	NR	163	NR	193	710
	≥ 10 µm	7	NR	3	5	NR	3	NR	8	11
	≥ 25 µm	3	NR	0	0	NR	2	NR	0	2
% de Proteína recuperada mediante RP-UPLC		100	105	107	107	107	106	109	104	109
Pureza mediante MCE-SDS	Sin reducción; % del pico principal	100	NR	100	100	NR	100	NR	100	100
	Reducido; % de cadena pesada + ligera	100	NR	100	100	NR	100	NR	100	100
Pureza mediante SE-UPLC	% de HMW	0.7	0.7	0.7	0.7	0.6	0.7	0.7	0.7	0.7
	% de Nativo	99.0	99.0	98.9	98.9	98.9	98.9	98.8	98.7	98.8
	% de LMW	0.4	0.4	0.5	0.4	0.4	0.4	0.5	0.6	0.6
Análisis de variantes de carga mediante CEX-UPLC	% de Ácidas	48.8	48.4	49.1	49.3	48.3	49.4	49.3	49.7	49.6
	% de Principal	47.7	47.9	46.7	46.6	47.7	47.0	47.8	46.2	47.0
	% de Básicas	3.5	3.7	4.3	4.1	4.0	3.6	2.9	4.0	3.5
	% de Glicosados	27.1	27.1	27.1	26.9	26.9	26.5	26.3	24.9	25.7

Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de Ácidas	47.5	NR	47.8	47.6	NR	45.6	NR	46.9	46.0
	% de Principal	43.5	NR	43.1	43.0	NR	45.0	NR	43.8	44.9
	% de Básicas	9.0	NR	9.1	9.3	NR	9.4	NR	9.4	9.1
% de Potencia relativa (bioensayo)		70	NR	139	110	NR	109	NR	88	84

a CEX, intercambio catiónico; DS: sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, enfoque isoeléctrico capilar por imágenes; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; MFI, Micro-Flow Imaging™; NR, no se requiere; OD, densidad óptica; RP, fase inversa; SDS, dodecil sulfato de sodio; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

^b Las muestras se reconstituyeron con WFI estéril a 2 mg/ml de Acml

Tabla 11: Estabilidad en investigación del producto farmacológico liofilizado Acml, almacenado en condiciones aceleradas

Formulación preliofilizada		2 mg/ml de Acml, 10 mM de histidina, pH 6.0, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.05 % (p/v) de polisorbato 20				
Volumen de carga		2.5 ml				
Contenedor/Cierre		Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 5 ml con tapón West V10-F597W 4432/50 B2-TR				
		Sin almacenamiento	Almacenamiento a 25 °C/60 % de HR (meses)		Almacenamiento a 37 °C (meses)	
Ensayo		t=0	3	6	1	3
Análisis del producto farmacológico liofilizado						
Aspecto del pastel		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
% de humedad		0.44	0.60	0.80	NR	0.71
Tiempo de reconstitución (segundos)		49	48	50	43	51
Análisis del producto farmacológico reconstituido ^a						
Color y aspecto		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Análisis de partículas mediante MFI (partículas/contenedor)	2-10 µm	176	277	133	NR	281
	≥ 10 µm	7	0	8	NR	0
	≥ 25 µm	3	0	3	NR	0
% de Proteína recuperada mediante RP-UPLC		100	106	108	105	105
Pureza mediante MCE-SDS	Sin reducción; % del pico principal	100	100	100	100	100
	Reducido; % de cadena pesada + ligera	100	100	100	100	100
Pureza mediante SE-UPLC	% de HMW	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
	% de Nativo	99.0	98.9	98.9	98.9	98.8
	% de LMW	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5
Análisis de variantes de carga mediante CEX-UPLC	% de Ácidas	48.8	49.0	49.1	48.1	48.5
	% de Principal	47.7	46.7	46.3	48.0	46.6
	% de Básicas	3.5	4.4	4.6	3.9	4.9

	% de Glicosados	27.1	27.0	26.7	27.0	26.5
Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de Ácidas	47.5	46.5	47.4	47.7	46.1
	% de Principal	43.5	44.6	43.1	42.8	44.5
	% de Básicas	9.0	9.0	9.4	9.5	9.3
% de Potencia relativa (bioensayo)		70	121	95	NR	111

a Las muestras se reconstituyeron con WFI estéril hasta 2 mg/ml de Acm1

5 CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, enfoque isoelectrico capilar por imágenes; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; MFI, Micro-Flow Imaging™; NR, no se requiere; OD, densidad óptica; RP, fase inversa; SDS, dodecil sulfato de sodio; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

10 Tabla 12: Estabilidad en investigación del producto farmacéutico liofilizado Acm1 50 mg, almacenado a 5 °C

Formulación preliofilizada		20 mg/ml de Acm1, 10 mM de histidina, pH 6.0, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.05 % (p/v) de polisorbato 20								
Volumen de carga		2.5 ml								
Contenedor/Cierre		Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 5 ml con tapón West V10-F597W 4432/50 B2-TR								
		Duración del almacenamiento a 5 °C (meses)								
Ensayo ^a		0	1	3	6	9	12	18	24	36 ^b
Análisis del producto farmacológico liofilizado										
Aspecto del pastel		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
% de humedad		0.74	NR	NR	0.99	NR	1.16	NR	1.56	1.18
Tiempo de reconstitución (segundos)		49	44	60	66	55	53	48	47	29
Análisis del producto farmacológico reconstituido ^c										
Color y aspecto		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pH		5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	5.9	6.0	6.0
Análisis de partículas mediante MFI (partículas/contenedor)	2-10 µm	259	NR	NR	1,274	NR	2,707	NR	2,343	NA
	≥ 10 µm	30	NR	NR	28	NR	48	NR	21	NA
	≥ 25 µm	5	NR	NR	3	NR	4	NR	1	NA
% de Proteína recuperada mediante RP-UPLC		100	100	103	101	100	99	99	91	108
Pureza mediante MCE-SDS	Sin reducción; % del pico principal	100	NR	NR	100	NR	100	NR	100	100
	Reducido; % de cadena pesada + ligera	100	NR	NR	100	NR	100	NR	100	100
Pureza mediante SE-UPLC	% de HMW	0.8	0.8	0.9	0.8	0.9	0.9	0.9	0.8	0.9
	% de Nativo	98.8	98.9	98.6	98.8	98.7	98.7	98.7	98.8	98.6
	% de LMW	0.4	0.4	0.5	0.4	0.5	0.4	0.5	0.4	0.5
Análisis de variantes de carga mediante CEX-UPLC	% de Ácidas	47.7	48.0	48.8	48.3	49.5	48.3	48.1	49.7	47.7
	% de Principal	47.1	47.3	45.9	46.8	42.5	45.3	46.2	43.8	46.7
	% de Básicas	5.1	4.7	5.3	4.8	8.0	6.4	5.7	6.5	5.5
	% de Glicosados	24.4	24.0	24.5	24.2	21.3	22.1	23.2	22.2	23.0

Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de Ácidas	45.1	NR	NR	44.8	NR	47.8	NR	47.7	47.2
	% de Principal	46.0	NR	NR	46.5	NR	45.5	NR	45.1	45.3
	% de Básicas	8.8	NR	NR	8.7	NR	6.7	NR	7.2	7.4
% de Potencia relativa (bioensayo)		98	NR	NR	104	NR	104	NR	91	118

^a CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, enfoque isoeléctrico capilar por imágenes; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; MFI, Micro-Flow Imaging™; NA, no disponible; NR, no se requiere; OD, densidad óptica; RP, fase inversa; SDS, dodecil sulfato de sodio; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

^b Los datos de la MFI de 36 meses no están disponibles debido a la falla del instrumento y a la disponibilidad insuficiente de muestras de respaldo.

^c Las muestras se reconstituyeron con WFI estéril a 20 mg/ml de Acm1

Tabla 13: Estabilidad en investigación del producto farmacéutico liofilizado Acm1 50 mg, almacenado en condiciones aceleradas

Formulación preliofilizada		20 mg/ml de Acm1, 10 mM de histidina, pH 6.0, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.05 % (p/v) de polisorbato 20			
Volumen de carga		2.5 ml			
Contenedor/Cierre		Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 5 ml con tapón West V10-F597W 4432/50 B2-TR			
		Sin almacenamiento	Almacenamiento a 25 °C/60 % de HR (meses)	Almacenamiento a 50 °C (meses)	
Ensayo ^a		t=0	6	1	3
Análisis del producto farmacológico liofilizado					
Aspecto del pastel		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
% de humedad		0.74	1.00	NR	1.00
Tiempo de reconstitución (segundos)		49	48	55	62
Análisis del producto farmacológico reconstituido ^b					
Color y aspecto		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00
pH		5.9	5.9	5.9	5.9
Análisis de partículas mediante MFI (partículas/contenedor)	2-10 µm	259	1,227	NR	11,225
	≥ 10 µm	30	36	NR	429
	≥ 25 µm	5	9	NR	64
% de Proteína recuperada mediante RP-UPLC		100	99	100	99
Pureza mediante MCE-SDS	Sin reducción; % del pico principal	100	100	NR	100
	Reducido; % de cadena pesada + ligera	100	100	NR	100
Pureza mediante SE-UPLC	% de HMW	0.8	1.1	0.9	1.1
	% de Nativo	98.8	98.4	98.7	98.3
	% de LMW	0.4	0.5	0.4	0.5
Análisis de variantes de carga mediante CEX-UPLC	% de Ácidas	47.7	47.4	44.5	43.9
	% de Principal	47.1	46.9	47.2	43.4
	% de Básicas	5.1	5.7	8.4	12.7
	% de Glicosados	24.4	23.7	22.3	20.5
Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de Ácidas	45.1	48.4	NR	48.4
	% de Principal	46.0	45.3	NR	38.8
	% de Básicas	8.8	6.3	NR	12.8
% de Potencia relativa (bioensayo)		98	118	NR	NR

^a CEX, intercambio catiónico; DS: sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, enfoque isoeléctrico capilar por imágenes; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; MFI, imágenes de microflujo; NR,

no se requiere; OD, densidad óptica; RP: fase inversa; SDS: dodecil sulfato de sodio; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

^b Las muestras se reconstituyeron con WFI estéril a 20 mg/ml de Acm1

También se realizaron estudios de estabilidad adicionales para el producto farmacológico Acm1 reconstituido para evaluar la estabilidad del producto farmacológico reconstituido cuando se incubó a 25 °C durante un máximo de 24 horas, así como también en condiciones de estrés (agitación). El producto farmacológico liofilizado (2.5 ml de la sustancia farmacológica formulada en viales de vidrio de 5 ml tipo 1) se reconstituyeron a 2 mg/ml de Acm1 o 20 mg/ml de Acm1 con 2.3 ml de WFI (a 2.5 ml de volumen final). Los resultados de estos estudios de estabilidad se muestran en las Tablas 14 y 15, más abajo. Se determinó que las soluciones del producto farmacológico Acm1 reconstituido a 2 mg/ml de Acm1 y 20 mg/ml de Acm1 eran física y químicamente estables cuando se incubaron a 25 °C durante 24 horas. No se detectó ningún cambio apreciable en la estabilidad física o química en ninguno de los atributos monitoreados. Estos datos indican que el producto farmacológico reconstituido es estable a temperatura ambiente. También se encontró que las soluciones del producto farmacológico Acm1 reconstituido a 2 mg/ml de Acm1 y 20 mg/ml de Acm1 eran física y químicamente estables cuando se agitan (se agitan con vórtex a temperatura ambiente) durante 60 minutos. No se detectó ningún cambio apreciable en la estabilidad física o química en ninguno de los atributos monitoreados.

Tabla 14: Estabilidad en investigación del producto farmacológico reconstituido Acm1 para administración IV

Formulación		2 mg/ml de Acm1, 10 mM de histidina, pH 6.0, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.05 % (p/v) de polisorbato 20				
Volumen de carga		2.5 ml				
Contenedor/Cierre		Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 5 ml con tapón West V10-F597W 4432/50 B2-TR				
Ensayo		Sin estrés	Agitación (minutos)		Almacenamiento a 25 °C (horas)	
		t=0	30	60	8	24
Color y aspecto		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Análisis de partículas mediante MFI (partículas/ml)	2 - 10 µm	1,066	NR	3,183	NR	407
	≥ 10 µm	68	NR	60	NR	13
	≥ 25 µm	6	NR	9	NR	5
% de Proteína total recuperada mediante RP-UPLC		100	100	100	100	101
Pureza mediante MCE-SDS ^a	Sin reducción; % del pico principal	100	NR	100	NR	100
	Reducido; % de cadena pesada + ligera	100	NR	100	NR	100
Pureza mediante SE-UPLC	% de HMW	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6
	% de Nativo	99.0	98.9	98.9	98.9	99.0
	% de LMW	0.4	0.5	0.5	0.5	0.4
Análisis de variantes de carga mediante CEX-UPLC	% de Ácidas	50.0	50.0	50.1	50.1	47.9
	% de Principal	45.1	45.1	45.1	45.2	46.2
	% de Básicas	4.9	4.9	4.8	4.7	5.9
	% de Glicosados	23.8	23.6	23.6	23.5	24.4

Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de Ácidas	48.4	NR	48.4	NR	48.3
	% de Principal	43.6	NR	43.6	NR	43.6
	% de Básicas	8.0	NR	8.0	NR	8.1
% de Potencia relativa mediante bioensayo		88	NR	92	NR	94

CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, enfoque isoelectrico capilar por imágenes; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; MFI, Micro-Flow Imaging™; NR, no se requiere; OD, densidad óptica; RP, fase inversa; SDS, dodecil sulfato de sodio; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 15: Estabilidad en investigación del producto farmacéutico Acml reconstituido de 20 mg/ml para administración IV

Formulación		20 mg/ml de Acml, 10 mM de histidina, pH 6.0, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.05 % (p/v) de polisorbato 20				
Volumen de carga		2.5 ml				
Contenedor/Cierre		Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 de 5 ml con tapón West V10-F597W 4432/50 B2-TR				
Ensayo	Sin estrés		Agitación (minutos)		Almacenamiento a 25 °C (horas)	
	t=0		30	60	8	24
Color y aspecto		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm)		0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
pH		6.0	6.0	6.0	6.0	6.0
Análisis de partículas mediante MFI (partículas/ml)	2 - 10 µm	8,437	NR	4,282	NR	2,799
	≥ 10 µm	1,387	NR	134	NR	345
	≥ 25 µm	249	NR	15	NR	74
% de Proteína total recuperada mediante RP-UPLC		100	101	100	101	102
Pureza mediante MCE-SDS ^a	Sin reducción; % del pico principal	100	NR	100	NR	100
	Reducido; % de cadena pesada + ligera	100	NR	100	NR	100
Pureza mediante SE-UPLC	% de HMW	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
	% de Nativo	98.7	98.7	98.7	98.7	98.7
	% de LMW	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Análisis de variantes de carga mediante CEX-UPLC	% de Ácidas	47.7	47.7	47.4	47.6	47.4
	% de Principal	46.9	47.0	47.2	46.5	46.6
	% de Básicas	5.4	5.4	5.5	5.9	6.0
	% de Glicosilados	24.1	24.7	24.4	24.1	24.5
Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de Ácidas	47.3	NR	47.2	NR	47.5
	% de Principal	45.2	NR	45.0	NR	44.4
	% de Básicas	7.6	NR	7.8	NR	8.1
% de Potencia relativa mediante bioensayo		75	NR	64	NR	88

CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, enfoque isoelectrico capilar por imágenes; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; MFI, Micro-Flow Imaging™; NR, no se requiere; OD, densidad óptica; RP, fase inversa; SDS, dodecil sulfato de sodio; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Los resultados de los estudios de almacenamiento y estabilidad al estrés del producto farmacológico Acml indican que el Acml es estable. La formulación del Acml puede soportar exposiciones cortas a temperatura ambiente sin comprometer la estabilidad física o química. La formulación del Acml también es estable cuando se reconstituye a una concentración de 2 mg/ml o 20 mg/ml. La exposición

del producto farmacológico Acm1 reconstituido a 25 °C durante un máximo de 24 horas no comprometerá la integridad de la proteína ni la agitación del producto farmacológico reconstituido. Los volúmenes de reconstitución del producto farmacológico Acm1 se muestran en las tablas 16 y 17, más abajo.

Tabla 16: Volúmenes de reconstitución, volúmenes de sobrellenado y volúmenes extraíbles para el producto farmacológico Acm1 de 5 mg/ml reconstituido para administración IV

Componente de la formulación	Reconstituido para administración IV
Concentración de Acm1 en FDS (prelío-filización)	2 mg/ml
Cantidad de proteína por vial	5 mg
Concentración de Acm1 en el DP reconstituido	2 mg/ml
Volumen de carga	2.5 ml
Volumen de WFI para la reconstitución	2.3 ml
Volumen final reconstituido	2.5 ml
Volumen de sobrellenado	0.5 ml
Volumen disponible para la extracción	2.0 ml

DP, producto farmacológico; FDS, sustancia farmacológica formulada; IV, intravenoso; WFI, agua para inyección

Tabla 17: Volúmenes de reconstitución, volúmenes de sobrellenado y volúmenes extraíbles para DP de 50 mg/ml de Acm1 reconstituido para administración IV

Componente de la formulación	Reconstituido para administración IV
Concentración de Acm1 en FDS (prelío-filización)	20 mg/ml
Cantidad de proteína por vial	50 mg
Concentración de Acm1 en el DP reconstituido	20 mg/ml
Volumen de llenado objetivo	2.5 ml
Volumen de WFI para la reconstitución	2.3 ml
Volumen final reconstituido	2.5 ml
Volumen de sobrellenado	0.5 ml
Volumen disponible para la extracción	2.0 ml

DP, producto farmacológico; FDS, sustancia farmacológica formulada; IV, intravenoso; WFI, agua para inyección

Se realizaron estudios de estabilidad de investigación para determinar el almacenamiento a largo plazo, la estabilidad acelerada (temperaturas por encima de las condiciones de almacenamiento) y la estabilidad al estrés (40 °C/75 % de HR, agitación, congelación y descongelación) de la sustancia farmacológica del Acm1 (≥ 180 mg/ml de Acm1, 30 mM de acetato, 5 % p/v de sacarosa, pH 5.0) y la sustancia farmacológica formulada (50 mg/ml de Acm1; 30 mM de acetato, 10 % p/v de sacarosa, 0.2 % p/v de polisorbato 20, pH 5.0), según se discute más completamente más abajo.

No se detectaron cambios apreciables en la estabilidad física o química de la sustancia farmacológica Acm1 cuando se almacenó a -80 °C y -30 °C durante un máximo de 24 meses (véanse las Tablas 18 y 19). Estos resultados indican que la sustancia farmacológica Acm1 es estable durante al menos 24 meses cuando se almacena congelada en condiciones de almacenamiento. Los resultados de los estudios de estabilidad acelerada en investigación se presentan en las Tablas 20 a 22. No se observaron cambios apreciables en ninguno de los atributos monitoreados después de la incubación a -20 °C durante un máximo de 6 meses. Se observó un aumento en la concentración de proteínas mediante SoloVPE después de la incubación a 5 °C y 25 °C/60 % de HR durante un máximo de 6 meses, probablemente debido a la evaporación de la muestra. Se observó un aumento en las especies de HMW mediante SE-UPLC y MCE no reducida después de la incubación a 5 °C y 25 °C/60 % de HR durante un máximo de 6 meses. Se observó una disminución en la Región 1 (especies ácidas) con un aumento concomitante en la Región 2 (pico principal) mediante CEX-UPLC después de la incubación a 5 °C y 25 °C/60 % de HR durante 6 meses debido a la desglicación en el grupo de HC-CDR3-Lys98 de MUC16. Se observó un aumento en la Región 1 (especies ácidas) con una disminución concomitante en la Región 2 (pico principal) mediante iCIEF después de la incubación a 25 °C/60 % de HR durante 6 meses, probablemente debido a la desamidación. Estos resultados indican que la sustancia farmacológica Acm1 puede soportar la incubación a -20 °C durante al menos 6 meses sin comprometer la estabilidad física o química de la proteína. Los resultados de los estudios de estabilidad frente al estrés en investigación se presentan en las Tablas 23 y 24 y 17. La sustancia farmacológica Acm1 fue física y químicamente estable cuando se agitó (en vórtex) durante 10 minutos o se expuso a 4 ciclos de congelación/descongelación. Se observó un aumento en la concentración de proteínas mediante SoloVPE después de la incubación a 40 °C/75 % de HR durante un máximo de 3 meses, probablemente debido a la evaporación de la muestra. Se observó un aumento en la intensidad del color después de la incubación a 40 °C/75 % de HR durante 3 meses. Se observaron aumentos en las especies HMW y LMW mediante SE-UPLC y MCE después de la incubación a 40 °C/75 % de HR durante un máximo de 3 meses. Se observó una disminución en la Región 1 con un aumento concomitante en la Región 2 mediante CEX-UPLC después de la incubación a 40 °C/75 % de HR debido a la desglicación en el grupo de HC-CDR3-Lys98 de MUC16. Se observó un aumento en la Región 3 con una disminución concomitante en la Región 2 mediante CEX-UPLC después de la incubación a 40 °C/75 % de HR durante 3 meses. El aumento en la Región 3 se debe a un aumento del pico básico eluido durante la etapa de elución con alto contenido de sal requerido para la CEX-UPLC. Los resultados de las condiciones aceleradas y

extremas indicaron que HMW, LMW y las variantes de carga son las principales vías de degradación de la sustancia farmacológica Acm1.

Tabla 18: Estabilidad de la sustancia farmacológica Acm1 a -80 °C

Formulación		182.0 mg/ml de Acm1; 30 mM de acetato; 5 % (p/v) de sacarosa; pH 5.0								
Contenedor/Cierre		Vial de policarbonato de 5 ml irradiado con rayos gamma con cierre de HDPE								
Ensayo		Duración del almacenamiento a -80 °C (meses)								
		0	1	3	6	9	12	18	24	36
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	
Color		No > BY3	No > BY3	No > BY3	No > BY3	No > BY3	No > BY2	No > BY2	No > BY3	
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.9	4.9	5.0	
Proteínas totales (mg/ml)		181.1	181.9	185.6	189.5	189.2	181.4	183.3	186.1	
Potencia (%)		126	NR	NR	106	NR	87	NR	80	
MCE reductora (%)	Pureza	97.0	97.5	97.2	97.2	97.3	97.1	97.8	96.9	
	LMW	0.4	0.4	0.4	0.5	0.2	0.5	0.2	0.8	
MCE no reductora (%)	Pureza	97.7	97.8	97.7	97.6	96.1	97.0	97.1	97.4	
	LMW	1.8	1.8	1.7	1.7	2.8	2.4	1.7	1.6	
SE-UPLC (%)	Pureza	98.3	98.2	98.3	98.2	98.2	98.3	98.3	98.3	
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	HMW	1.7	1.9	1.8	1.8	1.8	1.7	1.7	1.7	
CEX-UPLC (%)	Región 1	51.5	51.7	51.4	51.1	51.7	52.0	52.2	51.8	
	Glicado	35.8	34.9	34.5	35.1	35.0	34.9	35.0	34.6	
	Región 2	44.6	44.2	44.7	44.9	43.6	43.4	43.5	43.6	
	Región 3	4.0	4.0	3.9	4.0	4.7	4.7	4.3	4.6	

CEX, intercambio catiónico; HDPE, polietileno de alta densidad; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; No > BY2, no tiene un color más intenso que el de la solución de referencia BY2; No > BY3, no tiene un color más intenso que la solución de referencia BY3; No > I, no más turbio que la suspensión de referencia I; NR, no se requiere; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 19: Estabilidad de la sustancia farmacológica Acm1 a -30 °C

Formulación		182.0 mg/ml de Acm1; 30 mM de acetato; 5 % (p/v) de sacarosa; pH 5.0								
Contenedor/Cierre		Vial de policarbonato de 5 ml irradiado con rayos gamma con cierre de HDPE								
Ensayo		Duración del almacenamiento a -30 °C (meses)								
		0	1	3	6	9	12	18	24	36
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	
Color		No > BY3	No > BY3	No > BY3	No > BY3	No > BY3	No > BY2	No > BY2	No > BY3	
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	4.9	5.0	
Proteínas totales (mg/ml)		181.1	187.2	182.7	187.1	181.1	185.8	182.6	188.3	
Potencia (%)		126	NR	NR	106	NR	92	NR	105	
MCE reductora (%)	Pureza	97.0	97.7	97.5	96.9	97.1	97.1	97.4	96.6	
	LMW	0.4	0.3	0.3	0.5	0.3	0.5	0.2	0.8	
MCE no reductora (%)	Pureza	97.7	97.8	97.7	98.1	97.0	97.5	95.7	97.6	
	LMW	1.8	1.7	1.7	1.5	2.3	2.0	1.8	1.5	
	Pureza	98.3	98.2	98.2	98.2	98.2	98.2	98.2	98.1	

SE-UPLC (%)	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	
	HMW	1.7	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.8	1.9	
CEX-UPLC (%)	Región 1	51.5	51.8	51.4	51.2	51.5	51.8	52.2	51.7	
	Glicado	35.8	34.9	34.7	35.1	34.9	34.6	35.1	34.5	
	Región 2	44.6	44.3	44.7	45.0	43.7	43.3	43.6	43.9	
	Región 3	4.0	3.9	3.9	3.9	4.7	4.9	4.3	4.5	

CEX, intercambio catiónico; HDPE, polietileno de alta densidad; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; No > BY2, no tiene un color más intenso que el de la solución de referencia BY2; No > BY3, no tiene un color más intenso que la solución de referencia BY3; No > I, no más turbio que la suspensión de referencia I; NR, no se requiere; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 20: Estabilidad de la sustancia farmacológica Acm1 almacenada a -20 °C

Formulación		182.0 mg/ml de Acm1; 30 mM de acetato; 5 % (p/v) de sacarosa; pH 5.0			
Contenedor/Cierre		Vial de policarbonato de 5 ml irradiado con rayos gamma con cierre de HDPE			
Ensayo		Duración del almacenamiento a -20 °C (meses)			
		0	1	3	6
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I
Color		No > BY3	No > BY3	No > BY3	No > BY3
pH		5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		181.1	185.2	187.1	189.4
MCE reductora (%)	Pureza	97.0	97.4	97.2	97.1
	LMW	0.4	0.6	0.5	0.5
MCE no reductora (%)	Pureza	97.7	97.4	97.5	97.4
	LMW	1.8	2.4	1.8	1.7
SE-UPLC (%)	Pureza	98.3	98.2	98.2	98.2
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0
	HMW	1.7	1.8	1.8	1.8
CEX-UPLC (%)	Región 1	51.5	51.7	51.3	51.2
	Glicado	35.8	34.9	34.1	35.2
	Región 2	44.6	44.3	44.7	44.8
	Región 3	4.0	4.0	4.0	4.0

CEX, intercambio catiónico; HDPE, polietileno de alta densidad; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; No > BY3, color no más intenso que la solución de referencia BY3; No > I, no más turbio que la suspensión de referencia I; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 21: Estabilidad de la sustancia farmacológica Acm1 almacenada a 5°C

Formulación		182.0 mg/ml de Acml; 30 mM de acetato; 5 % (p/v) de sacarosa; pH 5.0				
Contenedor/Cierre		Vial de policarbonato de 5 ml irradiado con rayos gamma con cierre de HDPE				
Ensayo		Duración del almacenamiento a 5 °C (meses)				
		0	0.5	1	3	6
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I	No > I
Color		No > BY3	No > BY3	No > BY3	No > BY3	No > BY3
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		181.1	183.3	188.4	187.9	197.5
MCE reductora (%)	Pureza	97.0	97.4	97.3	97.2	97.0
	LMW	0.4	0.4	0.3	0.4	0.6
MCE no reductora (%)	Pureza	97.7	97.1	96.9	96.5	95.7
	LMW	1.8	2.3	2.3	1.8	2.1
SE-UPLC (%)	Pureza	98.3	97.9	97.6	97.0	96.5
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	HMW	1.7	2.1	2.4	3.0	3.5
CEX-UPLC (%)	Región 1	51.5	50.0	50.8	49.3	47.9
	Glicado	35.8	34.9	34.6	34.0	33.9
	Región 2	44.6	46.0	45.1	46.4	48.0
	Región 3	4.0	4.0	4.1	4.3	4.1

CEX, intercambio catiónico; HDPE, polietileno de alta densidad; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; No > BY3, color no más intenso que la solución de referencia BY3; No > I, no más turbia que la suspensión de referencia I; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 22: Estabilidad de la sustancia farmacológica Acml almacenada a 25 °C/60 % de HR

Formulación		182.0 mg/ml de Acml; 30 mM de acetato; 5 % (p/v) de sacarosa; pH 5.0				
Contenedor/Cierre		Vial de policarbonato de 5 ml irradiado con rayos gamma con cierre de HDPE				
Ensayo		Duración del almacenamiento a 25 °C/60 % de HR (meses)				
		0	0.5	1	3	6
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I	No > I
Color		No > BY3	No > BY3	No > BY3	No > BY3	No > BY2
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		181.1	184.0	180.1	203.1	207.9
MCE reductora (%)	Pureza	97.0	96.7	97.2	96.8	96.3
	LMW	0.4	0.5	0.4	0.6	0.7
MCE no reductora (%)	Pureza	97.7	96.5	96.1	94.9	93.7
	LMW	1.8	2.2	2.3	2.2	2.4
SE-UPLC (%)	Pureza	98.3	96.8	96.2	95.2	94.2
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
	HMW	1.7	3.2	3.8	4.8	5.7
CEX-UPLC (%)	Región 1	51.5	45.1	42.4	31.7	23.6
	Glicado	35.8	31.9	29.0	19.4	13.5
	Región 2	44.6	50.7	53.5	63.7	71.2
	Región 3	4.0	4.2	4.2	4.6	5.2

CEX, intercambio catiónico; HDPE, polietileno de alta densidad; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; No > BY2, no tiene un color más intenso que el de la solución de referencia BY2; No > BY3, no tiene color más intenso que el de la solución de referencia BY3;

No > I, no más turbio que la suspensión de referencia I; RH, humedad relativa; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 23: Estabilidad de la sustancia farmacológica Acm1 almacenada a 40 °C/75 % de HR

Formulación		182.0 mg/ml de Acm1; 30 mM de acetato; 5 % (p/v) de sacarosa; pH 5.0				
Contenedor/Cierre		Vial de policarbonato de 5 ml irradiado con rayos gamma con cierre de HDPE				
Ensayo		Duración del almacenamiento a 40 °C/75 % de HR (meses)				
		0	0.25	0.5	1	3
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I	No > I
Color		No > BY3	No > BY2	No > BY2	No > BY2	No > BY1
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		181.1	187.7	187.7	191.9	207.1
MCE reductora (%)	Pureza	97.0	97.1	96.8	96.0	93.9
	LMW	0.4	0.4	0.5	0.7	1.4
MCE no reductora (%)	Pureza	97.7	95.8	95.3	93.2	86.2
	LMW	1.8	1.9	2.2	3.7	5.6
SE-UPLC (%)	Pureza	98.3	95.0	92.6	88.4	78.1
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.2	0.6
	HMW	1.7	5.0	7.4	11.4	21.3
CEX-UPLC (%)	Región 1	51.5	32.1	22.7	17.6	18.4
	Glicado	35.8	21.4	13.5	7.4	9.3
	Región 2	44.6	62.5	70.3	71.7	55.7
	Región 3	4.0	5.5	7.0	10.6	25.9

CEX, intercambio catiónico; HDPE, polietileno de alta densidad; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar microchip; No > BY1, color no más intenso que el de la solución de referencia BY1; No > BY2, color no más intenso que el de la solución de referencia BY2; No > BY3, color no más intenso que el de la solución de referencia BY3; No > I, no más turbia que la suspensión de referencia I; HR, humedad relativa; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla24: Estabilidad de la sustancia farmacológica Acm1 — Efecto de la agitación y la congelación/descongelación

Formulación		182.0 mg/ml de Acm1; 30 mM de acetato; 5 % (p/v) de sacarosa; pH 5.0				
Contenedor/Cierre		Vial de policarbonato de 5 ml irradiado con rayos gamma con cierre de HDPE				
Ensayo		t=0	Agitación (minutos)		Congelación/descongelación (ciclos)	
			5	10	2	4
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I	No > I
Color		No > BY3	No > BY3	No > BY3	No > BY2	No > BY2
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		181.1	183.9	183.5	183.7	187.2
MCE reductora (%)	Pureza	97.0	NR	96.7	NR	97.1
	LMW	0.4	NR	0.5	NR	0.5
MCE no reductora (%)	Pureza	97.7	NR	97.9	NR	97.5
	LMW	1.8	NR	1.6	NR	1.9
SE-UPLC (%)	Pureza	98.3	98.3	98.3	98.3	98.2
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	HMW	1.7	1.7	1.7	1.7	1.8
CEX-UPLC (%)	Región 1	51.5	51.5	51.4	49.9	50.6
	Glicado	35.8	35.1	35.0	34.7	34.9
	Región 2	44.6	44.7	44.6	46.0	45.3
	Región 3	4.0	3.8	3.9	4.0	4.0

CEX, intercambio catiónico; HDPE, polietileno de alta densidad; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar microchip; No > BY2, color no más intenso que el de la solución de referencia BY2; No > BY3, color no más intenso que el de la solución de referencia BY3; No > I, no más turbia que la suspensión de referencia I; NR, no se requiere; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

No se detectaron cambios apreciables en la estabilidad física o química de la sustancia farmacológica formulada Acml cuando se almacenó a -80 °C y -30 °C durante un máximo de 24 meses (véanse las Tablas 25 y 26). Estos resultados indican que la sustancia farmacológica formulada Acml es estable durante al menos 24 meses cuando se almacena congelado en condiciones de almacenamiento. Los resultados de los estudios de estabilidad acelerada en investigación se presentan en las Tablas 27 a 29. No se observaron cambios apreciables en los atributos monitoreados después de incubar la sustancia farmacológica formulada Acml a -20 °C o 5 °C durante un máximo de 6 meses. Se observó un aumento en la concentración de proteínas mediante SoloVPE después de la incubación a 25 °C/60 % de HR durante un máximo de 6 meses, probablemente debido a la evaporación de la muestra. Se observó un aumento en las especies de HMW mediante SE-UPLC y MCE no reductora después de la incubación a 5 °C y 25 °C/60 % de HR durante un máximo de 6 meses. Se observó una disminución en la Región 1 (especies ácidas) con un aumento concomitante en la Región 2 (pico principal) mediante CEX-UPLC después de la incubación a 25 °C/60 % de HR durante 6 meses debido a la desglicación del grupo HC-CDR3-Lys98 de MUC16. Se observó un aumento en la Región 1 (especies ácidas) con una disminución concomitante en la Región 2 (pico principal) mediante iCIEF después de la incubación a 25 °C/60 % de HR durante 6 meses, probablemente debido a la desamidación. Estos resultados indican que la sustancia farmacológica formulada Acml puede soportar la incubación a -20 °C durante al menos 6 meses y a 5 °C durante 3 meses sin comprometer la estabilidad física o química de la proteína. La sustancia farmacológica formulada Acml también puede soportar exposiciones cortas a temperaturas de 25 °C/60 % de HR. Los resultados de los estudios de estabilidad al estrés en investigación se presentan en las Tablas 30 y 31. La sustancia farmacológica formulada Acml fue física y químicamente estable cuando se agitó (en vórtex) hasta 120 minutos o se sometió hasta cuatro ciclos de congelación y descongelación (se observó un pequeño aumento en las partículas mediante MFI después de someterse a 4 ciclos de congelación/descongelación). Se observó un aumento en la concentración de proteínas mediante SoloVPE después de la incubación a 40 °C/75 % de HR durante un máximo de 3 meses,

probablemente debido a la evaporación de la muestra. Se observaron aumentos en las especies HMW y LMW mediante SE-UPLC y MCE después de la incubación a 40 °C/75 % de HR durante un máximo de 3 meses. Se observó una disminución en la Región 1 con un aumento concomitante en la Región 2 mediante CEX-UPLC después de la incubación a 40 °C/75 % de HR debido a la desglicación en el grupo HC-CDR3-Lys98 de MUC16. Después de 2 meses de incubación a 40 °C/75 % de HR, hay una disminución en la Región 1 y un aumento concomitante en la Región 2. Sin embargo, después del punto cronológico de tres meses, la tendencia se revierte y hay un aumento aparente en la Región 1 y Región 3 con una disminución concomitante en la Región 2. El aumento en la Región 1 probablemente se deba a la desamidación contrapuesta en asparagina o glutamina, mientras que el aumento en la Región 3 se debe a un aumento del pico básico eluido en la etapa de elución con alto contenido de sal. Los resultados de las condiciones aceleradas y extremas indicaron que el HMW, el LMW y las variantes de carga son las principales vías de degradación para la sustancia farmacológica formulada Acm1. Se observó un pequeño aumento en las partículas de 2-10 µm mediante MFI después de 4 ciclos de congelación y descongelación.

Tabla 25: Estabilidad de la sustancia farmacológica formulada Acm1 a -80 °C

Formulación		50 mg/ml de Acm1, 30 mM de acetato, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.2 % (p/v) de polisorbato 20, pH 5.0							
Contenedor/Cierre		Vial de policarbonato de 5 ml irradiado con rayos gamma con cierre de HDPE							
Ensayo		Duración del almacenamiento a -80 °C (meses)							
		0	1	3	6	9	12	18	24
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I
Color		No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY5
pH		5.0	4.9	5.0	5.0	5.0	4.9	4.9	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		51.6	52.4	50.1	51.9	51.0	49.7	51.2	52.2
Potencia (%)		92	NR	NR	105	NR	91	NR	90
MCE reductora (%)	Pureza	96.9	96.8	97.1	97.5	97.4	96.7	96.8	96.8
	LMW	0.4	0.5	0.4	0.5	0.5	0.5	0.9	0.9
MCE no reductora (%)	Pureza	97.6	98.0	97.4	97.8	97.5	97.6	97.8	97.9
	LMW	2.0	1.8	1.9	1.8	2.2	2.0	1.8	1.6
SE-UPLC (%)	Pureza	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6	98.4
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	HMW	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4	1.5	1.4	1.6
CEX-UPLC (%)	Región 1	51.8	51.9	51.5	51.4	51.9	52.1	52.4	50.7
	Glicado	35.3	35.2	34.7	35.3	35.1	35.0	35.1	34.3
	Región 2	44.5	44.1	44.7	44.9	43.7	43.2	43.5	44.8
	Región 3	3.7	4.0	3.8	3.8	4.4	4.7	4.0	4.5

CEX, intercambio catiónico; HDPE, polietileno de alta densidad; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar microchip; No > BY4, color no más intenso que el de la solución de referencia BY4; No > BY5, color no más intenso que el de la solución de referencia BY5; No > I, no más turbia que la suspensión de referencia I; NR, no se requiere; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 26: Estabilidad de la sustancia farmacológica formulada Acm1 a -30 °C

Formulación		50 mg/ml de Acm1, 30 mM de acetato, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.2 % (p/v) de polisorbato 20, pH 5.0							
Contenedor/Cierre		Vial de policarbonato de 5 ml irradiado con rayos gamma con cierre de HDPE							
Ensayo		Duración del almacenamiento a -30 °C (meses)							
		0	1	3	6	9	12	18	24
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I
Color		No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY5
pH		5.0	4.9	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		51.6	50.1	50.9	52.5	51.8	51.5	50.7	49.7
Potencia (%)		92	NR	NR	105	NR	85	NR	94
MCE reductora (%)	Pureza	96.9	96.6	96.5	97.2	97.4	97.3	96.8	96.8
	LMW	0.4	0.5	0.5	0.5	0.2	0.5	0.8	0.9
MCE no reductora (%)	Pureza	97.6	98.0	97.6	97.4	97.2	97.6	97.9	97.8
	LMW	2.0	1.7	1.9	2.3	2.2	1.9	1.6	1.6
SE-UPLC (%)	Pureza	98.6	98.6	98.6	98.6	98.5	98.5	98.5	98.4
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0
	HMW	1.4	1.4	1.4	1.4	1.5	1.5	1.5	1.6
CEX-UPLC (%)	Región 1	51.8	51.9	51.6	51.4	51.8	52.0	52.4	50.8
	Glicado	35.3	35.1	34.7	35.1	34.9	34.9	35.2	34.3
	Región 2	44.5	44.1	44.7	44.8	43.7	43.2	43.6	44.8
	Región 3	3.7	4.0	3.8	3.8	4.5	4.7	4.1	4.4

CEX, intercambio catiónico; HDPE, polietileno de alta densidad; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar microchip; No > BY4, color no más intenso que el de la solución de referencia BY4; No > BY5, color no más intenso que el de la solución de referencia BY5; No > I, no más turbia que la suspensión de referencia I; NR, no se requiere; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 27: Estabilidad de la sustancia farmacológica formulada Acm1 almacenada a -20 °C

Formulación		50 mg/ml de Acm1, 30 mM de acetato, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.2 % (p/v) de polisorbato 20, pH 5.0			
Contenedor/Cierre		Vial de policarbonato de 5 ml irradiado con rayos gamma con cierre de HDPE			
Ensayo		Duración del almacenamiento a -20 °C (meses)			
		0	1	3	6
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I
Color		No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4
pH		5.0	4.9	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		51.6	51.8	52.0	52.0
MCE reductora (%)	Pureza	96.9	97.3	97.4	97.0
	LMW	0.4	0.4	0.4	0.5
MCE no reductora (%)	Pureza	97.6	97.9	97.5	97.6
	LMW	2.0	1.6	1.9	1.9
SE-UPLC (%)	Pureza	98.6	98.6	98.6	98.6
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0
	HMW	1.4	1.5	1.4	1.5
CEX-UPLC (%)	Región 1	51.8	51.9	51.5	51.3
	Glicado	35.3	35.2	34.6	35.1
	Región 2	44.5	44.2	44.7	45.0
	Región 3	3.7	3.9	3.8	3.8

CEX, intercambio catiónico; HDPE, polietileno de alta densidad; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; No > BY4, color no más intenso que la solución de referencia BY4; No > I, no más turbia que la suspensión de referencia I; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 28: Estabilidad de la sustancia farmacológica formulada Acm1 almacenada a 5°C

Formulación		50 mg/ml de Acm1, 30 mM de acetato, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.2 % (p/v) de polisorbato 20, pH 5.0				
Contenedor/Cierre		Vial de policarbonato de 5 ml irradiado con rayos gamma con cierre de HDPE				
Ensayo		Duración del almacenamiento a 5 °C (meses)				
		0	0.5	1	3	6
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I	No > I
Color		No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		51.6	51.7	53.2	51.9	54.3
MCE reductora (%)	Pureza	96.9	97.6	96.4	97.4	97.2
	LMW	0.4	0.4	0.5	0.4	0.7
MCE no reductora (%)	Pureza	97.6	97.6	97.9	97.4	97.0
	LMW	2.0	2.1	1.7	1.8	2.0
SE-UPLC (%)	Pureza	98.6	98.6	98.4	98.2	97.9
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	HMW	1.4	1.4	1.6	1.8	2.1
CEX-UPLC (%)	Región 1	51.8	50.3	51.3	50.0	48.7
	Glicado	35.3	35.1	34.5	34.7	33.8
	Región 2	44.5	45.9	44.9	46.1	47.7
	Región 3	3.7	3.8	3.8	3.9	3.7

CEX, intercambio catiónico; HDPE, polietileno de alta densidad; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; No > BY4, color no más intenso que la solución de referencia BY4; No > I, no más turbia que la suspensión de referencia I; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 29: Estabilidad de la sustancia farmacológica formulada Acm1 almacenada a 25 °C/60 % de HR

Formulación		50 mg/ml de Acm1, 30 mM de acetato, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.2 % (p/v) de polisorbato 20, pH 5.0				
Contenedor/Cierre		Vial de policarbonato de 5 ml irradiado con rayos gamma con cierre de HDPE				
Ensayo		Duración del almacenamiento a 25 °C/60 % de HR (meses)				
		0	0.5	1	3	6
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I	No > I
Color		No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		51.6	50.8	52.2	54.8	60.0
MCE reductora (%)	Pureza	96.9	96.3	96.1	97.0	96.6
	LMW	0.4	0.5	0.5	0.7	0.8
MCE no reductora (%)	Pureza	97.6	97.0	96.9	96.1	95.7
	LMW	2.0	2.4	2.3	2.3	2.4
SE-UPLC (%)	Pureza	98.6	98.3	97.9	97.3	96.7
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
	HMW	1.4	1.8	2.2	2.7	3.2
CEX-UPLC (%)	Región 1	51.8	45.5	42.6	31.4	24.0

	Glicado	35.3	32.1	28.1	19.5	13.8
	Región 2	44.5	50.7	53.7	65.2	72.3
	Región 3	3.7	3.8	3.7	3.4	3.7

CEX, intercambio catiónico; HDPE, polietileno de alta densidad; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar microchip; No > BY4, color no más intenso que el de la solución de referencia BY4; No > I, no más turbia que la suspensión de referencia I; HR, humedad relativa; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 30: Estabilidad de la sustancia farmacológica formulada Acm1 almacenada a 40 °C/75 % de HR

Formulación		50 mg/ml de Acm1, 30 mM de acetato, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.2 % (p/v) de polisorbato 20, pH 5.0				
Contenedor/Cierre		Vial de policarbonato de 5 ml irradiado con rayos gamma con cierre de HDPE				
Ensayo		Duración del almacenamiento a 40 °C/75 % de HR (meses)				
		0	0.25	0.5	1	3
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I	No > II
Color		No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		51.6	52.9	52.3	53.2	56.2
MCE reductora (%)	Pureza	96.9	97.1	96.8	96.1	94.7
	LMW	0.4	0.5	0.5	1.0	1.3
MCE no reductora (%)	Pureza	97.6	96.4	96.2	95.2	90.4
	LMW	2.0	2.7	2.8	3.4	5.9
SE-UPLC (%)	Pureza	98.6	98.1	97.1	95.5	88.1
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.2	0.5
	HMW	1.4	1.9	2.9	4.4	11.4
CEX-UPLC (%)	Región 1	51.8	32.4	23.0	20.6	26.4
	Glicado	35.3	20.6	13.5	9.7	13.1
	Región 2	44.5	63.9	72.8	73.7	62.8
	Región 3	3.7	3.7	4.2	5.7	10.8

CEX, intercambio catiónico; HDPE, polietileno de alta densidad; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar microchip; No > BY4, color no más intenso que el de la solución de referencia BY4; No > I, no más turbia que la suspensión de referencia I; No > II, no más turbia que la suspensión de referencia II; HR, humedad relativa; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento

Tabla 31: Estabilidad de la sustancia farmacológica formulada Acm1

Efecto de la agitación y congelación/descongelación

Formulación		50 mg/ml de Acm1, 30 mM de acetato, 10 % (p/v) de sacarosa, 0.2 % (p/v) de polisorbato 20, pH 5.0				
Contenedor/Cierre		Vial de policarbonato de 5 ml irradiado con rayos gamma con cierre de HDPE				
Ensayo		t=0	Agitación (minutos)		Congelación/descongelación (ciclos)	
			60	120	2	4
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I	No > I
Color		No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		51.6	51.7	52.9	50.3	51.7
MCE reductora (%)	Pureza	96.9	NR	97.7	NR	96.9

	LMW	0.4	NR	0.4	NR	0.5
MCE no reductora (%)	Pureza	97.6	NR	97.4	NR	97.9
	LMW	2.0	NR	2.1	NR	1.8
SE-UPLC (%)	Pureza	98.6	98.6	98.6	98.6	98.6
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	HMW	1.4	1.4	1.4	1.4	1.4
CEX-UPLC (%)	Región 1	51.8	51.7	51.7	50.2	50.7
	Glicado	35.3	35.0	35.1	34.9	35.1
	Región 2	44.5	44.7	44.5	46.1	45.4
	Región 3	3.7	3.7	3.8	3.7	3.9

- 5 CEX, intercambio catiónico; HDPE, polietileno de alta densidad; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar microchip; No > BY4, color no más intenso que el de la solución de referencia BY4; No > I, no más turbia que la suspensión de referencia I; NR no se requiere; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento
- 10 Se han realizado estudios de estabilidad para evaluar el almacenamiento y la estabilidad acelerada de un producto farmacéutico Acm1 líquido. El producto farmacológico líquido usado para los estudios de almacenamiento y estabilidad acelerada se fabricó llenando 2.5 ml de la sustancia farmacológica formulada en viales de vidrio 6R ISO tipo 1. El producto farmacológico líquido se incubó en condiciones de almacenamiento, aceleradas y de estrés. No se detectaron cambios
- 15 apreciables en la estabilidad física o química del producto farmacológico líquido Acm1 cuando se almacenó a 5 °C durante un máximo de 12 o 24 meses (véanse las Tablas 32 y 33). Estos resultados indican que el producto farmacológico líquido Acm1 es estable durante al menos 12 o 24 meses en condiciones de almacenamiento. Los resultados de los estudios de estabilidad acelerados en investigación se presentan en las Tablas 34 y 35. Se observó una disminución en la Región 1, con
- 20 un aumento concomitante en la Región 2, mediante CEX-UPLC cuando se almacenó a 25 °C/60 % de HR durante un máximo de 6 meses debido a la desglicación en el grupo HC-CDR3-Lys98 de MUC16. Se observó un aumento en la Región 1, con una disminución concomitante en la Región 2, mediante iCIEF después de la incubación a 25 °C/60 % de HR durante un máximo de 6 meses. No se observaron cambios apreciables en otros atributos monitoreados. Los resultados de los estudios
- 25 de estabilidad frente al estrés en investigación se presentan en las Tablas 34 a 37. El producto farmacológico líquido Acm1 fue física y químicamente estable cuando se agitó (en vórtex) durante 120 minutos. Se observó un aumento en las especies de HMW y LMW mediante SE-UPLC después de la incubación a 40 °C/75 % de HR durante 3 meses. Se observaron aumentos en las especies de LMW mediante MCE reductora y no reductora después de la incubación a 40 °C/75 % de HR durante
- 30 3 meses. Se observaron diferentes tendencias para la variante de carga mediante CEX-UPLC e iCIEF debido a diferentes sensibilidades de cada ensayo. Se observó un aumento en la Región 1, con una

disminución concomitante en la Región 2, mediante iCIEF después de la incubación a 40 °C/75 % de HR durante un máximo de 3 meses, probablemente debido a la desamidación de la asparagina o la glutamina. Después de la incubación durante un máximo de 2 meses a 40 °C/75 % de HR, hay una disminución en la Región 1, con un aumento concomitante en la Región 2 observado mediante CEX-UPLC. A esto le sigue un aumento aparente en la Región 1, con una disminución concomitante en la Región 2, observada mediante CEX-UPLC en el punto temporal de 3 meses, probablemente debido a la reacción de desamidación competitiva. Se observó una disminución en la Región 3 mediante iCIEF en el punto temporal de 3 meses cuando se incubó a 40 °C/75 % de HR. Se observó un aumento en las partículas de 2-10 µm mediante MFI después de 4 ciclos de congelación y descongelación. Los resultados de las condiciones aceleradas y extremas indicaron que el HMW, el LMW y las variantes de carga son las principales vías de degradación para el producto farmacológico líquido Acml.

Tabla 32: Estabilidad de 5.0 mg/ml del producto farmacológico Acml líquido almacenado a 5 °C

Formulación	Producto farmacológico Acml; proteína recombinante Acml estéril en vial, 5.0 mg/ml, en una solución amortiguadora acuosa, pH 5.0, que contiene 30 mM de acetato, sacarosa al 10 % (p/v) y polisorbato 20 al 0.2 % (p/v)									
Cierre del contenedor	6R (5 ml) USP/Ph. Eur. Vial de vidrio de borosilicato tipo 1; tapón de clorobutilo recubierto con FluroTec® de 20 mm; sello Flip-Off® de 20 mm									
Condiciones de almacenamiento	5 °C									
Ensayo	Duración del almacenamiento (meses)									
		0	3	6	9	12	18	24	30	36
Forma/Condición física	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP		
Transparencia	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I	No > I		
Color	No > BY7	No > BY7	No > BY7	No > BY7	No > BY7	No > BY7	No > BY7	No > BY7		
pH	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0		
Proteínas totales (mg/ml)	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2		
Potencia (%)	135	NR	106	NR	107	NR	NR	101		
Polisorbato 20 (%)	0.21	NR	0.20	NR	0.21	NR	NR	0.21		
MCE reductora (%)	Pureza	97.5	97.3	96.9	97.2	96.9	97.4	96.8		
	LMW	0.2	0.3	0.5	0.1	0.6	0.1	0.3		
MCE no reductora (%)	Pureza	97.4	97.5	97.3	97.0	96.8	97.3	97.0		
	LMW	2.2	2.0	2.1	2.5	2.7	2.1	2.2		
SE-UPLC (%)	Pureza de MP	98.5	98.6	98.5	98.5	98.5	98.4	98.4		
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		
	HMW	1.5	1.5	1.5	1.5	1.6	1.6	1.6		
Análisis de variantes de carga mediante CEX-UPLC (%)	Región 1	41.0	39.6	38.8	37.7	37.0	35.9	34.3		
	Glicado	28.6	27.0	27.2	26.6	25.9	25.1	23.7		
	Región 2	53.9	55.5	56.6	57.5	57.6	59.7	61.8		
	Región 3	5.2	4.9	4.7	4.8	5.5	4.4	3.8		
Material particulado mediante oscurecimiento de la luz (#/contenedor)	≥ 10 µm	37	135	229	NR	1,074	NR	1,460		
	≥ 25 µm	0	0	0	NR	8	NR	0		

CEX, intercambio catiónico; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; MP, pico principal; No > BY7, color no más intenso que el de la solución de referencia BY7; No > I, no más turbia que la suspensión de referencia I; NR, no se requiere; Ph. Eur., Farmacopea Europea; SE,

exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento; USP, Farmacopea de los Estados Unidos

Tabla 33: Estabilidad de 50.0 mg/ml del producto farmacológico Acml líquido almacenado a 5 °C

Formulación		Producto farmacológico Acml; proteína recombinante Acml estéril en vial, 50.0 mg/ml, en una solución amortiguadora acuosa, pH 5.0, que contiene 30 mM de acetato, sacarosa al 10 % (p/v) y polisorbato 20 al 0.2 % (p/v)									
Cierre del contenedor		6R (5 ml) USP/Ph. Eur. Vial de vidrio de borosilicato tipo 1; tapón de clorobutilo recubierto con FluroTec® de 20 mm; sello Flip-Off® de 20 mm									
Condiciones de almacenamiento		5 °C									
Ensayo		Duración del almacenamiento (meses)									
		0	3	6	9	12	18	24	30	36	
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP					
Transparencia		No > III	No > III	No > III	No > III	No > III					
Color		No > BY5	No > BY5	No > BY5	No > BY5	No > BY5					
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0					
Proteínas totales (mg/ml)		51.0	49.3	49.5	49.8	49.4					
Potencia (%)		81	NR	104	NR	130					
Polisorbato 20 (%)		0.19	NR	0.20	NR	0.20					
MCE reductora (%)	Pureza	97.1	97.2	97.3	96.5	96.7					
	LMW	0.3	0.4	0.1	0.7	0.8					
MCE no reductora (%)	Pureza	96.9	97.2	97.0	97.0	96.8					
	LMW	2.3	2.0	2.1	2.1	2.3					
SE-UPLC (%)	Pureza de MP	97.9	97.9	97.8	97.7	97.6					
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0					
	HMW	2.1	2.1	2.2	2.3	2.4					
Análisis de variantes de carga mediante CEX-UPLC (%)	Región 1	39.9	38.9	38.1	37.4	36.9					
	Glicado	28.0	27.0	26.8	26.4	26.1					
	Región 2	54.3	55.8	56.6	57.8	58.1					
	Región 3	5.8	5.3	5.3	4.9	5.1					
Material particulado mediante oscurecimiento de la luz (#/contenedor)	≥ 10 µm	25	18	62	NR	49					
	≥ 25 µm	2	0	0	NR	0					

CEX, intercambio catiónico; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; MP, pico principal; No > BY5, color no más intenso que el de la solución de referencia BY5; No > III, no más turbio que la suspensión de referencia III; NR, no se requiere; Ph. Eur., Farmacopea Europea; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento; USP; Farmacopea de los Estados Unidos

Tabla 34: Estabilidad de 5.0 mg/ml del producto farmacológico Acml líquido almacenado a 25 °C/60 % de HR y 40 °C/75 % de HR

Formulación		Producto farmacológico Acml; proteína recombinante Acml estéril en vial, 5.0 mg/ml, en una solución amortiguadora acuosa, pH 5.0, que contiene 30 mM de acetato, sacarosa al 10 % (p/v) y polisorbato 20 al 0.2 % (p/v)						
Cierre del contenedor		6R (5 ml) USP/Ph. Eur. Vial de vidrio de borosilicato tipo 1; tapón de clorobutilo recubierto con FluroTec® de 20 mm; sello Flip-Off® de 20 mm						
Ensayo		t = 0	Almacenamiento a 25 °C/60 % de HR (meses)			Almacenamiento a 40 °C/75 % de HR (meses)		
			1	3	6	0.5	1	3
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > I	No > II	No > I	No > II	No > II	No > II	No > II
Color		No > BY7	No > BY7	No > BY7	No > BY7	No > BY7	No > BY7	No > BY7
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0

5	Proteínas totales (mg/ml)		5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.2	5.4
	Polisorbato 20 (%)		0.21	NR	NR	0.21	NR	NR	0.20
	MCE reductora (%)	Pureza	97.5	97.1	96.9	96.6	96.7	96.6	94.5
		LMW	0.2	0.4	0.5	0.6	0.5	0.4	1.5
	MCE no reductora (%)	Pureza	97.4	97.0	97.1	96.9	97.0	96.1	92.9
		LMW	2.2	2.6	2.4	2.6	2.6	3.5	5.8
	SE-UPLC (%)	Pureza de MP	98.5	98.7	98.4	98.3	98.6	97.5	95.4
		LMW	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.8	0.7
		HMW	1.5	1.3	1.5	1.7	1.4	1.7	3.9
	Análisis de variantes de carga mediante CEX-UPLC (%)	Región 1	41.0	31.5	24.6	19.7	17.8	14.2	26.2
		Glicado	28.6	22.6	14.7	10.1	9.4	6.2	13.2
		Región 2	53.9	64.4	71.9	76.9	78.4	81.5	67.7
		Región 3	5.2	4.1	3.5	3.4	3.7	4.3	6.1
	Material particulado mediante oscurecimiento de la luz (#/contenedor)	≥ 10 µm	37	NR	451	580	NR	NR	484
		≥ 25 µm	0	NR	8	10	NR	NR	5

CEX, intercambio catiónico; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; MP, pico principal; No > BY7, color no más intenso que el de la solución de referencia BY7; No > I, no más turbio que la suspensión de referencia I; No > II, no más turbio que la suspensión de referencia; NR, no se requiere; Ph. Eur., Farmacopea Europea; HR, humedad relativa; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento; USP, Farmacopea de los Estados Unidos

Tabla 35: Estabilidad de 50.0 mg/ml del producto farmacológico Acml líquido almacenado a 25 °C/60 % de HR y 40 °C/75 % de HR

Formulación		Producto farmacológico Acml; proteína recombinante Acml estéril en vial, 50.0 mg/ml, en una solución amortiguadora acuosa, pH 5.0, que contiene 30 mM de acetato, sacarosa al 10 % (p/v) y polisorbato 20 al 0.2 % (p/v)						
Cierre del contenedor		6R (5 ml) USP/Ph. Eur. Vial de vidrio de borosilicato tipo I; tapón de clorobutilo recubierto con FluroTec® de 20 mm; sello Flip-Off® de 20 mm						
Ensayo		t = 0	Almacenamiento a 25 °C/60 % de HR (meses)			Almacenamiento a 40 °C/75 % de HR (meses)		
			1	3	6	0.5	1	3
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > III	No > III	No > III	No > III	No > III	No > III	No > III
Color		No > BY5	No > BY5	No > BY5	No > BY5	No > BY5	No > BY5	No > BY4
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		51.0	48.6	50.3	51.0	49.5	49.3	51.1
Polisorbato 20 (%)		0.19	NR	NR	0.20	NR	NR	0.19
MCE reductora (%)	Pureza	97.1	97.4	96.7	96.5	96.7	95.9	93.5
	LMW	0.3	0.2	0.6	0.3	0.4	1.0	2.6
MCE no reductora (%)	Pureza	96.9	96.2	96.4	93.2	95.9	94.7	91.6
	LMW	2.3	2.9	2.5	3.0	2.9	3.8	6.0
SE-UPLC (%)	Pureza de MP	97.9	97.8	97.5	97.4	97.0	96.1	90.4
	LMW	0.0	0.0	0.1	0.0	0.4	0.5	0.4
	HMW	2.1	2.2	2.5	2.6	2.6	3.5	9.2
Análisis de variantes de carga mediante CEX-UPLC (%)	Región 1	39.9	33.3	25.4	20.9	18.5	17.4	28.6
	Glicado	28.0	23.2	15.6	11.4	11.1	8.8	13.1
	Región 2	54.3	62.0	69.6	74.7	77.2	77.1	59.4
	Región 3	5.8	4.7	5.1	4.4	4.3	5.5	12.0
Material particulado mediante oscurecimiento de la luz (#/contenedor)	≥ 10 µm	25	NR	55	75	NR	NR	20
	≥ 25 µm	2	NR	1	1	NR	NR	1

CEX, intercambio catiónico; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar en microchip; MP, pico principal; No > BY4, color no más intenso que el de la solución de referencia BY4; No > BY5, color

no más intenso que el de la solución de referencia BY5; No > III: no más turbio que el de la solución de referencia III; NR, no se requiere, Ph. Eur., Farmacopea Europea; HR: humedad relativa; SE: exclusión por tamaño; UPLC: cromatografía líquida de ultra rendimiento; USP: Farmacopea de los Estados Unidos

Tabla 36: Estabilidad de 5.0 mg/ml del producto farmacológico Acm1 líquido Efecto de la agitación y congelación/descongelación

Formulación		Producto farmacológico Acm1; proteína recombinante Acm1 estéril en vial, 5.0 mg/ml, en una solución amortiguadora acuosa, pH 5.0, que contiene 30 mM de acetato, sacarosa al 10 % (p/v) y polisorbato 20 al 0.2 % (p/v)				
Contenedor/Cierre		6R (5 ml) USP/Ph. Eur. Vial de vidrio de borosilicato tipo 1; tapón de clorobutilo recubierto con FluroTec® de 20 mm; sello Flip-Off® de 20 mm				
Ensayo		T = 0	Agitación (minutos)		Congelación/descongelación (ciclos)	
			60	120	2	4
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > I	No > I	No > I	No > I	No > I
Color		No > BY7	No > BY7	No > BY7	No > BY7	No > BY7
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		5.2	5.2	5.2	5.2	5.2
Polisorbato 20 (%)		0.21	NR	0.20	NR	0.21
MCE reductora (%)	Pureza	97.5	NR	97.2	NR	97.3
	LMW	0.2	NR	0.2	NR	0.2
MCE no reductora (%)	Pureza	97.4	NR	97.2	NR	97.8
	LMW	2.2	NR	2.4	NR	1.9
SE-UPLC (%)	Pureza de MP	98.5	98.3	98.3	98.4	98.5
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	HMW	1.5	1.7	1.7	1.7	1.6
Análisis de variantes de carga mediante CEX-UPLC (%)	Región 1	41.0	40.9	40.8	39.2	39.5
	Glicado	28.6	28.5	28.5	28.1	28.1
	Región 2	53.9	53.9	54.2	55.7	55.3
	Región 3	5.2	5.2	5.1	5.1	5.2
Material particulado mediante oscurecimiento de la luz (#/contenedor)	≥ 10 µm	37	NR	125	NR	294
	≥ 25 µm	0	NR	0	NR	15

CEX, intercambio catiónico; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; MP, pico principal; No > BY7, color no más intenso que el de la solución de referencia BY7; No > I, no más turbia que la suspensión de referencia I; NR, no se requiere; Ph. Eur., Farmacopea Europea; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento; USP, Farmacopea de los Estados Unidos

Tabla 37: Estabilidad de 50.0 mg/ml del producto farmacológico Acm1 líquido Efecto de la agitación y congelación/descongelación

Formulación		Producto farmacológico Acm1; proteína recombinante Acm1 estéril en vial, 50.0 mg/ml, en una solución amortiguadora acuosa, pH 5.0, que contiene 30 mM de acetato, sacarosa al 10 % (p/v) y polisorbato 20 al 0.2 % (p/v)				
Contenedor/Cierre		6R (5 ml) USP/Ph. Eur. Vial de vidrio de borosilicato tipo 1; tapón de clorobutilo recubierto con FluroTec® de 20 mm; sello Flip-Off® de 20 mm				
Ensayo		T = 0	Agitación (minutos)		Congelación/descongelación (ciclos)	
			60	120	2	4
Forma/Condición física		LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia		No > III	No > III	No > III	No > II	No > III

Color		No > BY5	No > BY5	No > BY5	No > BY5	No > BY5
pH		5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		51.0	49.4	49.1	49.4	48.1
Polisorbato 20 (%)		0.19	NR	0.19	NR	0.19
MCE reductora (%)	Pureza	97.1	NR	97.1	NR	97.3
	LMW	0.3	NR	0.2	NR	0.1
MCE no reductora (%)	Pureza	96.9	NR	96.6	NR	96.8
	LMW	2.3	NR	2.8	NR	2.4
SE-UPLC (%)	Pureza de MP	97.9	97.8	97.9	97.8	97.8
	LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	HMW	2.1	2.2	2.2	2.2	2.2
Análisis de variantes de carga mediante CEX-UPLC (%)	Región 1	39.9	40.0	40.1	39.0	39.0
	Glicado	28.0	27.9	28.1	28.0	28.1
	Región 2	54.3	54.2	54.1	55.6	55.6
	Región 3	5.8	5.8	5.8	5.5	5.4
Material particulado mediante oscurecimiento de la luz (#/contenedor)	≥ 10 µm	25	NR	12	NR	34
	≥ 25 µm	2	NR	0	NR	1

CEX, intercambio catiónico; HMW, alto peso molecular; LEFVP, líquido esencialmente libre de partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MCE, electroforesis capilar de microchip; MP, pico principal; No > BY5, color no más intenso que el de la solución de referencia 5; No > II: no más turbio que la suspensión de referencia II; No > III: no más turbio que la suspensión de referencia III; NR, no se requiere; Ph. Eur., Farmacopea Europea; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento; USP, Farmacopea de los Estados Unidos

Ejemplo 3: Desarrollo del ciclo de liofilización

El proceso de liofilización que se desarrolló para la producción clínica consiste de: congelamiento, secado primario y secado secundario. El proceso de liofilización se desarrolló mediante el uso de un liofilizador LyoStar™ III de FTS basado en una temperatura de colapso parcial de la torta de -31.2 °C, determinada para la sustancia farmacológica formulada congelada mediante el uso de un microscopio de congelamiento secado. Durante el secado primario, la temperatura del producto no superó la temperatura de colapso parcial de la torta, manteniendo así la integridad de la torta durante el ciclo de liofilización. El proceso de secado secundario se desarrolló para garantizar que el producto farmacológico tenga un bajo contenido de humedad residual.

El ciclo de liofilización tarda aproximadamente 63 horas en producir el producto farmacológico Acm1 liofilizado en viales de vidrio de 5 ml tipo 1 que contienen 2.5 ml de la sustancia farmacológica formulada Acm1 de 2 mg/ml. El ciclo de liofilización contiene las etapas que se muestran en la Tabla 38, más abajo.

Tabla 38: Ciclo de liofilización

Etapas de liofilización	Velocidad de rampa de temperatura del estante (Duración de la rampa)	Temperatura del estante (°C)	Tiempo de retención (horas)	Presión de la cámara
Cargando	NA	5 – 25	NA	Presión ambiente
Retención	0.5 °C/minuto	5	1	Presión ambiente
Congelamiento	0.5 °C/minuto (100 minutos)	-45	2	Presión ambiente
Secado primario	0.5 °C/minuto (50 minutos)	-20	40	100 mTorr
Secado secundario	0.2 °C/minuto (300 minutos)	40	10	100 mTorr
Rampa de temperatura para el taponamiento	0.5 °C/minuto (30 minutos)	25	1	100 mTorr
Relleno con nitrógeno gaseoso	NA	25	NA	80 % de la presión atmosférica (608,000 mTorr)
Taponamiento	NA	25	NA	80 % de la presión atmosférica (608,000 mTorr)

NA, no corresponde

Ejemplo 4: Desarrollo de formulaciones de anticuerpos biespecíficos líquidas estables Anti-MUC16 x Anti-CD3 para la administración intravenosa y estabilidad de formulaciones

Desarrollo de formulaciones intravenosas (IV), que incluye formulaciones que comprenden 5 mg/ml de Acml y 50 mg/ml de Acml se realizó para identificar un pH para minimizar el cambio de la glicación en el grupo de unión HCDR3-Lys98 de MUC16, un amortiguador y una concentración adecuados para mantener el pH y superar el efecto de Donnan observado durante la fabricación, un estabilizador térmico adecuado a una concentración para mantener la viscosidad y tonicidad deseadas, y un surfactante adecuado a una concentración suficiente para la dilución durante la administración IV, mientras se mantiene una formulación líquida estable.

Como se analizó anteriormente, la glicación en el grupo de unión HC-CDR3-Lys98 de MUC16 tiene un impacto directo en la potencia. La desglicación conduce a un aumento de la potencia según lo medido por el bioensayo. El factor de formulación principal que afecta la velocidad de desglicación en el Acml es el pH. El efecto del pH en los niveles de glicación y especies de alto peso molecular (HMW) se investigó en formulaciones líquidas mediante la incubación de 2 mg/ml de Acml a 5 °C durante 36 meses o 25 °C durante 2 meses en 10 mM de histidina, sacarosa al 10 % (p/v), y polisorbato 20 al 0.05 % (p/v) a tres pH diferentes: 5.0, 5.5, y 6.0 (Figuras 2A-2D). Las principales vías de degradación observadas en estas condiciones son la formación de especies de HMW y la desglicación en HC-CDR3-Lys98 según lo detectado por CEX-UPLC. Como se redujo el pH de la formulación del Acml, se formaron los niveles de especies de HMW y disminuyeron las velocidades de desglicación.

Dado que la histidina no es un buen amortiguador con un pH de 5.0, se eligió el acetato de sodio como amortiguador para las formulaciones líquidas de Acml. El efecto del pH se investigó mediante la incubación de 50 mg/ml de Acml en 10 mM de acetato con 5 % (p/v) de sacarosa y cinco pH

diferentes: 4.8, 5.0, 5.2, 5.5, y 5.7 bajo estrés térmico. Después de incubar a 40 °C durante 28 días, las principales vías de degradación fueron la formación de especies de HMW y la desglicación en HC-CDR3-Lys98. De acuerdo con la observación en el amortiguador de histidina, se formaron los niveles de especies de HMW y las velocidades de desglicación disminuyeron a un pH más bajo (Figuras 3A-3B). Se seleccionó el pH 5.0 como el objetivo para producir una formulación robusta para la cual las variaciones de fabricación normales permanecerán en el intervalo requerido para estabilizar el Acm1.

El efecto de la concentración de acetato en la estabilidad de formulaciones de Acm1 de 150 mg/ml a pH 5.0 se examinó en formulaciones líquidas. Las formulaciones que contienen amortiguador de acetato en el intervalo de 21 a 40 mM se incubaron a 45 °C durante 14 días. La temperatura más alta permite la detección rápida de la degradación de proteínas. Los análisis revelaron que la formación de especies de HMW y variantes de carga fueron las principales vías de degradación. En base a los datos, se seleccionó un aumento en la concentración de acetato que produjo un aumento de las especies de HMW y 30 mM. Una concentración de 30 mM de acetato es capaz de abordar el efecto de Donnan observado durante el proceso de fabricación. Como resultado del efecto Donnan, se requiere 30 mM de acetato para mantener el pH de la formulación a 5.0. Esta concentración de acetato proporcionó una mejor estabilización con respecto a la formación de especies de HMW en esta condición de estrés en comparación con formulaciones con concentraciones más altas de acetato (Tabla 39). Por lo tanto, se seleccionó 30 mM como la concentración de acetato para las formulaciones líquidas de Acm1 para administración IV.

Tabla 39: Estabilidad de 150 mg/ml de Acm1 en amortiguador de acetato, pH 5.0, incubado a 45 °C durante 14 días

Formulación		150 mg/ml de Acm1 en amortiguador de acetato, pH 5.0			
Volumen de carga		0.5 ml			
Contenedor/Cierre		2R USP/Ph. Eur. Vial de vidrio de borosilicato tipo 1; tapón elastomérico de butilo recubierto con FluroTec® de 13 mm; sello Flip-Off® de 13 mm			
Condiciones de almacenamiento		45 °C durante 14 días			
Amortiguador		t = 0 ^a	21 mM de acetato	30 mM de acetato	40 mM de acetato
Color y aspecto ^b		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm) ^c		0.00	0.02	0.03	0.06
pH		5.0	5.0	5.1	5.1
Proteínas totales mediante RP-UPLC (mg/ml)		155	152	166	161
SE-UPLC (%)	HMW	1.3	18.1	20.0	21.9
	Pureza	98.4	80.1	78.7	76.8
	LMW	0.3	1.8	1.4	1.3
CEX-UPLC (%)	Región 1	47.1	22.3	23.7	24.0
	Glicado	28.9	5.0	5.5	5.5
	Región 2	48.4	73.3	72.0	71.6
	Región 3	4.5	4.4	4.4	4.4

a t = 0 resultados informados representan un promedio de los valores iniciales para todas las muestras de este estudio

b La muestra pasa la inspección de aspecto visual y color si es transparente a ligeramente opalescente, esencialmente libre de partículas visibles e incolora a amarillo pálido.

c En comparación con t = 0 para cada formulación

5 CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; HMW, alto peso molecular; LMW, bajo peso molecular; OD, densidad óptica; Ph. Eur; Farmacopea Europea; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento; USP, Farmacopea de los Estados Unidos

El efecto de la sacarosa en la estabilidad del Acm1 se examinó en formulaciones líquidas (150 mg/ml de Acm1, 30 mM de acetato, pH 5.0 con 0 a 13 % [p/v] de sacarosa) bajo
10 congelación/descongelación y estrés térmico. La temperatura más alta permite la detección rápida de la degradación de proteínas bajo estos estreses. En condiciones de estrés de congelación/descongelación, la formación de especies de HMW fue la principal vía de degradación (Tabla 40). Bajo 45 °C de estrés térmico, la formación de especies de HMW y LMW y las variantes de cambio de carga fueron las principales vías de degradación. Las formulaciones con una mayor
15 concentración de sacarosa (≥ 10 %) proporcionaron una mejor estabilización al reducir el nivel de las especies HMW y LMW y la velocidad de desglicación en HC-CDR3-Lys98 (Tabla 41). Para mantener la viscosidad y tonicidad deseadas para el Acm1, se seleccionó sacarosa al 10 % (p/v) como el estabilizador térmico para las formulaciones líquidas para la administración IV.

Tabla 40: Estabilidad de 150 mg/ml de Acm1 en 30 mM de amortiguador de acetato con diferentes
20 concentraciones de sacarosa, pH 5.0, en condición de estrés de congelación/descongelación

Formulación		150 mg/ml de Acm1 en 30 mM de amortiguador de acetato, pH 5.0					
Volumen de carga		0.5 ml					
Contenedor/Cierre		2R USP/Ph. Eur. Vial de vidrio de borosilicato tipo 1; tapón de goma de butilo recubierto con FluroTec® de 13 mm; sello Flip-Off® de 13 mm					
Condición de estrés		8 ciclos de congelación/descongelación					
Estabilizador térmico		t = 0 ^a	0 % (p/v) de sacarosa	2 % (p/v) de sacarosa	5 % (p/v) de sacarosa	10 % (p/v) de sacarosa	13 % (p/v) de sacarosa
Color y aspecto ^b		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm) ^c		0.00	0.02	0.00	0.00	0.00	0.01
pH		5.0	5.1	5.1	5.1	5.1	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		155	148	150	162	149	157
SE-UPLC (%)	HMW	1.3	2.4	1.5	1.4	1.4	1.4
	Pureza	98.4	97.1	98.2	98.3	98.3	98.4
	LMW	0.3	0.5	0.3	0.3	0.3	0.3
CEX-UPLC (%)	Región 1	47.1	46.3	46.8	46.8	47.0	46.9
	Glicado	28.9	28.7	28.3	28.4	27.9	28.5
	Región 2	48.4	48.5	48.4	48.4	48.3	48.4
	Región 3	4.5	5.2	4.8	4.8	4.8	4.7

a t = 0 resultados informados representan un promedio de los valores iniciales para todas las muestras de este estudio

b La muestra pasa la inspección de aspecto visual y color si es transparente a ligeramente opalescente, esencialmente libre de partículas visibles e incolora a amarillo pálido.

c En comparación con t = 0 para cada formulación

5 CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; HMW, alto peso molecular; LMW, bajo peso molecular; OD, densidad óptica; Ph. Eur; Farmacopea Europea; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento; USP, Farmacopea de los Estados Unidos

Tabla 41: Estabilidad de 150 mg/ml de Acml en 30 mM de amortiguador de acetato con diferentes concentraciones de sacarosa, pH 5.0, incubado a 45 °C durante 14 días

10

Formulación		150 mg/ml de Acml en 30 mM de amortiguador de acetato, pH 5.0					
Volumen de carga		0.5 ml					
Contenedor/Cierre		2R USP/Ph. Eur. Vial de vidrio de borosilicato tipo 1; tapón de goma de butilo recubierto con FluroTec® de 13 mm; sello Flip-Off® de 13 mm					
Condiciones de almacenamiento		45 °C durante 14 días					
Estabilizador térmico		t = 0ª	0 % (p/v) de sacarosa	2 % (p/v) de sacarosa	5 % (p/v) de sacarosa	10 % (p/v) de sacarosa	13 % (p/v) de sacarosa
Color y aspecto ^b		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm) ^c		0.00	0.03	0.03	0.03	0.01	0.02
pH		5.0	5.1	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (mg/ml)		155	166	156	157	161	165
SE-UPLC (%)	HMW	1.3	20.0	26.0	23.4	17.3	14.5
	Pureza	98.4	78.7	72.8	75.6	81.8	84.7
	LMW	0.3	1.4	1.2	1.1	0.9	0.8
CEX-UPLC (%)	Región 1	47.1	23.7	24.7	25.1	27.1	28.3
	Glicado	28.9	5.5	6.1	5.1	6.7	8.1
	Región 2	48.4	72.0	70.8	70.4	68.3	67.1
	Región 3	4.5	4.4	4.5	4.5	4.6	4.5

15

a t = 0 resultados informados representan un promedio de los valores iniciales para todas las muestras de este estudio

b La muestra pasa la inspección de aspecto visual y color si es transparente a ligeramente opalescente, esencialmente libre de partículas visibles e incolora a amarillo pálido.

c En comparación con t = 0 para cada formulación

25 CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; HMW, alto peso molecular; LMW, bajo peso molecular; OD, densidad óptica; Ph. Eur; Farmacopea Europea; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento; USP, Farmacopea de los Estados Unidos

Se demostró la necesidad de un surfactante durante el desarrollo inicial de las formulaciones de Acml. Cuando no había ningún surfactante presente, se observó un aumento en las especies de HMW del Acml cuando la formulación se agitó mediante vórtex. La adición de surfactante estabilizó el Acml al estrés de la agitación. En el desarrollo inicial, se eligió el polisorbato 20 como el surfactante debido a la estabilidad térmica mejorada en comparación con el polisorbato 80. La

formulación del Acm1 prevista para la administración IV también requiere polisorbato 20 en la formulación para estabilizar el Acm1 cuando se diluye en cloruro de sodio al 0.9 % para la administración IV.

El efecto del polisorbato 20 sobre la estabilidad del Acm1 se examinó en formulaciones líquidas (50 mg/ml de Acm1, 30 mM de acetato, sacarosa al 10 % [p/v], pH 5.0 con de 0 a 0.25 % [p/v] de polisorbato 20) bajo estrés térmico y de agitación.

Bajo estrés de agitación, el Acm1 fue estable en todas las formulaciones líquidas analizadas (Tabla 42). Bajo estrés térmico de 45 °C, la formación de especies de HMW y variantes de carga fueron las principales vías de degradación (Tabla 43). El aumento de la concentración de polisorbato 20 no tuvo un impacto significativo en la formación de la variante de carga; sin embargo, se observaron algunos aumentos en los niveles de especies de HMW formadas con el aumento de la concentración de polisorbato 20. Dado que estas formulaciones de Acm1 están destinadas a la administración IV diluyéndolas en cloruro de sodio al 0.9 %, las formulaciones contendrán polisorbato 20 al 0.2 % (p/v). El polisorbato 20 al 0.2 % estabiliza el Acm1 y proporciona una estabilización suficiente del Acm1 cuando se diluye para administración IV.

Tabla 42: Estabilidad de 50 mg/ml de Acm1 en 30 mM de amortiguador de acetato, sacarosa al 10 % (p/v), pH 5.0 con polisorbato 20, agitado por vórtex

Formulación		50 mg/ml de Acm1 en 30 mM de amortiguador de acetato, 10 % (p/v) de sacarosa, pH 5.0					
Volumen de carga		0.5 ml					
Contenedor/Cierre		2R USP/Ph. Eur. Vial de vidrio de borosilicato tipo 1; tapón de goma de butilo recubierto con FluroTec® de 13 mm; sello Flip-Off® de 13 mm					
Condición de estrés		Agite en vórtex a 1,000 rpm durante 60 min					
Surfactante		t = 0 ^a	0 % (p/v) de polisorbato 20	0.05 % (p/v) de polisorbato 20	0.10 % (p/v) de polisorbato 20	0.20 % (p/v) de polisorbato 20	0.25 % (p/v) de polisorbato 20
Color y aspecto ^b		Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm) ^c		0.00	0.00	0.01	0.01	0.00	0.00
pH		5.1	5.0	5.0	5.1	5.0	5.1
Proteínas totales (mg/ml)		51	48	49	49	49	49
SE-UPLC (%)	HMW	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7	1.7
	Pureza	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0	98.0
	LMW	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
CEX-UPLC (%)	Región 1	43.4	43.3	43.3	43.5	43.3	43.6
	Glicado	30.9	31.0	31.0	30.9	30.9	31.3
	Región 2	51.8	51.9	51.9	51.6	51.9	51.8
	Región 3	4.8	4.8	4.8	4.9	4.8	4.6

a t = 0 resultados informados representan un promedio de los valores iniciales para todas las muestras de este estudio

b La muestra pasa la inspección de aspecto visual y color si es transparente a ligeramente opalescente, esencialmente libre de partículas visibles e incolora a amarillo pálido.

c En comparación con t = 0 para cada formulación

CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; HMW, alto peso molecular; LMW, bajo peso molecular; OD, densidad óptica; Ph. Eur; Farmacopea Europea; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento; USP, Farmacopea de los Estados Unidos

Tabla 43: Estabilidad de 50 mg/ml de Acm1 en 30 mM de amortiguador de acetato, sacarosa al 10 % (p/v), pH 5.0 con polisorbato 20, incubado a 45 °C durante 14 días

Formulación	50 mg/ml de Acm1 en 30 mM de amortiguador de acetato, 10 % (p/v) de sacarosa, pH 5.0					
Volumen de carga	0.5 ml					
Contenedor/Cierre	2R USP/Ph. Eur. Vial de vidrio de borosilicato tipo 1; tapón de goma de butilo recubierto con FluroTec® de 13 mm; sello Flip-Off® de 13 mm					
Condiciones de almacenamiento	45 °C durante 14 días					
Surfactante	t = 0 ^a	0 % (p/v) de polisorbato 20	0.05 % (p/v) de polisorbato 20	0.10 % (p/v) de polisorbato 20	0.20 % (p/v) de polisorbato 20	0.25 % (p/v) de polisorbato 20
Color y aspecto ^b	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado
Turbidez (Aumento de la DO a 405 nm) ^c	0.00	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01
pH	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1	5.1
Proteínas totales (mg/ml)	51	50	50	51	51	50
SE-UPLC (%)	HMW	1.7	4.2	5.1	5.1	6.0
	Pureza	98.0	95.0	94.0	94.0	93.1
	LMW	0.3	0.9	0.9	0.9	0.9
CEX-UPLC (%)	Región 1	43.4	17.7	17.4	17.4	16.6
	Glicado	30.9	8.0	7.8	7.9	7.3
	Región 2	51.8	75.1	74.5	74.7	74.8
	Región 3	4.8	7.2	8.1	7.9	8.6

a t = 0 resultados informados representan un promedio de los valores iniciales para todas las muestras de este estudio

b La muestra pasa la inspección de aspecto visual y color si es transparente a ligeramente opalescente, esencialmente libre de partículas visibles e incolora a amarillo pálido.

c En comparación con t = 0 para cada formulación

CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; HMW, alto peso molecular; LMW, bajo peso molecular; OD, densidad óptica; Ph. Eur; Farmacopea Europea; SE, exclusión por tamaño; UPLC, cromatografía líquida de ultra rendimiento; USP, Farmacopea de los Estados Unidos

Se realizaron estudios de estabilidad a largo plazo, acelerados y en condiciones de estrés para verificar la estabilidad de las formulaciones líquidas. Los resultados indicaron que estas formulaciones proporcionan una estabilidad adecuada.

Ejemplo 5: Desarrollo de formulaciones de anticuerpos biespecíficos líquidas Anti-MUC16 x Anti-CD3 para administración subcutánea y estabilidad de formulaciones

Se llevó a cabo el desarrollo de formulaciones subcutáneas (SC), que incluyen formulaciones que comprenden 150 mg/ml de Acm1 para identificar los excipientes y las concentraciones maximizadas para la administración SC y la estabilidad.

Los parámetros de amortiguador, pH y surfactante se identificaron para la formulación IV (Ejemplo 4) y estos parámetros se aplicaron a la formulación subcutánea. La concentración de surfactante (polisorbato 20) también se caracterizó durante el desarrollo de la formulación IV y los datos se usaron para seleccionar una concentración de surfactante adecuada para una formulación subcutánea. El amortiguador, el pH y el tipo de surfactante y la concentración se mantuvieron constantes en los siguientes niveles durante el desarrollo de la formulación subcutánea para el Acm1:

- pH: 5.0. Minimizar la velocidad de desglucación y formación de especies de HMW
- Solución amortiguadora: 30 mM de acetato de sodio. Mantener un pH de 5.0, incluso con el efecto de Donnan observado durante el procesamiento
- Surfactante: polisorbato 20 al 0.05 % (p/v). Equilibrar la estabilidad con el estrés de la agitación y, al mismo tiempo, minimizar el impacto en la estabilidad térmica

Otros factores que se evaluaron para la formulación SC del Acm1 son los siguientes:

- Concentración del Acm1: evaluada en el intervalo de 50-150 mg/ml
 - Concentración del Acm1 para alcanzar la dosis clínica requerida mientras se mantiene la estabilidad durante al menos 24 meses cuando se almacena a una temperatura de 2-8 °C y se mantiene una viscosidad menor que 20 cP a 20 °C, con una osmolalidad objetivo de 290-400 mOsm/kg.
- Concentración de sacarosa: evaluada en el intervalo 2-10 %
 - Concentración de sacarosa para proporcionar suficiente estabilidad térmica, a la vez que se minimizan los impactos en la osmolalidad y la viscosidad
 - Se requiere al menos un 2 % (p/v) de sacarosa para estabilizar el Acm1 para el estrés de congelación/descongelación
- Concentración de arginina: evaluada en el intervalo de 0-100 mM
 - Evaluar la capacidad de la arginina para reducir la viscosidad y evaluar el impacto en la estabilidad y la osmolalidad

Las formulaciones evaluadas para la administración SC se muestran en la Tabla 44, más abajo.

Tabla 44: Formulaciones evaluadas para la administración SC de Acm1

Número de la formulación	[Proteína] (mg/ml)	[Sacarosa] (% p/v)	[Arginina] (mM)	Acetato (mM)	Polisorbato 20 (%)
1	100	2	37.5	30	0.05
2	100	10	0	30	0.05
3	50	2	100	30	0.05
4	150	10	100	30	0.05
5	50	2	0	30	0.05
6	50	10	100	30	0.05

7	150	10	50	30	0.05
8	50	6	50	30	0.05
9	100	6	100	30	0.05
10	150	4.44	0	30	0.05
11	100	6	50	30	0.05
12	150	2	100	30	0.05

5 Análisis de la viscosidad – La Figura 4 muestra la dependencia de la viscosidad del Acm1 como una función de la concentración del Acm1, la concentración de sacarosa y la concentración de arginina. Se realizaron las siguientes observaciones a partir de este estudio: (i) El factor principal que contribuye a la viscosidad es la concentración de Acm1. En el intervalo de 50-150 mg/ml, la viscosidad aumenta exponencialmente de aproximadamente 2 cP a aproximadamente 11 cP (a 20
10 °C); (ii) Existe una pequeña dependencia de la viscosidad en la sacarosa. A una concentración de 150 mg/ml de Acm1, cuando la sacarosa varía de 2-10 % (p/v), la viscosidad aumenta de aproximadamente 11 cP a 13 cP (a 20 °C); y (iii) El efecto de la concentración de arginina sobre la viscosidad es similar en magnitud a la sacarosa, pero el aumento de la arginina disminuye la viscosidad de aproximadamente 11 cP a 9 cP (a 20 °C).

15 Análisis de osmolalidad – La Figura 5 muestra la dependencia de la osmolalidad del Acm1 como una función de la concentración del Acm1, la concentración de sacarosa y la concentración de arginina. Se realizaron las siguientes observaciones a partir de este estudio: (i) la concentración de Acm1 hace una contribución insignificante a la osmolalidad en el intervalo de 50-150 mg/ml; (ii) El factor principal que contribuye a la osmolalidad es la sacarosa. A una concentración de 150 mg/ml
20 de Acm1, cuando la sacarosa varía de 2-10 % (p/v), la osmolalidad aumenta de aproximadamente 90 mOsm/kg a aproximadamente 410 mOsm/kg; y (iii) El aumento de la concentración de arginina también da como resultado un aumento de la osmolalidad. A 150 mg/ml de Acm1, el aumento de la arginina de 0-100 mM aumenta la osmolalidad de aproximadamente 90 mOsm/kg a aproximadamente 300 mOsm/kg.

25 Análisis de estabilidad – La Figura 6 muestra la estabilidad del Acm1 como una función de la concentración del Acm1, la concentración de sacarosa y la concentración de arginina. En este estudio, se evaluó la formación de especies de HMW a 25 °C/60 % de HR y 40 °C/75 % de HR. Además, se evaluó la pérdida de especies ácidas y la pérdida de especies glicadas en las mismas condiciones. Se realizaron las siguientes observaciones: (i) El aumento de la concentración de
30 sacarosa provocó una disminución de las velocidades de formación de HMW a 25 °C/60 % de HR

y 40 °C/75 % de HR; (ii) El aumento de la concentración de arginina provocó una disminución de la velocidad de formación de HMW a 25 °C/60 % de HR, pero un aumento de la velocidad de formación de HMW a 40 °C/75 % de HR; (iii) El aumento de la concentración de sacarosa provocó una reducción de la velocidad de las especies de ácidas y la formación de especies glicadas a 25 °C/60 % de HR. (Las especies ácidas y glicadas disminuyen con el tiempo, por lo que una velocidad
5 menos negativa significa menos degradación con el tiempo); y (iv) El aumento de la concentración de arginina provocó una velocidad reducida de formación de especies glicadas a 25 °C/60 % de HR. En base a los estudios de desarrollo anteriores (por ejemplo., los Ejemplos 1 y 2) y este estudio, se seleccionaron dos formulaciones principales para una evaluación adicional de la estabilidad, viscosidad y osmolalidad. Las dos formulaciones principales y las respectivas viscosidades y
10 osmolalidades se muestran en la Tabla 45, más abajo. Ambas formulaciones cumplieron con los objetivos de viscosidad y osmolalidad a una concentración de Acm1 de 150 mg/ml. Ambas formulaciones mostraron una estabilidad comparable cuando se incubaron durante 3 meses a 40 °C/75 % de HR, 6 meses a 25 °C/60 % de HR o 6 meses a 2-8 °C (Figuras 7A y 7B). Ambas formulaciones mostraron cambios comparables en las especies de HMW y las especies glicadas.

15 Tabla 45: Formulaciones por vía SC de Acm1 ilustrativas

FORMULACIONES	VISCOSIDAD A 20C (CP)	OSMOLALIDAD (MMOL/KG)
150 mg/ml de Acm1, 30 mM de acetato, 8 % (p/v) de sacarosa, PS20 al 0.05 % (p/v), pH 5.0	12.6	333
150 mg/ml de Acm1, 30 mM de acetato, 7 % (p/v) de sacarosa, 50 mM de arginina, PS20 al 0.05 % (p/v), pH 5.0	11.6	389

En base a estos datos, ambas formulaciones son comparables. La arginina no se seleccionó como excipiente en la formulación subcutánea, ya que proporciona poca mejora en la estabilidad o la viscosidad, pero provoca un aumento en la osmolalidad. Por lo tanto, una formulación subcutánea
25 ilustrativa preferida es: 150 mg/ml de Acm1; 30 mM de acetato, pH 5.0; 8 % p/v de sacarosa; y 0.05 % p/v de polisorbato 20.

También se iniciaron estudios de estabilidad para evaluar el almacenamiento, el estrés y la estabilidad acelerada de las formulaciones de Acm1. Los estudios de estabilidad incluyeron una
30 formulación subcutánea (SC) (150 mg/ml de Acm1 en 30 mM de acetato de sodio, sacarosa al 8 % (p/v), polisorbato 20 al 0.05 % (p/v), pH 5.0) almacenada en viales de vidrio de borosilicato Schott

6R. Las formulaciones líquidas se incubaron en condiciones de almacenamiento, de estrés y aceleradas. Las condiciones aceleradas y de estrés se seleccionaron para simular las condiciones más allá de las cuales el producto farmacológico puede someterse durante la fabricación y la manipulación y para dilucidar las vías de degradación para el Acm1. También se evaluó la estabilidad bajo condiciones de estrés adicionales, que incluyen la agitación y la congelación/descongelación.

El anticuerpo (Acm1) en las formulaciones evaluadas fue física y químicamente estable cuando se almacenó a 5 °C durante al menos 6 meses (Tabla 46). No se detectaron cambios apreciables en la estabilidad en ninguno de los atributos monitoreados a 5 °C en los viales 6R. Los resultados del análisis de las formulaciones de Acm1 después de la incubación en condiciones aceleradas y de estrés se proporcionan en la Tabla 47. Después de la incubación durante 6 meses a 25 °C/60 % de HR, se observó un aumento del 1.7 % de especies de HMW mediante SE-UPLC. Se observaron diferentes tendencias para la variante de carga mediante CEX-UPLC e iCIEF debido a diferentes sensibilidades de cada ensayo. El iCIEF observó un aumento en la Región 1, con una disminución concomitante en la Región 2. Se observó una disminución en la Región 1, con un aumento concomitante en la Región 2, mediante CEX-UPLC cuando se almacenó a 25 °C/60 % de HR durante un máximo de 6 meses debido a la desglicación en el grupo HC-CDR3-Lys98 de MUC16 (la desglicación también se produce en condiciones de estrés térmico). Los resultados de la condición acelerada indicaron que las formulaciones líquidas son estables bajo estrés térmico en viales 6R.

Después de la incubación durante 3 meses a 40 °C/75 % de HR, se observaron aumentos de 15.9 y 1.1 % en especies de HMW y LMW, respectivamente, mediante SE-UPLC. Se observaron diferentes tendencias para la variante de carga mediante CEX-UPLC e iCIEF debido a diferentes sensibilidades de cada ensayo. Se observó un aumento en la Región 1, con disminuciones concomitantes en las Regiones 2 y 3, mediante iCIEF después de la incubación a 40 °C/75 % de HR durante un máximo de 3 meses, probablemente debido a la desamidación con asparagina o glutamina. Después de la incubación durante un máximo de 2 meses a 40 °C/75 % de HR, hay una disminución en la Región 1, con un aumento concomitante en la Región 2 observado mediante CEX-UPLC debido a la desglicación en el grupo HC-CDR3-Lys98 de MUC16 (la desglicación también se produce en condiciones de estrés acelerado). A esto le sigue un aumento aparente en la Región 1, con una disminución concomitante en la Región 2, observada mediante CEX-UPLC en el punto temporal de 3 meses, probablemente debido a la reacción de desamidación competitiva. También hay un aumento del 16.3 % en la Región 3 después de 3 meses a 40 °C/75 % de HR que se observa mediante CEX-

UPLC. Se determinó que este aumento estaba compuesto por especies oligoméricas de Acm1, que incluyen principalmente especies de tetrámero, pentámero, hexámero y heptámero. Los resultados de la incubación de las formulaciones de Acm1 a 40 °C/75 % de HR indicaron que la formación de especies de HMW y LMW y el cambio en la distribución de variantes de carga son las principales vías de degradación para el producto farmacológico Acm1.

Las formulaciones de Acm1 fueron física y químicamente estables cuando se agitaron en vórtex durante 60 o 120 minutos (Tabla 48). No se detectó ningún cambio apreciable en la estabilidad física o química en ninguno de los atributos monitoreados. Las formulaciones de Acm1 también fueron física y químicamente estables cuando se sometieron a 4 ciclos de congelación y descongelación (Tabla 48). No se detectó ningún cambio apreciable en la estabilidad física o química en ninguno de los atributos monitoreados.

Tabla 46: Estabilidad del producto farmacológico Acm1 almacenado a 5 °C

Formulación	150.0 mg/ml de REGN4018, 30 mM de acetato, 8 % (p/v) de sacarosa y 0.05 % (p/v) de polisorbato 20.				
Contenedor de almacenamiento	USP/EP Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 6R ISO; tapón líquido West S10-F451 4432/50 B2-40 de 20 mm; sello de aluminio West de 20 mm con botón de apertura fácil				
Condiciones de almacenamiento	5 °C, vertical				
Ensayo	Criterios de aceptación de calidad ^a	Duración del almacenamiento (meses)			
		T=0	1	3	6
Forma/Condición física	Líquido esencialmente libre de partículas visibles	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia	No más turbia que la suspensión de referencia IV	No > II	No > II	No > II	No > II
Color	Color no más intenso que el de la solución de referencia BY2	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4
pH	4.7 a 5.3	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (SoloVPE)	135 a 165 mg/ml	144.8	145.3	150.7	146.2
Potencia mediante bioensayo	50-150 %	103	NR	NR	146
Pureza mediante SE-UPLC	a. Pureza ≥ 90 % del área total del pico	97.8	97.7	97.5	97.4
	b. ≤ 5 % de especies de LMW	0.0	0.0	0.0	0.0
	c. ≤ 7 % de especies de HMW	2.2	2.3	2.5	2.6
Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de informe Región 1	39.9	NR	NR	40.2
	% de informe Región 2	41.9	NR	NR	42.7
	% de informe Región 3	18.2	NR	NR	17.1
Análisis de variantes de carga mediante CEX	a. 15-60 % Región 1	45.7	45.5	44.3	43.5
	b. % de especies glicadas (% del informe)	32.4	32.6	31.6	31.2
	c. ≥ 35 % Región 2	48.3	48.8	49.9	50.9
	d. ≤ 25 % Región 3	6.0	5.8	5.8	5.6
Material particulado (oscurecimiento de la luz)	≥ 10 µm: ≤ 6,000 (partículas/contenedor)	13	NR	NR	22
	≥ 25 µm: ≤ 600 (partículas/contenedor)	0	NR	NR	4
Material particulado (MFI™)	Informe de partículas/ml: 2 µm ≤ x < 10 µm (partícula/ml)	3,641	NR	NR	1,829
	≥ 10 µm (partícula/ml)	240	NR	NR	86
	≥ 25 µm (partícula/ml)	34	NR	NR	23
Contenido de polisorbato 20	0.05 ± 0.025 % PS20	0.05	NR	NR	0.06

a. Criterios adoptados del objetivo de calidad de la plataforma FDG FBP-015-FD con ajuste específico del programa. NR indica pruebas que no se realizan en el punto cronológico establecido. CEX, intercambio catiónico; DS, principio activo; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, isoelectroenfoque capilar por imágenes; LMW, bajo peso molecular; MFI, Micro-Flow Imaging™; MP, pico principal; SE-UPLC, cromatografía líquida de exclusión por tamaños de ultra alto rendimiento; NR, no se requiere; LEFVP, líquido esencial libre de partículas visibles.

Tabla 47: Estabilidad del producto farmacológico Acm1 incubado a 25°C/60% de HR y 40°C

Formulación		150.0 mg/ml de REGN4018, 30 mM de acetato, 8 % (p/v) de sacarosa y 0.05 % (p/v) de polisorbato 20.								
Contenedor de almacenamiento		USP/EP Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 6R ISO; tapón líquido West S10-F451 4432/50 B2-40 de 20 mm; sello de aluminio West de 20 mm con botón de apertura fácil								
Condiciones de almacenamiento		Sin almacenamiento	Almacenamiento a 25 °C/60 % de HR (meses)				Almacenamiento a 40 °C (meses)			
Ensayo		T = 0	0.5	1	3	6	0.25	0.5	1	3
Forma/Condición física	Líquido esencialmente libre de partículas visibles	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia	No más turbia que la suspensión de referencia IV	No > II	No > III	No > III	No > III	No > III	No > II	No > III	No > III	No > III
Color	Color no más intenso que el de la solución de referencia BY2	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY3
pH	4.7 a 5.3	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales (SoloVPE)	135 a 165 mg/ml	144.8	149.0	145.3	153.9	148.4	145.2	148.9	144.8	147.9
Potencia mediante bioensayo	50-150 %	103	NR	NR	NR	148	NR	NR	NR	132
Pureza mediante SE-UPLC	a. Pureza ≥ 90 % del área total del pico	97.8	97.4	97.2	96.6	96.0	95.7	94.8	92.2	80.9
	b. ≤ 5 % de especies de LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.3	0.0	0.1	1.1
	c. ≤ 7 % de especies de HMW	2.2	2.6	2.8	3.3	3.9	4.0	5.2	7.7	18.1
Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de informe Región 1	39.9	NR	NR	NR	49.0	NR	NR	NR	72.0
	% de informe Región 2	41.9	NR	NR	NR	33.5	NR	NR	NR	18.0
	% de informe Región 3	18.2	NR	NR	NR	17.5	NR	NR	NR	10.0
Análisis de variantes de	a. 15-60 % Región 1	45.7	41.3	38.8	29.2	23.1	30.8	23.4	18.3	25.1

5	carga mediante CEX	b. % de especies glicadas (% del informe)	32.4	29.5	27.5	18.6	13.2	20.3	13.5	7.5	12.2
		c. ≥ 35 % Región 2	48.3	53.0	56.2	65.6	71.3	63.7	69.5	72.4	55.6
		d. ≤ 25 % Región 3	6.0	5.6	5.0	5.2	5.6	5.5	7.1	9.3	19.3
5	Material particulado (oscurecimiento de la luz)	$\geq 10 \mu\text{m}$: $\leq 6,000$ partículas/contenedor	13	NR	NR	NR	25	NR	NR	NR	48
		$\geq 25 \mu\text{m}$: ≤ 600 partículas/contenedor	0	NR	NR	NR	2	NR	NR	NR	5
10	Material particulado (MFI™)	$2 \mu\text{m} \leq x < 10 \mu\text{m}$ (partículas/ml)	3,641	NR	NR	NR	1,238	NR	NR	NR	653
		$\geq 10 \mu\text{m}$ (partículas/ml)	240	NR	NR	NR	29	NR	NR	NR	33
		$\geq 25 \mu\text{m}$ (partículas/ml)	34	NR	NR	NR	2	NR	NR	NR	2
	Contenido de polisorbato 20	% de informe PS20	0.05	NR	NR	NR	0.06	NR	NR	NR	0.05

NR indica pruebas que no se realizan en el punto cronológico establecido.

CEX, intercambio catiónico; DS: sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, isoelectroenfoque capilar por imágenes; LMW, bajo peso molecular; MFI, Micro-Flow Imaging™; MP, pico principal; SE-UPLC, cromatografía líquida de exclusión por tamaños de ultra alto rendimiento; NR, no se requiere

Tabla 48: Estabilidad del producto farmacológico Acml — Efecto de la agitación y congelación/descongelación

20	Formulación		150.0 mg/ml de REGN4018, 30 mM de acetato, 8 % (p/v) de sacarosa y 0.05 % (p/v) de polisorbato 20.				
	Contenedor de almacenamiento		USP/EP Vial de vidrio de borosilicato tipo 1 6R ISO; tapón líquido West S10-F451 4432/50 B2-40 de 20 mm; sello de aluminio West de 20 mm con botón de apertura fácil				
25	Condiciones de almacenamiento		Sin estrés	Agitación (minutos)		Congelación/descongelación (ciclos)	
	Ensayo		T = 0	60	120	2	4
25	Forma/Condición física	Líquido esencialmente libre de partículas visibles	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
	Transparencia	No más turbia que la suspensión de referencia IV	No > II	No > II	No > II	No > II	No > II
	Color	Color no más intenso que el de la solución de referencia BY2	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4
30	pH		4.7 a 5.3	5.0	5.0	5.0	5.0
	Proteínas totales (SoloVPE)		135 a 165 mg/ml	144.8	144.4	144.4	145.7
						147.9	

5	Potencia mediante bioensayo	50-150 %	103	NR	138	NR	97
	Pureza mediante SE-UPLC	a. Pureza ≥ 90 % del área total del pico	97.8	97.8	97.8	97.8	97.8
		b. ≤ 5 % de especies de LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1
		c. ≤ 7 % de especies de HMW	2.2	2.2	2.2	2.2	2.1
	Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de informe Región 1	39.9	NR	40.3	NR	39.5
% de informe Región 2		41.9	NR	42.3	NR	42.5	
% de informe Región 3		18.2	NR	17.5	NR	18.0	
10	Análisis de variantes de carga mediante CEX	a. 15-60 % Región 1	45.7	45.7	45.8	45.2	45.5
		b. % de especies glicadas (% del informe)	32.4	32.4	32.5	32.0	32.3
		c. ≥ 35 % Región 2	48.3	48.3	48.3	48.8	48.4
		d. ≤ 25 % Región 3	6.0	6.0	6.0	6.1	6.0
15	Material particulado (oscurecimiento de la luz)	$\geq 10 \mu\text{m}$: $\leq 6,000$ partículas/contenedor	13	NR	4	NR	40
		$\geq 25 \mu\text{m}$: ≤ 600 partículas/contenedor	0	NR	0	NR	3
20	Material particulado (MFI™)	$2 \mu\text{m} \leq x < 10 \mu\text{m}$ (partículas/ml)	3,641	NR	1,470	NR	271
		$\geq 10 \mu\text{m}$ (partículas/ml)	240	NR	73	NR	13
		$\geq 25 \mu\text{m}$ (partículas/ml)	34	NR	0	NR	2
	Contenido de polisorbato 20	% de informe PS20	0.05	NR	0.05	NR	0.05

NR indica pruebas que no se realizan en el punto cronológico establecido.

DS, sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; LMW, bajo peso molecular; MFI, Micro-Flow Imaging™; MP, pico principal; SE-UPLC, cromatografía líquida de ultra alto rendimiento con exclusión por tamaño; NR, no se requiere. Se iniciaron estudios de estabilidad adicionales para determinar el almacenamiento a largo plazo, la estabilidad acelerada (temperaturas por encima de las condiciones de almacenamiento) y la estabilidad en condiciones de estrés (40 °C/75 % de HR, agitación, congelación y descongelación) de formulaciones de Acm1 a 150 mg/ml de anticuerpo. Las formulaciones de Acm1 con 150 mg/ml de anticuerpo se llenaron en viales de policarbonato de 5 ml para la agitación,

congelación/descongelación y almacenamiento en congelación y en condiciones aceleradas y almacenamiento en estrés. Los viales de policarbonato son representativos del contenedor de almacenamiento usado para las formulaciones de Acm1 (sustancia farmacológica formulada) que se fabrican en las instalaciones de GMP. Las formulaciones evaluadas contenían 150 mg/ml de Acm1 purificado en una solución amortiguada acuosa que contenía 30 mM de acetato de sodio, pH 5.0, sacarosa al 8 % (p/v) y PS20 al 0.05 % (p/v).

No se detectaron cambios apreciables en la estabilidad física o química de las formulaciones de Acm1 cuando se almacenaron a -80 °C y -30 °C durante un máximo de 6 meses (Tabla 49 y Tabla 50). Estos resultados indican que el Acm1 (150 mg/ml) es estable durante al menos 6 meses cuando se almacena congelado en condiciones de almacenamiento.

Los resultados de los estudios de estabilidad acelerados en investigación se presentan en las Tablas 51A y 51B. No se observaron cambios apreciables en los atributos monitoreados después de incubar las formulaciones de Acm1 (150 mg/ml de anticuerpo) a -20 °C durante un máximo de 6 meses. Se observó un aumento en la concentración de proteínas mediante SoloVPE después de la incubación a 25 °C/60 % de HR durante 6 meses, probablemente debido a la evaporación de la muestra. Se observó un aumento en las especies de HMW mediante SE-UPLC después de la incubación a 5 °C y 25 °C/60 % de HR durante 6 meses. Se observó una disminución en la Región 1 (especies ácidas) con un aumento concomitante en la Región 2 (pico principal) mediante CEX-UPLC después de la incubación a 25 °C/60 % de HR durante 6 meses debido a la desglicación del grupo HC-CDR3-Lys98 de MUC16. Se observó un aumento en la Región 1 (especies ácidas) con una disminución concomitante en la Región 2 (pico principal) mediante iCIEF después de la incubación a 25 °C/60 % de HR durante 6 meses, probablemente debido a la desamidación. Estos resultados indican que las formulaciones de Acm1 (150 mg/ml) pueden soportar la incubación a -20 °C durante al menos 6 meses y a 5 °C durante 3 meses sin comprometer la estabilidad física o química de la proteína. Las formulaciones de Acm1 también pueden soportar exposiciones cortas a temperaturas de 25 °C/60 % de HR.

Los resultados de los estudios de estabilidad frente al estrés en investigación se presentan en las Tablas 51A y 51B y en la Tabla 52. Las formulaciones de Acm1 (150 mg/ml) fueron física y químicamente estables cuando se agitaron (en vórtex) hasta un máximo de 120 minutos o se sometieron a hasta cuatro ciclos de congelación y descongelación. Se observó un aumento en la concentración de proteínas mediante SoloVPE después de la incubación a 40 °C/75 % de HR durante un máximo de 3 meses, probablemente debido a la evaporación de la muestra. Se observaron

aumentos en las especies de HMW y LMW mediante SE-UPLC después de la incubación a 40 °C/75 % de HR durante un máximo de 3 meses. Se observó una disminución en la Región 1 con un aumento concomitante en la Región 2 mediante CEX-UPLC después de la incubación a 40 °C/75 % de HR debido a la desglicación en el grupo HC-CDR3-Lys98 de MUC16. Después de 2 meses de incubación a 40 °C/75 % de HR, hay una disminución en la Región 1 y un aumento concomitante en la Región 2. Sin embargo, después del punto cronológico de tres meses, la tendencia se revierte y hay un aumento aparente en la Región 1 y Región 3 con una disminución concomitante en la Región 2. El aumento en la Región 1 probablemente se debe a la desamidación competitiva en asparagina o glutamina, mientras que se determinó que el aumento en la Región 3 estaba compuesto por especies oligoméricas de Acm1, que incluye principalmente especies de tetrámero, pentámero, hexámero y heptámero. Los resultados de las condiciones aceleradas y de estrés indicaron que el HMW, el LMW y las variantes de carga son las principales vías de degradación del Acm1 (150 mg/ml).

Tabla 49: Estabilidad de la sustancia farmacológica formulada Acm1 a -80 °C

Formulación	150 mg/ml de REGN4018, 30 mM de acetato, pH 5.0, 8 % (p/v) de sacarosa, 0.05 % de polisorbato 20				
Volumen de carga	2.5 ml				
Contenedor de almacenamiento	Vial de policarbonato Cellon de 5 ml con cierre con revestimiento de HDPE				
Condiciones de almacenamiento	-80 °C, orientación vertical del vial				
Ensayo	Criterios de aceptación de calidad ^a	Duración del almacenamiento (meses)			
		T=0	1	3	6
Forma/Condición física	Líquido esencialmente libre de partículas visibles	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia	No más turbia que la suspensión de referencia IV	No > II	No > II	No > II	No > II
Color	Color no más intenso que el de la solución de referencia BY2	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4
pH	4.8 a 5.2	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales	45 a 55 mg/ml	146.3	148.9	153.2	148.7
Pureza mediante SE-UPLC	a. Pureza ≥ 90 % del área total del pico	97.8	97.9	97.8	97.9
	b. ≤ 5 % de especies de LMW	0.0	0.0	0.0	0.0
	c. ≤ 7 % de especies de HMW	2.2	2.1	2.2	2.1
Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de informe Región 1	39.4			41.7
	% de informe Región 2	42.5			41.6
	% de informe Región 3	18.1			16.7
Análisis de variantes de carga mediante CEX	a. 15-60 % Región 1	45.8	45.9	45.1	45.5
	b. % de especies glicadas (% del informe)	32.5	32.6	32.0	32.2
	c. ≥ 35 % Región 2	48.2	48.5	48.6	48.6
	d. ≤ 25 % Región 3	6.0	5.6	6.3	5.9
Material particulado (MFI™)	2 µm ≤ x < 10 µm (partícula/ml)	9,537			250
	≥ 10 µm (partícula/ml)	622			4
	≥ 25 µm (partícula/ml)	76			0
Contenido de polisorbato 20	% de informe PS20	0.05			

^a. Criterios adoptados del objetivo de calidad de la plataforma FDG FBP-015-FD con ajuste específico del programa. Los resultados de los ensayos sin objetivo de calidad informaron el

porcentaje solo con fines informativos. Las casillas están en gris para indicar las pruebas que no se realizan en el punto cronológico establecido.

CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, isoelectroenfoque capilar por imágenes; LEFVP, líquido esencial sin partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MFI, Micro-Flow Imaging™; MP, pico principal; SE-UPLC, cromatografía líquida de exclusión por tamaños de ultra alto rendimiento.

Tabla 50: Estabilidad de la sustancia farmacológica formulada Acm1 a -30 °C

Formulación	150 mg/ml de REGN4018, 30 mM de acetato, pH 5.0, 8 % (p/v) de sacarosa, 0.05 % de polisorbato 20				
Volumen de carga	2.5 ml				
Contenedor de almacenamiento	Vial de policarbonato Cellon de 5 ml con cierre con revestimiento de HDPE				
Condiciones de almacenamiento	-30 °C, orientación vertical del vial				
Ensayo	Criterios de aceptación de calidad ^a	Duración del almacenamiento (meses)			
		T=0	1	3	6
Forma/Condición física	Líquido esencialmente libre de partículas visibles	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia	No más turbia que la suspensión de referencia IV	No > II	No > II	No > II	No > II
Color	Color no más intenso que el de la solución de referencia BY2	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4
pH	4.8 a 5.2	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales	45 a 55 mg/ml	146.3	146.1	148.3	149.2
Pureza mediante SE-UPLC	a. Pureza ≥ 90 % del área total del pico	97.8	97.9	97.8	97.9
	b. ≤ 5 % de especies de LMW	0.0	0.0	0.0	0.0
	c. ≤ 7 % de especies de HMW	2.2	2.1	2.2	2.1
Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de informe Región 1	39.4			41.6
	% de informe Región 2	42.5			42.4
	% de informe Región 3	18.1			16.1
Análisis de variantes de carga mediante CEX	a. 15-60 % Región 1	45.8	46.0	45.3	45.7
	b. % de especies glicadas (% del informe)	32.5	32.3	32.2	32.5
	c. ≥ 35 % Región 2	48.2	48.3	48.5	48.5
	d. ≤ 25 % Región 3	6.0	5.7	6.2	5.8
Material particulado (MFI™)	2 µm ≤ x < 10 µm (partícula/ml)	9,537			469
	≥ 10 µm (partícula/ml)	622			13
	≥ 25 µm (partícula/ml)	76			4
Contenido de polisorbato 20	% de informe PS20	0.05			
Potencia mediante bioensayo	50 % a 150 % de estándar de referencia	94			149

^a. Criterios adoptados del objetivo de calidad de la plataforma FDG FBP-015-FD con ajuste específico del programa. Los resultados de los ensayos sin objetivo de calidad informaron el porcentaje solo con fines informativos. Las casillas están en gris para indicar las pruebas que no se realizan en el punto cronológico establecido.

CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, isoelectroenfoque capilar por imágenes; LEFVP, líquido esencial sin partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MFI, Micro-Flow Imaging™;

MP, pico principal; SE-UPLC, cromatografía líquida de exclusión por tamaños de ultra alto rendimiento.

Tabla 51A: Estabilidad de la sustancia farmacológica formulada Acm1 incubada a -20 °C, 5 °C

5	Formulación		150 mg/ml de REGN4018, 30 mM de acetato, pH 5.0, 8 % (p/v) de sacarosa, 0.05 % de polisorbato 20							
	Volumen de carga		2.5 ml							
10	Contenedor de almacenamiento		Vial de policarbonato Cellon de 5 ml con cierre con revestimiento de HDPE							
	Condiciones de almacenamiento		Sin almacenamiento	Almacenamiento a -20 °C (meses)			Almacenamiento a 5 °C (meses)			
15	Ensayo	Criterios de aceptación de calidad ^a	T = 0	1	3	6	0.5	1	3	6
	Forma/Condición física	Líquido esencialmente libre de partículas visibles	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
20	Transparencia	No más turbia que la suspensión de referencia IV	No > II	No > II	No > II	No > II	No > II	No > II	No > II	No > II
	Color	Color no más intenso que el de la solución de referencia BY2	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4
25	pH	4.8 a 5.2	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
	Proteínas totales	45 a 55 mg/ml	146.3	146.4	150.4	154.2	146.8	151.1	150.9	161.3
30	Pureza mediante SE-UPLC	a. Pureza ≥ 90 % del área total del pico	97.8	97.8	97.8	97.9	97.7	97.7	97.5	97.4
		b. ≤ 5 % de especies de LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
		c. ≤ 7 % de especies de HMW	2.2	2.2	2.2	2.1	2.3	2.3	2.5	2.6
35	Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de informe Región 1	39.4			41.3				43.6
		% de informe Región 2	42.5			42.1				40.2
		% de informe Región 3	18.1			16.6				16.3
40	Análisis de variantes de carga mediante CEX	a. 15-60 % Región 1	45.8	45.9	45.4	45.4	45.3	45.5	44.1	43.5
		b. % de especies glicadas (% del informe)	32.5	32.6	32.3	32.1	32.3	32.3	31.7	31.2
		c. ≥ 35 % Región 2	48.2	48.4	48.3	48.6	48.9	48.8	49.9	50.7
		d. ≤ 25 % Región 3	6.0	5.7	6.3	6.0	5.8	5.7	6.1	5.8
45	Material particulado (MFI™)	Informe de partículas/ml: 2 µm ≤ x < 10 µm (partícula/ml)	9,537			284				298
		≥ 10 µm (partícula/ml)	622			35				29
		≥ 25 µm (partícula/ml)	76			17				2

^a Criterios adoptados de la plataforma FBP-015-FD FDG objetivo de calidad con ajuste específico del programa. Los resultados de los ensayos sin objetivo de calidad informaron el porcentaje solo con fines informativos. Las casillas están en gris para indicar las pruebas que no se realizan en el punto cronológico establecido.

CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, isoelectroenfoque capilar por imágenes; LEFVP, líquido esencial sin partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MFI, Micro-Flow Imaging™; MP, pico principal; SE-UPLC, cromatografía líquida de exclusión por tamaños de ultra alto rendimiento.

Tabla 51B: Estabilidad de la sustancia farmacológica formulad Acm1 incubada a 25 °C/60 % de HR y 40 °C/75 % de HR

Formulación		150 mg/ml de REGN4018, 30 mM de acetato, pH 5.0, 8 % (p/v) de sacarosa, 0.05 % de polisorbato 20								
Volumen de carga		2.5 ml								
Contenedor de almacenamiento		Vial de policarbonato Cellaon de 5 ml con cierre con revestimiento de HDPE								
Condiciones de almacenamiento		Sin almacen amiento	Almacenamiento a 25 °C/60 % de HR (meses)				Almacenamiento a 40 °C/75 % de HR (meses)			
Ensayo	Criterios de aceptación de calidad ^a	T = 0	0.5	1	3	6	0.25	0.5	1	3
Forma/Con dición física	Líquido esencialmente libre de partículas visibles	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparen cia	No más turbia que la suspensión de referencia IV	No > II	No > II	No > III	No > III	No > III	No > II	No > III	No > III	No > III
Color	Color no más intenso que el de la solución de referencia BY2	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY3
pH	4.8 a 5.2	5.0	5.0	5.0	5.1	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales	45 a 55 mg/ml	146.3	149.2	149.5	160.6	162.6	142.5	146.8	151.9	164.0
Pureza mediante SE-UPLC	a. Pureza ≥ 90 % del área total del pico	97.8	97.4	97.1	96.5	95.7	95.7	94.7	92.1	80.9
	b. ≤ 5 % de especies de LMW	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.3	0.0	0.1	1.2
	c. ≤ 7 % de especies de HMW	2.2	2.6	2.8	3.5	4.2	4.0	5.3	7.8	17.9
Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	% de informe Región 1	39.4				50.5				70.1
	% de informe Región 2	42.5				32.3				19.5
	% de informe Región 3	18.1				17.2				10.3
Análisis de variantes de carga mediante CEX	a. 15-60 % Región 1	45.8	41.4	38.7	29.2	23.4	30.9	23.5	18.4	25.2
	b. % de especies glicadas (% del informe)	32.5	29.5	27.2	18.6	13.1	20.4	13.4	7.6	12.0
	c. ≥ 35 % Región 2	48.2	52.8	56.0	65.5	70.5	63.4	69.2	72.0	55.0
	d. ≤ 25 % Región 3	6.0	5.8	5.3	5.3	6.1	5.7	7.3	9.6	19.8
	Informe de partículas/ml:	9,537				58				113

Material particulado (MFI™)	2 µm ≤ x < 10 µm (partícula/ml)									
	≥ 10 µm (partícula/ml)	622				4				19
	≥ 25 µm (partícula/ml)	76				4				0

^a Criterios adoptados de la plataforma FBP-015-FD FDG objetivo de calidad con ajuste específico del programa. Los resultados de los ensayos sin objetivo de calidad informaron el porcentaje solo con fines informativos. Las casillas están en gris para indicar las pruebas que no se realizan en el punto cronológico establecido.

CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, isoelectroenfoque capilar por imágenes; LEFVP, líquido esencial sin partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; MFI, Micro-Flow Imaging™; MP, pico principal; SE-UPLC, cromatografía líquida de exclusión por tamaños de ultra alto rendimiento.

Tabla 52: Estabilidad de la sustancia farmacológica formulada Acml - Efecto de la agitación y congelación/descongelación

Formulación		150 mg/ml de REGN4018, 30 mM de acetato, pH 5.0, 8 % (p/v) de sacarosa, 0.05 % de polisorbato 20				
Volumen de carga		2.5 ml				
Contenedor de almacenamiento		Vial de policarbonato Cellon de 5 ml con cierre con revestimiento de HDPE				
Condiciones de almacenamiento		Sin estrés	Agitación (minutos)		Congelación/descongelación (ciclos)	
Ensayo	Criterios de aceptación de calidad ^a	T = 0	60	120	2	4
Forma/Condición física	Líquido esencialmente libre de partículas visibles	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP	LEFVP
Transparencia	No más turbia que la suspensión de referencia IV	No > II	No > II	No > II	No > II	No > II
Color	Color no más intenso que el de la solución de referencia BY2	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4	No > BY4
pH	5.8 a 6.2	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Proteínas totales	22.5 a 27.5 mg/ml	146.3	145.4	144.9	147.6	146.9
Pureza mediante SE-UPLC	a. Pureza ≥ 90 % del área total del pico	97.8	97.8	97.8	97.8	97.8
	b. ≤ 5 % de especies de LMW	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	c. ≤ 7 % de especies de HMW	2.2	2.2	2.2	2.2	2.2
Análisis de variantes de carga mediante iCIEF	a. ≤ 75 % Región 1	39.4		39.3		39.3
	b. ≥ 25 % Región 2	42.5		43.0		43.2
	c. ≤ 25 % Región 3	18.1		17.7		17.6
Análisis de variantes de carga mediante CEX	a. 15-60 % Región 1	45.8	45.6	45.8	45.3	45.5
	b. % de especies glicadas (% del informe)	32.5	32.4	32.4	32.3	32.5
	c. ≥ 35 % Región 2	48.2	48.3	48.3	48.5	48.3
	d. ≤ 25 % Región 3	6.0	6.0	5.9	6.2	6.2

Material (MFI™)	particulado	$2\ \mu\text{m} \leq x < 10\ \mu\text{m}$ (partícula/ml)	9,537		1,353		242
		$\geq 10\ \mu\text{m}$ (partícula/ml)	622		90		19
		$\geq 25\ \mu\text{m}$ (partícula/ml)	76		15		13

^a Criterios adoptados de la plataforma FBP-015-FD FDG objetivo de calidad con ajuste específico del programa. Los resultados de los ensayos sin objetivo de calidad informaron el porcentaje solo con fines informativos. Las casillas están en gris para indicar las pruebas que no se realizan en el

CEX, intercambio catiónico; DS, sustancia farmacológica; FDG, grupo de desarrollo de la formulación; HMW, alto peso molecular; iCIEF, isoelectroenfoque capilar por imágenes; LEFVP, líquido esencial sin partículas visibles; LMW, bajo peso molecular; Micro-Flow Imaging™; MP, pico principal; SE-UPLC, cromatografía líquida de exclusión por tamaños de ultra alto rendimiento. La presente invención no debe limitarse en el alcance por las modalidades específicas descritas en la presente descripción. De hecho, varias modificaciones de la invención además de las descritas en la presente descripción serán evidentes para los expertos en la técnica a partir de la descripción anterior. Se pretende que dichas modificaciones queden comprendidas dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.
