

DESCRIPCIÓN

FORMULACIONES QUE COMPRENDEN FAB-PEG

Campo de invención

La invención se refiere al campo de las composiciones farmacéuticas.

- 5 Más particularmente, se dirige a composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de anticuerpo, más particularmente una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, en altas concentraciones, y a procedimientos para producir dichas composiciones farmacéuticas. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención también se pueden liofilizar para proporcionar formulaciones
- 10 secadas por congelamiento.

Antecedentes de la invención

- La fabricación industrial de anticuerpos terapéuticos es una tarea compleja. Requiere ampliar los procesos desarrollados en un laboratorio para producir anticuerpos en cantidades de miligramos a cantidades de varios
- 15 kilogramos. A pesar de que los anticuerpos son moléculas bastante estables, cuando se almacenan en altas concentraciones durante un período de tiempo, pueden sufrir inestabilidad química y física. La inestabilidad química típica puede resultar en desamidación, hidrólisis, oxidación, eliminación beta, intercambio o reducción de disulfuros. La inestabilidad física puede provocar desnaturalización,
- 20 agregación o precipitación.

Si bien las formulaciones líquidas pueden administrarse con una preparación mínima, tienen el inconveniente de ser menos estables en el tiempo.

La estabilización de proteínas en formulaciones líquidas para evitar o minimizar la agregación, precipitación o degradación sigue siendo un desafío particular. La agregación, con la formación de materia insoluble o precipitado, es un problema particular. Como puede provocar reacciones inmunológicas tras la
5 administración y/o dificultad para realizar la administración adecuada de la composición farmacéutica, por ejemplo, causando el bloqueo del dispositivo de entrega.

El secado por congelamiento (es decir, la liofilización) se puede utilizar para la estabilización durante el almacenamiento a largo plazo de anticuerpos
10 que de otro modo serían inestables en forma líquida. El secado por congelamiento de anticuerpos a una temperatura más baja reduce el daño a los productos y ayuda a conservar la integridad molecular. Prolonga la vida útil, reduce el requisito de temperatura para el envío y preserva las propiedades químicas y biológicas de los anticuerpos. El secado por congelamiento facilita
15 alcanzar altas concentraciones del anticuerpo en la formulación final, reduciendo así el volumen de inyección, después de la reconstitución, así como el tiempo de inyección.

Sin embargo, los anticuerpos, como otras proteínas, se desnaturalizan tras el secado por congelamiento en ausencia de estabilizantes. Los
20 estabilizantes pueden incluir ciertos azúcares, polioles, aminoácidos, sales y polímeros tales como polietilenglicol. En general, se elige un estabilizador preferido para una formulación dada, aunque ocasionalmente se puede usar una

combinación de estabilizantes. En general se piensa que el mecanismo de estabilización durante el secado es que el estabilizador actúa como un sustituto del agua. Se considera que la interacción entre el agua y las proteínas es importante para la estabilidad conformacional de las proteínas. Cuando se
5 elimina el agua durante el secado, los estabilizantes pueden formar enlaces de hidrógeno con la proteína, como lo hacen las moléculas de agua, lo que puede ayudar a preservar la estructura de la proteína nativa durante el proceso de liofilización (Chang L, et al. 2005).

El nivel de estabilización proporcionado por los azúcares o polioles
10 depende generalmente de sus concentraciones. El aumento de la concentración de azúcar/poliol hasta un cierto nivel puede eventualmente alcanzar un límite de estabilización o incluso desestabilizar una proteína durante el secado por congelamiento, por lo que la proporción particular de estabilizador a proteína puede afectar la estabilidad de almacenamiento de un anticuerpo secado por
15 congelamiento (Chang L, et al. otros 2005). Un agente de carga cristalino puede actuar como relleno aumentando la densidad del producto sólido y minimizando la pérdida de estructura. También suele proporcionar composiciones densas y homogéneas y, en general, es fácil de reconstituir. La glicina es otro ejemplo de posible agente de carga en productos secados por congelamiento donde son
20 necesarios compuestos cristalizables (Carpenter et al., 1997), para actuar proporcionando la textura adecuada para evitar problemas aparentes de volumen y consistencia con la formulación, como el colapso durante el proceso

de secado primario. Ya se ha demostrado que en algunas circunstancias la glicina puede provocar un ligero aumento de la estabilidad (Meyer 2009), aunque también existen datos contradictorios (WO2007124090).

Los documentos WO2016128318 y WO2017194646 describen, entre
5 varias combinaciones de estabilizantes, formulaciones que contienen un anticuerpo de longitud completa, sacarosa y glicina. El documento US6372716 divulga una formulación secada por congelamiento que contiene factor IX en combinación con glicina y sacarosa.

El documento WO2019096776 divulga formulaciones secadas por
10 aspersión que contienen una molécula de Fab-PEG, un azúcar (sacarosa o trehalosa) y al menos un aminoácido, como la glicina. Sin embargo, la combinación de sacarosa y glicina no mostró resultados prometedores, al menos desde el punto de vista de la reconstitución.

Una cuestión importante que surge con una molécula Fab-PEG o Fab'-
15 PEG es su estabilidad con especial atención a la hidrólisis y la apertura del anillo del conector succinimida PEG, lo que da como resultado un aumento en los niveles de especies ácidas.

A pesar de que la liofilización es una buena opción para lograr el
almacenamiento deseado a largo plazo de las moléculas de anticuerpos, no
20 existe un protocolo simple y universal para formular fracciones de anticuerpos como la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG. Estas moléculas pueden volverse inestables durante los procesos de liofilización y/o el almacenamiento a largo

plazo, se pueden formar agregados durante la reconstitución o las tortas liofilizadas pueden tardar demasiado en reconstituirse. Las altas concentraciones de estabilizantes pueden afectar las propiedades fisicoquímicas (es decir, viscosidades) de la formulación final. Teniendo en cuenta lo anterior, sigue existiendo una necesidad en la técnica de proporcionar composiciones farmacéuticas mejoradas, más especialmente secadas por congelamiento, que comprendan altas concentraciones de moléculas Fab-PEG o Fab'-PEG.

Resumen de la invención

La presente invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de Fab-PEG o Fab'-PEG en una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/ml, un tampón que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 a aproximadamente 7.0, de aproximadamente 1.0 a aproximadamente 5.0 % p/v de sacarosa, de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 4.0 % p/v de glicina y opcionalmente un tensioactivo. En algunas realizaciones, la concentración del tampón es de aproximadamente 10 a 50 mM.

En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención comprenden 100 mg/ml de la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 20 mM de tampón de histidina que mantiene el pH en aproximadamente 5.5, aproximadamente 2.5 % p/v de sacarosa, aproximadamente 2.0 % p/v de glicina y opcionalmente aproximadamente 0.05 % p/v de polisorbato 20.

También se proporcionan en el presente documento formulaciones secadas por congelamiento obtenidas mediante secadas por congelamiento de cualquiera de las composiciones farmacéuticas divulgadas en el presente documento. En algunas realizaciones, la presente invención proporciona

5 formulaciones secadas por congelamiento que comprenden de aproximadamente 50 a aproximadamente 80 % p/p de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, de aproximadamente 3 a aproximadamente 14 % p/p de un tampón que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0, de aproximadamente 7 a aproximadamente 30 % p/p de sacarosa, de

10 aproximadamente 3.5 a aproximadamente 24 % p/p de glicina y opcionalmente un tensioactivo.

En algunas realizaciones, una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG se deriva de un anticuerpo humano o humanizado. En algunas realizaciones, una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG se une específicamente a CD40L.

15 La invención también proporciona procedimientos para producir formulaciones secadas por congelamiento que comprenden las etapas de a. formar una mezcla de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, junto con tampón, sacarosa, glicina y tensioactivo opcional para obtener una composición farmacéutica; b. someter la mezcla de la etapa a secada por congelamiento y c.

20 recuperar la formulación secada por congelamiento, así como un procedimiento para reconstituir la formulación liofilizada de acuerdo con la invención añadiendo un disolvente.

También se describen artículos de fabricación que comprenden un recipiente que comprende una composición farmacéutica o una formulación secada por congelamiento de acuerdo con la invención.

Las composiciones farmacéuticas y/o formulaciones secadas por congelamiento descritas en el presente documento pueden ser útiles para la administración en el tratamiento de una enfermedad o trastorno.

Definiciones

- El término “que comprende”, tal como se utiliza en este documento, no excluye otros elementos, es decir, debe interpretarse que abarca todas las características específicamente mencionadas, así como las opcionales, adicionales y no especificadas.

- Cuando se utiliza un artículo indefinido o definido para referirse a un sustantivo singular, por ejemplo, “un”, “una” o “el”, esto incluye un plural de ese sustantivo a menos que se indique específicamente algo más.

- Los términos “aproximadamente” o “aproximadamente” denotan un intervalo de precisión que el experto en la técnica entenderá para garantizar el efecto técnico de la característica en cuestión. El término normalmente indica una desviación del valor numérico indicado de $\pm 10\%$, y preferiblemente de $\pm 5\%$. Cuando se utiliza el término “aproximadamente”, la solicitud también divulga el empleo del valor exacto especificado. Cuando se hace referencia a valores de puntos, la solicitud también divulga acerca de dichos valores que se emplean, lo mismo ocurre con los puntos finales de los rangos. Por ejemplo, si

la descripción específica “aproximadamente 50 a aproximadamente 200”, eso significaría “ $50 \pm 10 \%$ a $200 \pm 10 \%$ ” así como “50 a 200”.

- El término “CD40L” o “ligando CD40”, se refiere a la proteína también conocida como CD154, contrarreceptor CD40 (CD40CR), gp39, T-BAM, molécula activadora de T-Cell, TRAF, proteína de activación relacionada con TNF (TRAP) y Miembro 5 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral (TNFSF5). Es una glicoproteína de membrana tipo II de 39 kDa de la familia TNF. CD40L es un polipéptido de 261 aminoácidos, que consta de un dominio extracelular de 215 aminoácidos, una región transmembrana de 24 aminoácidos y una cola citoplasmática de 22 aminoácidos.

- El término “anticuerpo” o “anticuerpos” como se usa en el presente documento se refiere a anticuerpos monoclonales y no se limita a anticuerpos recombinantes que se generan mediante tecnologías recombinantes como se conoce en la técnica. “Anticuerpo” o “anticuerpos” incluyen anticuerpos de cualquier especie, en particular de especies de mamíferos, que tienen dos cadenas pesadas esencialmente completas y dos cadenas ligeras esencialmente completas, anticuerpos humanos de cualquier isotipo, incluyendo IgA1, IgA2, IgD, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgG4, IgE e IgM, variantes modificadas de los mismos y/o fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

- El término “Fab” como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio constante y un dominio variable de una cadena pesada así como un dominio constante y un dominio

variable de una cadena ligera de un anticuerpo. Una molécula “Fab” es una Fab que comprende además el dominio bisagra.

- El término “Fab-PEG” o “Fab'-PEG” se refiere a una molécula que comprende respectivamente una fracción Fab o Fab' combinado con una
5 fracción PEG. Las moléculas Fab o Fab' pueden contener un residuo de aminoácido modificado, por ejemplo, un residuo de cisteína o lisina, para ser pegiladas. Por ejemplo, una molécula Fab puede ser un fragmento Fab modificado en el que la modificación es la adición al extremo C-terminal de su cadena pesada uno o más aminoácidos para permitir la unión de una molécula
10 efectora. Los aminoácidos adicionales pueden formar una región bisagra modificada que contiene uno o más residuos de cisteína a los que puede unirse la molécula efectora.

Se puede obtener una fracción Fab o Fab' cultivando células huésped procarióticas o eucariotas transfectadas con uno o más vectores de expresión
15 que codifican la fracción Fab o Fab' recombinante. Por ejemplo, las células huésped eucariotas pueden ser células de mamífero, tales como células de ovario de hámster chino (CHO). Las células huésped procarióticas suelen ser bacterias gramnegativas, como las células de E. coli. Las células huésped pueden cultivarse en cualquier medio que admita su crecimiento y expresión de
20 la proteína recombinante. Los expertos en la técnica conocen las mejores condiciones para cada célula huésped.

Una vez recuperado del sobrenadante de un cultivo celular, del espacio periplásmico o de los cuerpos de inclusión, dependiendo de la célula huésped utilizada para la producción, se puede purificar una fracción Fab o Fab'. Los procedimientos de purificación son bien conocidos por los expertos en la técnica.

5 Los procedimientos de purificación normalmente comprenden una combinación de varias etapas cromatográficas y de filtración. El proceso completo normalmente se realiza en condiciones acuosas. Después de una primera serie de etapas de purificación, se puede pegilar y purificar aún más una fracción Fab o Fab'. La solución recuperada al final del proceso se puede someter a
10 formulación.

- El término "PEG" se refiere a fracciones de poli(etilenglicol). Otros compuestos de PEG apropiados incluyen, entre otros, maleimido monometoxi PEG, PEG polipropilenglicol activado, polímero de metoxipoli(etilenglicol), pero también polímeros cargados o neutros de los siguientes tipos: dextrano, ácidos
15 colomínicos u otros polímeros a base de carbohidratos, polímeros de aminoácidos y biotina y otros derivados de reactivos de afinidad. El tamaño del compuesto de PEG se puede variar según se desee, pero generalmente estará en un intervalo de peso molecular promedio de 500 Da a 50 000 Da, por ejemplo de 5000 a 40 000 Da, tal como de 20 000 a 40 000 Da. El tamaño del polímero
20 puede seleccionarse en particular en función del uso previsto del producto, por ejemplo, la capacidad de localizarse en ciertos tejidos, como tumores, o extender la vida media circulante (ver Chapman, 2002). Así, por ejemplo, cuando se

pretende que el producto abandone la circulación y penetre en el tejido, por ejemplo para su uso en el tratamiento de un tumor, puede ser ventajoso utilizar un polímero de peso molecular pequeño, por ejemplo con un peso molecular de aproximadamente 5000 Da. Para aplicaciones en las que el producto permanece en circulación, puede resultar ventajoso utilizar un polímero de mayor peso molecular, que tenga por ejemplo un peso molecular en el intervalo de 20.000 Da a 40.000 Da.

- El término “PEGilación” se refiere a la unión, por ejemplo, mediante enlace covalente, de una fracción PEG o un derivado del mismo a su molécula asociada (tal como una molécula Fab o Fab'), con o sin agentes de acoplamiento o derivatización con fracciones de acoplamiento o activadores (por ejemplo, con tiol, triflato, tresilato, aziridina, oxirano y/o una fracción maleimida, por ejemplo, PEG-maleimida). Por ejemplo, se puede unir una fracción PEG a una cisteína en la región bisagra de un Fab' o un Fab modificado. Alternativa o adicionalmente, un fragmento Fab modificado con PEG puede tener un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en una región bisagra modificada. Un residuo de lisina puede estar unido covalentemente al grupo maleimida y a cada uno de los grupos amina del residuo de lisina puede estar unido un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20.000 Da. Por tanto, el peso molecular total del PEG unido al fragmento Fab puede ser de aproximadamente 40.000 Da. Los mejores procedimientos de pegilación son bien conocidos por los expertos en la técnica.

- El término “se une específicamente a CD40L”, “se une específicamente a CD40L humano” y equivalentes como se usan en el presente documento significa que la molécula Fab o Fab', pegilada o no, se unirá a CD40L/CD40L humano con suficiente afinidad y especificidad para lograr un efecto biológicamente significativo. La molécula seleccionada normalmente tendrá una afinidad de unión por CD40L/CD40L humano; por ejemplo, la molécula Fab o Fab' puede unirse a CD40L humano con un valor de K_d de entre 100 nM y 1 pM. El término “ K_d ”, como se usa en el presente documento, pretende referirse a la constante de disociación de una interacción Fab o molécula Fab'-antígeno particular, que representa la afinidad de la molécula Fab o Fab' por su objetivo. Las afinidades pueden determinarse, por ejemplo, mediante un ensayo de resonancia de plasmón superficial, tal como el ensayo BIAcore; ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA); y/o ensayos de competencia (por ejemplo, RIA). Dentro del significado de la presente invención, una molécula Fab o Fab' que se une específicamente a CD40L/CD40L humano también puede unirse a otra molécula, por ejemplo, a CD40L. La molécula Fab o Fab' que se une específicamente a CD40L/CD40L humano también puede neutralizar CD40L/CD40L humano.

- El término “neutraliza” como se usa en el presente documento se refiere a una molécula Fab o Fab', pegilada o no, que inhibe o reduce sustancialmente el efecto biológico de la molécula a la que se une específicamente. Por lo tanto, la expresión “la molécula Fab o Fab' neutraliza CD40L/CD40L humana” se refiere

a una molécula Fab o Fab' que se une específicamente a CD40L o CD40L humana e inhibe o reduce sustancialmente el efecto biológico de la misma tal como al bloquear la unión de CD40L a CD40.

- El término “alta concentración”, o términos relacionados, en relación a la
5 molécula Fab o Fab', pegilada o no, significa que la concentración de dicha molécula es de al menos 50 mg/ml.

- El término “estabilidad”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a la estabilidad física, química y conformacional de una molécula Fab o Fab', pegilada o no, en las formulaciones de acuerdo con la presente invención.
10 La inestabilidad de una formulación proteica puede ser causada, por ejemplo, por degradación química o agregación de las moléculas de proteína para formar polímeros de orden superior, desglicosilación, modificación de la glicosilación u oxidación.

- El término “formulación estable” se refiere a una formulación en la que la
15 proteína de interés (aquí una molécula Fab o Fab', pegilada o no) conserva esencialmente sus propiedades físicas, químicas y/o biológicas durante el almacenamiento. Para medir la estabilidad de la proteína en una formulación, el experto en la materia conoce varios procedimientos analíticos (consulte algunos ejemplos en la sección de ejemplos). La estabilidad generalmente se evalúa a
20 una temperatura seleccionada (por ejemplo, -70 °C, 2-8 °C, 25 °C, 35 °C o más) durante un período de tiempo seleccionado (por ejemplo, 3 meses, 6 meses, 12 meses o más). Como una molécula Fab o Fab' (pegilada o no), una vez

formulada, normalmente se almacena en el frigorífico (normalmente entre 2 y 8 °C) o a temperatura ambiente (normalmente entre 15 y 25 °C) antes de administrarse a un paciente, Es importante que dicha molécula formulada sea estable en el tiempo al menos a 2-25 °C, como se muestra por ejemplo a 2-8 °C y 25 °C. Se pueden usar varios valores para caracterizar la estabilidad durante un período de tiempo determinado (en comparación con los datos iniciales), tales como (y no limitado a): 1) no más del 10 % de alteración por año de la forma monomérica del anticuerpo cuando el almacenamiento se realiza a 25 °C, 2) una alteración de no más de aproximadamente 0.5 puntos/año (0.5 % por año) de especies de alto peso molecular (HMW o HMWS; también denominadas aquí agregados) cuando se realiza el almacenamiento a 2-8 °C o no más de aproximadamente 3 puntos/año (3 % por año) de HMWS cuando el almacenamiento se realiza a 25 °C, y/o 3) no más de +/- 0.3 unidades de variación del pH.

15 - Tal como se utiliza en el presente documento, “composición farmacéutica” también puede denominarse “composición farmacéutica estable”, “formulación” o “formulación estable” sin diferenciación alguna.

20 - El término “tampón”, como se usa en el presente documento, se refiere a soluciones de compuestos que se sabe que son seguros en formulaciones para uso farmacéutico o veterinario y que tienen el efecto de mantener o controlar el pH de la formulación en el rango de pH deseado para la formulación.

- El término “tensioactivo”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a un compuesto soluble que se puede usar notablemente para aumentar la solubilidad en agua de sustancias oleosas hidrófobas o de otro modo aumentar la miscibilidad de dos sustancias con diferentes hidrofobicidades. Por este motivo, estos polímeros se utilizan habitualmente en aplicaciones industriales, cosméticas y farmacéuticas. También se utilizan como sistemas modelo para aplicaciones de administración de fármacos, en particular para modificar la absorción del fármaco o su administración a los tejidos diana. Los tensioactivos bien conocidos incluyen polisorbatos (derivados de polioxietileno, también conocidos como Tween; como PS20 o PS80), así como poloxámeros (es decir, copolímeros basados en óxido de etileno y óxido de propileno, también conocidos como Pluronic®).

- El término “agente estabilizante”, “estabilizador” o “agente de isotonicidad”, como se usa en el presente documento, es un compuesto que se tolera fisiológicamente e imparte una estabilidad/tonicidad adecuada a una formulación. Impide notablemente el flujo neto de agua a través de las membranas celulares que están en contacto con la formulación. Durante el proceso de secado por congelamiento (liofilización), el estabilizador también es eficaz como crioprotector. Comúnmente se utilizan compuestos como la glicerina para tales fines. Otros agentes de estabilidad adecuados incluyen, entre otros, aminoácidos o proteínas, sales (por ejemplo, cloruro de sodio) y azúcares (por

ejemplo, dextrosa, trehalosa, sacarosa y lactosa). En algunas realizaciones, el agente estabilizante es sacarosa.

- El término “agente de carga” se refiere a una entidad química que proporciona estructura al liofilizado o masa sólida residual de una preparación farmacéutica después de haber sido secada por congelamiento y que la protege
5 contra el colapso. Un agente de carga cristalizable significará un agente de carga como se describe en el presente documento que puede cristalizarse durante la liofilización. Dicho agente de carga puede ser, por ejemplo, glicina.

- El término “secado por congelamiento” también conocido como
10 “liofilización” se refiere a un proceso para obtener una formulación secada por congelamiento que consta de al menos tres etapas principales: 1) bajar la temperatura del producto que se va a secar por congelamiento por debajo del punto de congelación (típicamente entre -40 y -80 °C; etapa de congelación), 2) vacío de alta presión (típicamente entre 30 y 300 mTorr; primera etapa de
15 secado) y 3) aumento de la temperatura (típicamente entre 20 y 40 °C; segunda etapa de secado). Las técnicas para la liofilización de soluciones que comprenden anticuerpos son bien conocidas en la técnica. Muchos productos de anticuerpos monoclonales disponibles comercialmente, como SYNAGIS™, REMICADE™, CIMZIA®, RAPTIVA™, SIMULECT™, XOLAIR™ y
20 HERCEPTIN™, se suministran como una formulación secada por congelamiento. Las formulaciones secadas por congelamiento también se conocen como “formulaciones liofilizadas” o “liofilizados”.

- El término “vial” o “recipiente”, como se usa en el presente documento, se refiere ampliamente a un depósito adecuado para retener las formulaciones descritas en el presente documento en forma líquida o en forma liofilizada. De manera similar, retendrá el solvente para la reconstitución si la formulación se encuentra en forma liofilizada. Los ejemplos de un vial que se puede usar en la presente invención incluyen una ampolla, un tubo, un frasco, una jeringa (tal como una jeringa precargada), cartuchos u otro depósito similar adecuado para administrar la formulación al paciente a través de inyección, por ejemplo, mediante infusión intravenosa o inyección subcutánea.

10 -El término “disolvente”, tal como se utiliza en el presente documento, se refiere a un disolvente acuoso. Dicho disolvente acuoso puede consistir únicamente en agua, o puede comprender agua más uno o más disolventes miscibles, y puede contener solutos disueltos tales como azúcares, tampones, sales u otros excipientes. Los disolventes acuosos no limitantes incluyen agua
15 (tal como agua para inyección) o incluso disolvente salino o tampón salino (tal como PBS).

- El término “tiempo de reconstitución” como se usa en este documento significa el tiempo que lleva reconstituir un liofilizado en un volumen deseado de disolvente (por ejemplo, agua o tampón salino). Los excipientes inesperadamente superiores reducen el tiempo de reconstitución global de al
20 menos aproximadamente un 10 % o más. El tiempo de reconstitución depende del volumen final de reconstitución reconstituido. Normalmente, por ejemplo, se

considera que los tiempos de reconstitución aceptables son de 10 minutos o menos para un volumen de 1 ml.

Descripción detallada de la invención

La invención se basa, en parte, en el sorprendente hallazgo de los inventores de que la combinación de sacarosa y glicina, más particularmente en determinadas proporciones, en una solución tamponada conduce a composiciones farmacéuticas secadas por congelamiento que contienen moléculas Fab-PEG o Fab'-PEG que proporcionan estabilidad a largo plazo a dicha molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, sin afectar la procesabilidad de la composición farmacéutica. Es un hallazgo de los inventores que las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención son estables en el tiempo, en particular cuando se almacenan en estado liofilizado, a 2-25 °C, como se muestra por ejemplo a 2-8 °C y 25 °C. En algunas realizaciones, las formulaciones secadas por congelamiento de acuerdo con la invención también son fáciles de reconstituir (menos de 20 min).

En un aspecto, la presente invención proporciona una composición farmacéutica líquida que comprende:

- a. una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG en una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/ml,
- b. un tampón que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0,
- c. de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 % p/v de sacarosa,

d. de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 4 % p/v de glicina, y

e. opcionalmente un tensioactivo.

En algunas realizaciones, la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG se deriva preferiblemente de un anticuerpo humano o humanizado que preferiblemente se une específicamente a CD40L, tal como CD40L humano.

En algunas realizaciones, dicha molécula Fab-PEG o Fab'-PEG es un fragmento Fab o Fab' pegilado divulgado en el documento WO 2008/118356 (incorporado en el presente documento en su totalidad) y tiene una región variable de cadena ligera (LCVR) con las CDR1, CDR2, y CDR3 que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, 5 y 6, respectivamente, y una región variable de cadena pesada (HCVR), las CDR1, CDR2 y CDR3 tienen la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1, 2 y 3, respectivamente. En algunas realizaciones, dicha molécula Fab-PEG o Fab'-PEG tiene la secuencia de cadena VL que se muestra en SEQ ID NO: 7 y la secuencia de cadena VH que se muestra en SEQ ID NO: 8. En algunas realizaciones, dicha molécula Fab-PEG o Fab' La molécula -PEG tiene una secuencia de cadena ligera como se muestra en SEQ ID NO: 9 y una secuencia de cadena pesada como se muestra en SEQ ID NO: 10. En algunas realizaciones, dicha molécula Fab-PEG o Fab'-PEG está PEGilada en una cisteína en la región de bisagra modificada como se describe en el documento WO 2008/118356. En algunas realizaciones, un grupo maleimida está unido covalentemente a un único grupo tiol en una cisteína en la región bisagra modificada. En algunas realizaciones, luego se une

covalentemente un residuo de lisina a dicho grupo maleimida y se une un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 KDa a cada uno de los grupos amina en el residuo de lisina. Por lo tanto, el peso molecular total de todo el PEG unido covalentemente al Fab' 5 monovalente puede ser de aproximadamente 40 KDa. Una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG anti-CD40L de acuerdo con la invención también puede comprender una región variable de cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 7 o secuencias al menos 80 % idénticas a las mismas, y/o una región variable de cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 8 o secuencias al menos 80 % idénticas a las 10 mismas. Alternativa o adicionalmente, una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG anti-CD40L de acuerdo con la invención también puede comprender una cadena ligera que comprende SEQ ID NO: 9 o secuencias al menos 80 % idénticas a las mismas, y/o una cadena pesada que comprende SEQ ID NO: 10 o secuencias al menos 80 % idénticas a las mismas.

15 Por lo tanto, en algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y/o formulaciones secadas por congelamiento de acuerdo con la invención comprenden una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG que:

a. comprende CDR-H1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:1; CDR-H2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:2; CDR-H3 que tiene la 20 secuencia definida en SEQ ID NO:3; CDR-L1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:4; CDR-L2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:5 y CDR-L3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:6; o

b. comprende una región variable ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una región variable pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 8; o

5 c. comprende una región variable ligera que tiene al menos un 80 % de identidad, preferiblemente un 90 % de identidad con la secuencia como se define en SEQ ID NO: 7 y una región variable pesada que tiene al menos un 80 % de identidad, preferiblemente un 90 % de identidad con la secuencia como se define en SEQ ID NO: 8.

10 A lo largo de esta especificación, las regiones determinantes de complementariedad ("CDR") se definen de acuerdo con la definición de Kabat (Kabat et al., (1991), 5ª edición, publicación NIH No. 91-3242).

En algunas realizaciones, una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG está presente en la composición farmacéutica en una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/ml, por ejemplo, entre
15 aproximadamente 70 y aproximadamente 150 mg/ml, tal como aproximadamente 70, aproximadamente 75, aproximadamente 80, aproximadamente 85, aproximadamente 90, aproximadamente 95, aproximadamente 100, aproximadamente 105, aproximadamente 110, aproximadamente 115, aproximadamente 120, aproximadamente 125,
20 aproximadamente 130, aproximadamente 135, aproximadamente 140, aproximadamente 145 o aproximadamente 150 mg/ml. Alternativa o adicionalmente, una molécula de Fab-PEG o Fab'-PEG está presente en una

composición farmacéutica líquida en una cantidad expresada en términos de peso (gramos) por 100 ml (% p/v). Por lo tanto, en algunas realizaciones, una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG presente en la composición farmacéutica en su conjunto puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 5 a

5 aproximadamente 20 % p/v, por ejemplo, de aproximadamente 7 a aproximadamente 15 % p/v, tal como 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, aproximadamente 11.5, aproximadamente 12.0,

10 aproximadamente 12.5, aproximadamente 13.0, aproximadamente 13.5, aproximadamente 14.0, aproximadamente 14.5 o aproximadamente 15.0 % p/v. Una vez que se liofiliza una composición farmacéutica, la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG está presente en una cantidad que puede expresarse en términos de peso por peso (% p/p). Por lo tanto, en algunas realizaciones, una molécula Fab-

15 PEG o Fab'-PEG presente en un liofilizado (es decir, formulación liofilizada) en su conjunto puede estar presente en una cantidad de aproximadamente 50 a aproximadamente 80 % p/p, por ejemplo, de aproximadamente 55 a aproximadamente 75 % p/p, tal como de aproximadamente 55,

aproximadamente 56, aproximadamente 57, aproximadamente 58,

20 aproximadamente 59, aproximadamente 60, aproximadamente 61, aproximadamente 62, aproximadamente 63, aproximadamente 64, aproximadamente 65, aproximadamente 66, aproximadamente 67,

aproximadamente 68, aproximadamente 69, aproximadamente 70, aproximadamente 71, aproximadamente 72, aproximadamente 73, aproximadamente 74 o aproximadamente 75.0 % p/p. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la concentración de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG en un
5 liofilizado es aproximadamente 67.0 % p/p.

Las composiciones farmacéuticas líquidas de acuerdo con la invención en su conjunto comprenden un tampón que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0. Los tampones aceptables para controlar el pH desde un pH moderadamente ácido hasta un pH neutro incluyen, entre otros, tampones
10 de fosfato, acetato, citrato, histidina, arginina, TRIS e histidina. "TRIS" se refiere a 2-amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol y a cualquier sal farmacológicamente aceptable del mismo. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas líquidas comprenden un tampón de histidina, tal como un tampón de histidina-HCl, manteniendo el pH comprendido entre 5.0 (o aproximadamente
15 5.0) y 7.0 (o aproximadamente 7.0), por ejemplo comprendido entre 5.0 (aproximadamente 5.0) y 6.0, (aproximadamente 6.0), tal como (aproximadamente) 5.0, 5.1, 5.2, 5.3, 5.4, 5.5, 5.6, 5.7, 5.8, 5.9 o 6.0. En todas las realizaciones de la presente invención, a menos que se indique lo contrario, el valor del pH se midió a 23-25 °C y está dentro de ± 0.1 o ± 0.2 de una unidad
20 de pH. En algunas realizaciones, un tampón de histidina es un tampón que comprende una mezcla de histidina e histidina-HCl cuyas proporciones están determinadas por el pH deseado según lo determina el experto en la técnica, y

también puede denominarse en el presente documento tampón histidina/histidina-HCl.

En algunas realizaciones, la concentración de tampón en una composición farmacéutica líquida es de aproximadamente 10 a
5 aproximadamente 100 mM. En algunas realizaciones, la concentración del tampón es de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mM, tal como aproximadamente 10, aproximadamente 15, aproximadamente 20, aproximadamente 25, aproximadamente 30, aproximadamente 35, aproximadamente 40, aproximadamente 45 o aproximadamente 50 mM. Por
10 ejemplo, la concentración del tampón puede ser de aproximadamente 20 mM. Una vez liofilizada la composición farmacéutica, el tampón está presente en una cantidad que puede expresarse en términos de peso por peso (% p/p). En tal caso, el liofilizado comprende tampón presente en una cantidad de aproximadamente 2 % a aproximadamente 14 % p/p o de aproximadamente 3 a
15 aproximadamente 14 % p/p, por ejemplo de aproximadamente 2 % a aproximadamente 12 % p/p o a 3 a aproximadamente 12 % p/p, tal como de aproximadamente 2, aproximadamente 3, aproximadamente 4, aproximadamente 5, aproximadamente 6, aproximadamente 7, aproximadamente 8, aproximadamente 9, aproximadamente 10,
20 aproximadamente 11 o aproximadamente 12 % p/p. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la concentración del tampón en el liofilizado es aproximadamente

2.5-2.6 % p/p. En realizaciones adicionales, la concentración del tampón en el liofilizado es aproximadamente 2.6-2.8 % p/p.

En el contexto de la invención en su conjunto, la sacarosa está presente en una composición farmacéutica líquida en una cantidad de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 % p/v, por ejemplo de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 4 % p/v, o en algunas realizaciones, en una cantidad de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 % p/v tal como en una cantidad de aproximadamente 2.0, aproximadamente 2.25, aproximadamente 2.5, aproximadamente 2.75, aproximadamente 3.0, aproximadamente 3.25, aproximadamente 3.5, aproximadamente 3.75 o aproximadamente 4.0 % p/v. Por ejemplo, la cantidad de sacarosa puede ser de aproximadamente el 2.5 % p/v. Una vez liofilizada la composición farmacéutica, la sacarosa está presente en una cantidad que puede expresarse en términos de peso por peso (% p/p). En tal caso, el liofilizado comprende sacarosa en una cantidad de aproximadamente 7 a aproximadamente 30 % p/p, por ejemplo de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 % p/p, o en algunas realizaciones, de aproximadamente 15 a 25 % p/p, tal como aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19, aproximadamente 20, aproximadamente 21, aproximadamente 22, aproximadamente 23, aproximadamente 24 o aproximadamente 25 % p/p. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cantidad de sacarosa en el liofilizado puede ser de aproximadamente 16.5-16.75 % p/p.

En el contexto de la invención en su conjunto, la glicina está presente en una composición farmacéutica líquida en una cantidad de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 4 % p/v, por ejemplo de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 % p/v, o en una cantidad de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3 % p/v tal como en una cantidad de aproximadamente 1.5, aproximadamente 1.75, aproximadamente 2.0, aproximadamente 2.25, aproximadamente 2.5, aproximadamente 2.75, aproximadamente 3.0 % p/v. En algunas realizaciones, la glicina que se usa de acuerdo con la presente invención es L-glicina. Por ejemplo, la cantidad de glicina puede ser de aproximadamente 2.0 % p/v. Una vez que se liofiliza la composición farmacéutica, la glicina está presente en una cantidad que puede expresarse en términos de peso por peso (% p/p). En tal caso, el liofilizado comprende glicina en una cantidad de aproximadamente 3.5 a aproximadamente 24 % p/p, por ejemplo de aproximadamente 7 a aproximadamente 20 % p/p, o de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 % p/p, tal como de aproximadamente 10, aproximadamente 11, aproximadamente 12, aproximadamente 13, aproximadamente 14, aproximadamente 15, aproximadamente 16, aproximadamente 17, aproximadamente 18, aproximadamente 19 o aproximadamente 20 % p/p. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la cantidad de glicina en el liofilizado puede ser de aproximadamente 13.3-13.5 % p/p.

En el contexto de la divulgación en su conjunto, opcionalmente puede estar presente un tensioactivo en la composición farmacéutica líquida. Cuando

está presente, dicho tensioactivo es, por ejemplo, un polisorbato tal como PS20. El tensioactivo se añade en la solución acuosa que contiene la molécula de anticuerpo a una concentración de aproximadamente 0.01 % a aproximadamente 0.2 % p/v, por ejemplo, de aproximadamente 0.02 % a 5 aproximadamente 0.1 % (p/v), tal como de aproximadamente 0.02 % a aproximadamente 0.02 % (p/v), aproximadamente 0.03, aproximadamente 0.04, aproximadamente 0.05, aproximadamente 0.06, aproximadamente 0.07, aproximadamente 0.08, aproximadamente 0.09 o aproximadamente 0.1 % (p/v). Por ejemplo, el tensioactivo es PS20 y está en una cantidad de 10 aproximadamente 0.05 % p/v. Una vez liofilizada la composición farmacéutica, el tensioactivo está presente en una cantidad expresada en términos de peso por peso (% p/p). En tal caso, el liofilizado comprende un tensioactivo en una cantidad de aproximadamente 0.07 a 1.3 % p/p, por ejemplo de aproximadamente 0.1 a 0.7 % p/p, tal como de aproximadamente 0.1, 15 aproximadamente 0.2, aproximadamente 0.3, aproximadamente 0.4, aproximadamente 0.5, aproximadamente 0.6 o aproximadamente 0.7 % p/p. Por ejemplo, el tensioactivo es PS20 y su cantidad en el liofilizado puede ser de aproximadamente 0.3 % p/p.

Sorprendentemente, el inventor ha demostrado, en el contexto de la 20 invención en su conjunto, que la relación peso/peso (p/p) de sacarosa:glicina desempeña un papel clave en las prestaciones de los liofilizados. En algunas realizaciones, la relación (p/p) de sacarosa:glicina es de aproximadamente 2:3 a

aproximadamente 2:1. En algunas realizaciones, la relación (p/p) de sacarosa:glicina es de aproximadamente 3:4 a aproximadamente 5:3 o de aproximadamente 4:5 a aproximadamente 3:2. En algunas realizaciones, la relación (p/p) de sacarosa:glicina puede ser aproximadamente 3:4, aproximadamente 4:5, aproximadamente 5:6, aproximadamente 9:10, aproximadamente 11:12, aproximadamente 1:1, aproximadamente 13:12, aproximadamente 7:6, aproximadamente 6:5, aproximadamente 5:4 o aproximadamente 4:3. Por ejemplo, la relación (p/p) de sacarosa:glicina puede ser aproximadamente 1:1 o aproximadamente 5:4. Por lo tanto, en algunas realizaciones, en el presente documento se proporcionan composiciones farmacéuticas líquidas que comprenden:

- a. una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG en una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/ml,
- b. un tampón que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0,
- c. sacarosa y glicina en una proporción (p/p) de sacarosa:glicina de aproximadamente 2:3 a aproximadamente 2:1, y
- d. opcionalmente un tensioactivo.

En algunas realizaciones, una composición farmacéutica líquida comprende o consiste en aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/ml de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mM de un tampón (tal como un tampón de histidina) a pH

de aproximadamente 5.0 o aproximadamente 7.0, aproximadamente 1 a aproximadamente 5 % p/v de sacarosa, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 4 % p/v de glicina y opcionalmente aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.2 % p/v de tensioactivo (tal como PS20). En algunas

5 realizaciones, una composición farmacéutica líquida comprende o consiste en aproximadamente 70 a aproximadamente 150 mg/ml de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mM de un tampón (tal como un tampón de histidina) a pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.0, aproximadamente 1.5 a aproximadamente 4 % p/v de sacarosa,

10 aproximadamente 1 a aproximadamente 3 % p/v de glicina y opcionalmente aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.1 % p/v de tensioactivo (tal como PS20). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica líquida de la presente invención comprende o consiste en una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG en aproximadamente 70 a aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 10 a

15 aproximadamente 50 mM de un tampón (tal como tampón de histidina) a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.0, aproximadamente 2 a aproximadamente 4 % p/v de sacarosa, aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3 % p/v de glicina y opcionalmente aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.1 % p/v de tensioactivo (tal como PS20). Por ejemplo, una

20 composición farmacéutica líquida de acuerdo con la invención puede comprender aproximadamente 100 mg/ml de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 20 mM de tampón de histidina que mantiene el pH en

aproximadamente 5.5, aproximadamente 2.5 % p/v, de sacarosa, aproximadamente 2 % p/v de glicina y aproximadamente 0.05 % p/v de polisorbato 20. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica líquida de acuerdo con la invención puede comprender aproximadamente 100 mg/ml de un Fab-PEG o Fab'- Molécula de PEG, aproximadamente 20 mM de tampón de histidina que mantiene el pH en aproximadamente 5.5, aproximadamente 2.5 % p/v de sacarosa y aproximadamente 2 % p/v de glicina. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica líquida comprende o consiste en aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/ml de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mM de un tampón (tal como un tampón de histidina) a pH de aproximadamente 5.0 o aproximadamente 7.0, sacarosa y glicina en una relación respectiva (p/p) de aproximadamente 2:3 a aproximadamente 2:1 y opcionalmente de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.2 % p/v de tensioactivo (tal como PS20). En algunas realizaciones, una composición farmacéutica líquida comprende o consiste en aproximadamente 70 a aproximadamente 150 mg/ml de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mM de un tampón (tal como un tampón de histidina) a pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.0, sacarosa y glicina en una relación respectiva (p/p) de aproximadamente 3:4 a aproximadamente 5:3 y opcionalmente de aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.1 % p/v de tensioactivo (tal como PS20). En algunas realizaciones, la composición

farmacéutica líquida de la presente invención comprende o consiste en una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG en aproximadamente 70 a aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mM de un tampón (tal como tampón de histidina) a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.0, sacarosa y glicina en una relación respectiva (p/p) de aproximadamente 4:5 a aproximadamente 3:2 y opcionalmente de aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.1 % p/v de tensioactivo (tal como PS20). Por ejemplo, una composición farmacéutica líquida de acuerdo con la invención puede comprender aproximadamente 100 mg/ml de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 20 mM de tampón de histidina que mantiene el pH en aproximadamente 5.5, sacarosa y glicina en una proporción respectiva (p/p) de 1:1 o aproximadamente 5:4 y aproximadamente 0.05 % p/v de polisorbato 20. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica líquida de acuerdo con la invención puede comprender aproximadamente 100 mg/ml de un Fab-PEG o molécula Fab'-PEG, aproximadamente 20 mM de tampón de histidina que mantiene el pH en aproximadamente 5.5 y sacarosa y glicina en una relación respectiva (p/p) de aproximadamente 1:1 o aproximadamente 5:4. La presente invención describe además formulaciones secadas por congelamiento. Las técnicas para la liofilización de composiciones farmacéuticas líquidas que comprenden una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG son bien conocidas en la técnica.

La presente invención describe además una formulación liofilizada que comprende de aproximadamente 50 a aproximadamente 80 % p/p de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 12 % p/p o de aproximadamente 3 a aproximadamente 14 % p/p de un tampón que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0, de aproximadamente 7 a aproximadamente 30 % p/p de sacarosa, de aproximadamente 3.5 a aproximadamente 24 % p/p de glicina, y opcionalmente un tensioactivo. En algunas realizaciones, una formulación liofilizada (es decir, el liofilizado) comprende de aproximadamente 58 a aproximadamente 75 % p/p de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 12 % p/p o de aproximadamente 3 a aproximadamente 12 % p/p de un tampón que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 a aproximadamente 7.0, de aproximadamente 10 a aproximadamente 25 % p/p de sacarosa, de aproximadamente 7 a aproximadamente 20 % p/p de glicina, y opcionalmente de aproximadamente 0.07 a aproximadamente 1.3 % p/p de un tensioactivo. En algunas realizaciones, un liofilizado comprende de aproximadamente 58 a aproximadamente 75 % p/p de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, de aproximadamente 2 % a aproximadamente 12 % p/p o de aproximadamente 3 a aproximadamente 12 % p/p de un tampón que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0, de aproximadamente 15 a aproximadamente 25 % p/p de sacarosa, de aproximadamente 10 a aproximadamente 20 % p/p de glicina, y opcionalmente de aproximadamente 0.1

a aproximadamente 0.7 % p/p de un tensioactivo. En algunas realizaciones, un liofilizado comprende aproximadamente un 67 % p/p de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente un 2.5-2.6 % p/p de un tampón que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0, aproximadamente 16.5-16.75 % p/p de sacarosa, aproximadamente 13.3-13.5 % p/p de glicina y opcionalmente aproximadamente 0.3 % p/p de un tensioactivo. En una realización adicional, la formulación liofilizada comprende aproximadamente 67 % p/p de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 2.6-2.8 % p/p de tampón de histidina manteniendo el pH en aproximadamente 5.5, aproximadamente 16.5 y 17.5 % p/p de sacarosa, aproximadamente 13.3-13.5 % p/p de glicina y 0.3-0.4 % p/p de polisorbato 20.

El experto entenderá que la cantidad total combinada de componentes en cualquier composición dada en % p/p de los componentes de la formulación será igual al 100 %. Debe entenderse también que la expresión “p/p de un tampón que mantiene el pH entre...” en el contexto de una formulación secada por congelamiento de acuerdo con la presente invención, se refiere al pH de la formulación líquida de partida a partir de la cual se obtuvo la formulación secada por congelamiento. Por ejemplo, en una formulación secada por congelamiento que comprende aproximadamente 67 % p/p de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 2.6-2.8 % p/p de tampón de histidina manteniendo el pH en aproximadamente 5.5, aproximadamente 16.5 y 17.5 % p/p de sacarosa, aproximadamente 13.3-13.5 % p/p de glicina y 0.3-0.4 % p/p de polisorbato 20,

el tampón de histidina que mantiene el pH en aproximadamente 5.5 podría comprender entre aproximadamente 0.3-0.4 % p/p de histidina y 2.3-2.4 % p/p de histidina-HCl.

En algunas realizaciones, una formulación secada por congelamiento se
5 obtiene al secar por congelamiento una composición farmacéutica líquida de acuerdo con la presente invención en su conjunto. Por lo tanto, también se incluye una formulación secada por congelamiento obtenida mediante secado por congelamiento de una composición farmacéutica líquida que comprende:

- a. una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG en una concentración de
10 aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/ml,
- b. un tampón que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0.
- c. de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 % p/v de sacarosa,
- d. de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 4 % p/v de glicina, y
- 15 e. opcionalmente un tensioactivo.

En algunas realizaciones, una formulación secada por congelamiento se obtiene al secar por congelamiento una composición farmacéutica líquida que comprende o consiste en una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG en aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/ml, aproximadamente 10 a
20 aproximadamente 100 mM de un tampón (tal como un tampón de histidina) a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 7.0, aproximadamente 1 a aproximadamente 5 % p/v de sacarosa, aproximadamente 0.5 a

aproximadamente 4 % p/v de glicina y opcionalmente aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.2 % p/v de PS20. En algunas realizaciones, una formulación secada por congelamiento se obtiene al secar por congelamiento una composición farmacéutica líquida que comprende o consiste en una molécula

5 Fab-PEG o Fab'-PEG en aproximadamente 70 a aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mM de un tampón (tal como un tampón de histidina) a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.0 de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 4 % p/v de sacarosa, de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 % p/v de glicina y opcionalmente de

10 aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.1 % p/v de PS20. En algunas realizaciones, una formulación secada por congelamiento se obtiene al secar por congelamiento una composición farmacéutica líquida que comprende o consiste en una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG en aproximadamente 70 a aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mM

15 de un tampón (tal como un tampón de histidina) a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.0, aproximadamente 2 a aproximadamente 4 % p/v de sacarosa, aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3 % p/v de glicina y opcionalmente aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.1 % p/v de PS20. Por ejemplo, una formulación secada por congelamiento se obtiene al secar por

20 congelamiento una composición farmacéutica líquida que comprende aproximadamente 100 mg/ml de la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 20 mM de tampón de histidina que mantiene el pH en

aproximadamente 5.5, aproximadamente 2.5 % p/v de sacarosa, aproximadamente 2 % p/v de glicina y aproximadamente 0.05 % p/v de polisorbato 20. En algunas realizaciones, una formulación secada por congelamiento se obtiene al secar por congelamiento una composición farmacéutica líquida que comprende aproximadamente 100 mg/ml de la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 20 mM de tampón de histidina que mantiene el pH en aproximadamente 5.5, aproximadamente 2.5 % p/v de sacarosa y aproximadamente 2 % p/v de glicina.

La invención proporciona además procedimientos para fabricar cualquiera de las composiciones farmacéuticas descritas anteriormente. En algunas realizaciones, los procedimientos comprenden una etapa de formación de una mezcla de molécula Fab-PEG o Fab'-PEG junto con un tampón, sacarosa, glicina y un tensioactivo. La etapa de fabricación normalmente se lleva a cabo utilizando procedimientos convencionales. En algunas realizaciones, para preparar una composición farmacéutica líquida adecuada de acuerdo con la invención, se mezcla una cantidad dada de una molécula de Fab-PEG o Fab'-PEG, tal como de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/ml, con aproximadamente de 10 a aproximadamente 200 mg/ml aproximadamente 100 mM de un tampón (tal como un tampón de histidina) que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0, aproximadamente entre 1 y aproximadamente 5 % p/v de sacarosa, aproximadamente entre 0.5 y aproximadamente 4 % p/v de glicina y opcionalmente un tensioactivo. Cada uno de estos compuestos (es

decir, molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, tampón, sacarosa, glicina y tensioactivo opcional) se puede utilizar según las concentraciones, el pH y/o las relaciones descritas anteriormente. Luego la mezcla resultante se dispensa en viales. Un experto en la técnica reconocerá variaciones de este proceso.

- 5 La invención proporciona además procedimientos para fabricar cualquiera de las formulaciones liofilizadas descritas anteriormente (es decir, liofilizados). En algunas realizaciones, tales procedimientos comprenden pasos de: 1) formar una mezcla de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG junto con un tampón, sacarosa, glicina y un tensioactivo opcional, 2) someter la mezcla de la etapa 1)
- 10 a congelar -secar, y 3) recuperar la formulación secada por congelamiento. Las etapas de fabricación se llevan a cabo utilizando procedimientos convencionales. En algunas realizaciones, para preparar una formulación estable adecuada, 1) se mezcla una cantidad determinada de una molécula de Fab-PEG o Fab'-PEG, tal como de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/ml, con
- 15 aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mM. de un tampón (tal como un tampón de histidina) que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0, aproximadamente entre 1 y aproximadamente 5 % p/v de sacarosa, entre aproximadamente 0.5 y aproximadamente 4 % p/v de glicina y opcionalmente entre aproximadamente 0.01 y aproximadamente 0.2 % p/v de
- 20 PS20. 2) la mezcla resultante de la etapa 1) se somete a secado por congelamiento y 3) se recupera el liofilizado. Cada uno de los compuestos (es decir, la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, tampón, sacarosa, glicina y tensioactivo

opcional) se puede usar de acuerdo con las concentraciones, pH y/o proporciones descritas anteriormente. A continuación, el liofilizado resultante se dispensa en viales. Las variaciones de este proceso serán reconocidas por un experto en la técnica.

- 5 Excipientes adicionales para uso dentro de las composiciones farmacéuticas líquidas o formulaciones liofilizadas de acuerdo con la invención incluyen, entre otros, agentes mejoradores de la viscosidad, agentes de carga, agentes solubilizantes y/o combinaciones de los mismos.

10 La presente invención también proporciona recipientes que comprenden composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, un recipiente puede ser, sin ninguna limitación, un vial, una ampolla, un tubo, un frasco y/o una jeringa (tal como una jeringa precargada) que comprende una composición farmacéutica.

15 En algunas realizaciones, un recipiente puede ser parte de un kit de piezas que comprende uno o más recipientes que comprenden composiciones farmacéuticas líquidas o formulaciones secada por congelamiento de acuerdo con la invención y dispositivos de administración tales como una jeringa, una jeringa precargada, un autoinyector, un dispositivo sin aguja, un implante o un parche, y/u otros dispositivos para administración parental e instrucciones de
20 uso.

 La invención también proporciona un kit de piezas que comprende las formulaciones farmacéuticas líquidas o liofilizadas descritas anteriormente e

instrucciones de uso. En una realización adicional, el kit de piezas comprende las formulaciones líquidas o secada por congelamiento de acuerdo con la invención, en uno o más recipientes e instrucciones de uso.

La invención también proporciona un artículo de fabricación, para uso farmacéutico o veterinario, que comprende un recipiente que comprende cualquiera de las composiciones farmacéuticas líquidas o formulaciones secada por congelamiento descritas anteriormente. También se describe un material de embalaje que proporciona instrucciones de uso.

Las formulaciones liofilizadas proporcionadas en el presente documento, en particular para un solo uso, son adecuadas para uso farmacéutico o veterinario, una vez reconstituidas con un disolvente. El volumen de disolvente usado para la reconstitución dicta la concentración de la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG en la composición farmacéutica líquida resultante. La reconstitución con un volumen de disolvente menor que el volumen previo a la liofilización proporciona una formulación más concentrada que antes de la liofilización y viceversa. Por lo tanto, la presente invención proporciona procedimientos para reconstituir una composición farmacéutica secada por congelamiento de acuerdo con la invención añadiendo un disolvente. En algunas realizaciones, el disolvente es agua (tal como agua para inyección) o tampón salino (tal como PBS). La relación de reconstitución (volumen de composición farmacéutica preliofilizada a disolvente usado para reconstituir la composición farmacéutica secada por congelamiento) puede variar de aproximadamente 2:1 a aproximadamente 1:10

tal como por ejemplo aproximadamente 2:1, aproximadamente 3:2, aproximadamente 1:1 o aproximadamente 1:2. Por lo tanto, como ejemplo no limitante, si la composición farmacéutica preliofilizada debe comprender o consistir en 100 mg/ml de la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, 20 mM de tampón de histidina que mantiene el pH en aproximadamente 5.5, 2.5 % p/v de sacarosa, 2 % p/v de glicina y 0.05 % p/v de polisorbato 20, y si la relación de reconstitución fuera 1:1, la formulación reconstituida contendría 100 mg/ml de Fab-PEG o Fab'-Molécula de PEG, 20 mM de tampón de histidina que mantiene el pH en aproximadamente 5.5, 2.5 % p/v de sacarosa, 2 % p/v de glicina y 0.05 % p/v de polisorbato 20.

La presente invención describe además una formulación secada por congelamiento, caracterizada porque después de la reconstitución de dicha formulación secada por congelamiento, la formulación líquida resultante comprende una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG en aproximadamente 70 a aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mM de un tampón (tal como un tampón de histidina) a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.0, de aproximadamente 2 a aproximadamente 4 % p/v de sacarosa, de aproximadamente 1.5 a aproximadamente 3 % p/v de glicina y opcionalmente aproximadamente 0.02 hasta aproximadamente 0.1 % p/v de tensioactivo (tal como PS20). Por ejemplo, una composición farmacéutica secada por congelamiento después de la reconstitución de acuerdo con la invención puede comprender aproximadamente 100 mg/ml de una molécula

Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 20 mM de tampón de histidina que mantiene el pH en aproximadamente 5.5, aproximadamente 2.5 % p/v de sacarosa, aproximadamente 2 % p/v de glicina y aproximadamente 0.05 % p/v de polisorbato 20. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica
5 secada por congelamiento después de la reconstitución de acuerdo con la invención puede comprender aproximadamente 100 mg/ml de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 20 mM de tampón de histidina que mantiene el pH en aproximadamente 5.5, aproximadamente 2.5 % p/v de sacarosa y aproximadamente 2 % p/v de glicina. En algunas realizaciones, una
10 composición farmacéutica secada por congelamiento después de la reconstitución comprende o consiste en aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/ml de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 10 a aproximadamente 100 mM de un tampón (tal como una tampón de histidina) a un pH de aproximadamente 5.0 o aproximadamente 7.0,
15 sacarosa y glicina en una relación respectiva (p/p) de aproximadamente 2:3 a aproximadamente 2:1 y opcionalmente de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.2 % p/v de tensioactivo (tal como PS20). En algunas realizaciones, una composición farmacéutica secada por congelamiento después de la reconstitución comprende o consiste en aproximadamente 70 a
20 aproximadamente 150 mg/ml de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mM de un tampón (tal como un tampón de histidina) a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.0,

sacarosa y glicina en una relación respectiva (p/p) de aproximadamente 3:4 a aproximadamente 5:3 y opcionalmente de aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.1 % p/v de tensioactivo (tal como PS20). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica secada por congelamiento después de la reconstitución de la presente invención comprende o consiste en una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG en aproximadamente 70 a aproximadamente 150 mg/ml, aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mM de un tampón (tal como un tampón de histidina) a un pH de aproximadamente 5.0 a aproximadamente 6.0, sacarosa y glicina en una relación respectiva (p/p) de aproximadamente 4:5 a aproximadamente 3:2 y opcionalmente de aproximadamente 0.02 a aproximadamente 0.1 % p/v de tensioactivo (como PS20). Por ejemplo, una composición farmacéutica secada por congelamiento después de la reconstitución de acuerdo con la invención puede comprender aproximadamente 100 mg/ml de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 20 mM de tampón de histidina que mantiene el pH en aproximadamente 5.5, sacarosa y glicina en una proporción respectiva (p/p) de 1:1 o aproximadamente 5:4 y aproximadamente 0.05 % p/v de polisorbato 20. En algunas realizaciones, una composición farmacéutica secada por congelamiento después de la reconstitución de acuerdo con la invención puede comprender aproximadamente 100 mg/ml de una molécula de Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 20 mM de tampón de histidina que mantiene el pH en aproximadamente 5.5 y sacarosa y glicina en una relación respectiva (p/p) de

aproximadamente 1:1 o aproximadamente 5:4. En otras realizaciones, una composición farmacéutica secada por congelamiento después de la reconstitución de acuerdo con la invención puede comprender aproximadamente 70 mg/ml de Fab-PEG o una molécula de Fab'-PEG, aproximadamente 14 mM
5 de tampón histidina/Histidina HCl que mantiene el pH en aproximadamente 5.5 y sacarosa y glicina en una relación respectiva (p/p) de aproximadamente 1:1 o aproximadamente 5:4.

En algunas realizaciones, las formulaciones liofilizadas de la invención se pueden conservar durante al menos aproximadamente 12 meses a
10 aproximadamente 24 meses. En algunas realizaciones, en condiciones de almacenamiento preferidas, antes del primer uso, las formulaciones se mantienen alejadas de la luz brillante (preferiblemente en la oscuridad), a una temperatura de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 °C, por ejemplo, a temperatura ambiente (aproximadamente 20-25 °C) o aproximadamente 2-8 °C
15 (ver los siguientes ejemplos).

Las composiciones farmacéuticas y/o liofilizados reconstituidos de acuerdo con la invención son para uso en terapia. Por ejemplo, la composición farmacéutica o los liofilizados reconstituidos de acuerdo con la invención se pueden utilizar en el tratamiento de diversos trastornos o enfermedades tales
20 como una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, un cáncer, una enfermedad neoplásica y/o una enfermedad neurodegenerativa. La invención también proporciona procedimientos para tratar diversos trastornos o

enfermedades tales como una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, un cáncer, una enfermedad neoplásica y/o una enfermedad neurodegenerativa en un sujeto mamífero que comprende administrar una composición farmacéutica y/o un liofilizado reconstituido de acuerdo con la invención. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas y/o liofilizados reconstituidos de acuerdo con la invención se pueden usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de diversos trastornos o enfermedades tales como una enfermedad autoinmunitaria, una enfermedad inflamatoria, un cáncer, una enfermedad neoplásica y/o o una enfermedad neurodegenerativa.

En el contexto de la invención en su conjunto, las enfermedades autoinmunitarias o enfermedades inflamatorias incluyen, entre otras, lupus, incluido lupus eritematoso sistémico (LES), lupus cutáneo (CLE), lupus eritematoso inducido por fármacos o lupus neonatal, artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, nefritis lúpica, síndrome de Sjögren, polimiositis, dermatomiositis, arteritis temporal, vasculitis asociada a ANCA, síndrome de Churg-Strauss, síndrome antifosfolípido, glomerulonefropatía membranosa, enfermedad de Goodpasture, nefropatía por inmunoglobulina A, púrpura de Henoch-Schönlein, rechazo crónico de injerto, dermatitis atópica, pénfigo vulgar, psoriasis, asma, alergia, esclerosis sistémica, esclerosis múltiple, síndrome de Guillain-Barré, mielitis transversa, polineuropatía inmune crónica, miastenia gravis, enfermedad de Addison, tiroiditis, gastritis autoinmune, anemia

perniciosa, enfermedad celíaca, colitis ulcerosa, sarcoidosis, hemolítica anemia, púrpura trombocitopénica idiopática, enfermedad de Behçet, cirrosis biliar primaria, diabetes autoinmunitaria, neuroborreliosis de Lyme, enfermedad pulmonar intersticial. Las enfermedades neurodegenerativas incluyen, entre

5 otras, la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la ataxia de Friedreich, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), la miastenia gravis, la neuropatía motora multifocal, la esclerosis lateral primaria, la esclerosis múltiple, la atrofia muscular espinal, la enfermedad de Kennedy y la ataxia espinocerebelosa. De manera similar, afecciones como aterosclerosis,

10 insuficiencia cardíaca, osteoartritis, esteatohepatitis no alcohólica, síndrome del intestino irritable, enfermedad de Crohn, complicaciones diabéticas (nefropatía, neuropatía, arteriopatía, retinopatía), asma, fibrosis quística, enfermedad obstructiva crónica de las vías respiratorias, epilepsia, glaucoma, degeneración macular relacionada con la edad, trastornos psiquiátricos (ansiedad, depresión,

15 psicosis), síndrome de fatiga crónica, entesiopatías/tendinopatías, prematuridad/infección prenatal, obesidad/síndrome metabólico, afecciones dermatológicas (acné vulgar, acné rosácea, queratosis solar), cicatrización anormal de heridas (cicatrices queloides), trastornos urogenitales (prostatismo/prostatitis, síndrome de vejiga hiperactiva).

20 En el contexto de la invención en su conjunto, las composiciones farmacéuticas y/o formulaciones secadas por congelamiento reconstituidas (liofilizados) de acuerdo con la invención son para uso en un procedimiento para

tratar un trastorno inflamatorio, neurodegenerativo o neuromuscular autoinmune en un sujeto mamífero, cuyo procedimiento comprende administrar una dosis de aproximadamente 24 mg/kg de Fab-PEG o Fab'-PEG que se une específicamente a CD40L a un sujeto que necesita dicho tratamiento, con una
5 frecuencia de aproximadamente una vez cada 4 semanas. En algunas realizaciones, una formulación secada por congelamiento de acuerdo con la invención se reconstituye de acuerdo con las instrucciones de uso y se añade a una bolsa de solución salina para administración intravenosa.

En determinadas realizaciones, las formulaciones secada por
10 congelamiento de la presente invención que comprenden aproximadamente un 67 % p/p de Fab-PEG o Fab'-PEG que se une específicamente a CD40L, aproximadamente un 2.6-2.8 % p/p de tampón histidina/Histidina HCl manteniendo la Se reconstituyen pH a aproximadamente 5.5, aproximadamente 16.5 y 17.5 % p/p de sacarosa, aproximadamente 13.3-13.5 % p/p de glicina y
15 0.3-0.4 % p/p de polisorbato 20 de acuerdo con las instrucciones de uso, para uso en un procedimiento para tratar una enfermedad autoinmune tal como lupus eritematoso sistémico en un sujeto mamífero, dicho procedimiento comprende administrar una dosis de 24 mg/kg de Fab-PEG o Fab'-PEG que se une específicamente a CD40L a un sujeto que necesita dicho tratamiento, con una
20 frecuencia de aproximadamente una vez cada 4 semanas. En determinadas realizaciones, la formulación secada por congelamiento reconstituida de la

presente invención se administra durante al menos 24 semanas, o durante al menos 48 semanas.

En una realización particular, el Fab-PEG o Fab'-PEG que se une específicamente a CD40L:

- 5 a) comprende CDR-H1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:1; CDR-H2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:2; CDR-H3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:3; CDR-L1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:4; CDR-L2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:5 y CDR-L3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:6; o
- 10 b) comprende una región variable ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una región variable pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 8; o
- c) comprende una región variable ligera que tiene al menos un 80 % de identidad, preferiblemente un 90 % de identidad con la secuencia como se define
- 15 en SEQ ID NO: 7 y una región variable pesada que tiene al menos un 80 % de identidad, preferiblemente un 90 % de identidad con la secuencia como se define en SEQ ID NO: 8; o
- d) comprende una cadena ligera como se define en SEQ ID NO: 9 y una cadena pesada como se define en SEQ ID NO: 10.

20 En algunas realizaciones, la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG comprende

a) se une un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en la región bisagra modificada; un residuo de lisina covalentemente al grupo maleimida; y

b) se une un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 KDa a cada uno de los grupos amina del residuo de lisina.

En una realización adicional, las formulaciones liofilizadas reconstituidas de la presente invención son para uso en un procedimiento de tratamiento de un trastorno inflamatorio, neurodegenerativo o neuromuscular autoinmune en combinación con agentes terapéuticos adicionales. Por ejemplo, las formulaciones liofilizadas reconstituidas de la presente invención se pueden coadministrar con un corticosteroide, un fármaco antiinflamatorio no esteroideo (NSAID) o terapias dirigidas a las numerosas citocinas proinflamatorias que se sabe que están implicadas en la patogénesis de trastornos mediados por la inmunodeficiencia, tal como, TNF, IL-1, IL-6, CTLA-4, JAK, IFN (por ejemplo, anifrolumab) o aquellos que se dirigen a la actividad de las células B, como CD19, CD20 (por ejemplo, rituximab), CD22, BAFF (por ejemplo, belimumab) y BlyS/APRIL (por ejemplo, atacicept).

En algunas realizaciones, las formulaciones liofilizadas de la presente invención tienen una estabilidad mejorada y se pueden almacenar fácilmente a una temperatura de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 °C, tal como a temperatura ambiente (aproximadamente 20-25 °C) o en aproximadamente 2-

8 °C (ver siguientes ejemplos). De hecho, los inventores han descubierto que las formulaciones liofilizadas que comprenden aproximadamente un 67 % p/p de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente un 2.5-2.6 % p/p de un tampón que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0, aproximadamente un 16.5-16.75 % p/p de sacarosa, aproximadamente un 13.3-13.5 % p/p de glicina y, opcionalmente, aproximadamente un 0.3 % p/p de un tensioactivo son estables en el tiempo, especialmente cuando se almacenan a una temperatura de aproximadamente 2 a aproximadamente 25 °C. Dichas formulaciones minimizan la agregación de la molécula Fab-PEG o Fab'-Peg pero también reducen el tiempo de reconstitución.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar mejor la preparación de las formulaciones y composiciones de la invención. No se interpretará que el alcance de la invención consiste simplemente en los siguientes ejemplos.

Descripción de las secuencias:

15 SEQ ID NO.1: CDR-H1

GFSSTNYHVVH

SEQ ID NO.2: CDR-H2

VIWGDGDTSYNSVLKS

SEQ ID NO.3: CDR-H3

20 QLTHYYVLAA

SEQ ID NO.4: CDR-L1

RASEDLYYNLA

SEC ID N° 5: CDR-L2

DTYRLAD

SEQ ID NO.6: CDR-L3

QQYYKFPFT

5 SEQ ID NO.7: cadena ligera variable

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDLYYNLAWYQRKPGKAPKLLIYDTYR
LADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFASYCQQYYKFPFTFGQGTKVEI
K

SEQ ID NO.8: cadena pesada variable

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSSTNYHVHWVRQAPGKGLEWMGVI
WGDGDTSYNSVLKSRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARQLTHYY
VLAAWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO.9: Cadena ligera Fab

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASEDLYYNLAWYQRKPGKAPKLLIYDTYR
15 LADGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFASYCQQYYKFPFTFGQG
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS
SPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.10: cadena pesada Fab'

20 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAVSGFSSTNYHVHWVRQAPGKGLEWMGVI
WGDGDTSYNSVLKSRFTISRDTSKNTVYLMNSLRAEDTAVYYCARQLTH
YYVLAAWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE

PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV
 NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTTHHTCAA

EJEMPLOS

Abreviaturas

- 5 DLS (dispersión dinámica de luz); SEC (Cromatografía de exclusión por tamaño); SE-HPLC (cromatografía líquida de alta resolución con exclusión de tamaño); CEX: cromatografía de intercambio catiónico; Suc (sacarosa); PS20 (Polisorbato 20); Gly (glicina); Man (Manitol); Tre (trehalosa); His (histidina); Lac (Lactosa); Cit (citrato); Ace (acetato); Pov (povidona); Aggr: Agregación. FD:
- 10 secar por congelamiento o secado por congelamiento; conc: concentración; prelyo: preliofilización; recon: reconstitución

Material

- El ingrediente farmacéutico activo es un Fab'-PEG, denominado en el presente documento Fab1. Su secuencia de cadena ligera se muestra en SEQ
- 15 ID NO: 9 y su secuencia de cadena pesada se muestra en SEQ ID NO: 10. Esta molécula está PEGilada en una cisteína en la región bisagra modificada como se describe en el documento WO 2008/118356. Un grupo maleimida está unido covalentemente a un único grupo tiol en una cisteína en la región bisagra modificada; un residuo de lisina está unido covalentemente al grupo maleimida;
- 20 y se une un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 KDa a cada uno de los grupos amina del residuo de lisina. Por lo tanto, el peso molecular total de todo el PEG unido covalentemente al Fab'

monovalente es de aproximadamente 40 KDa. Se presenta, antes del trabajo de formulación, como una composición líquida en acetato de sodio 50 mM, cloruro de sodio 125 mM, pH 5.0 (denominado en el presente DS).

Procedimientos

5 Reconstitución:

El producto liofilizado se reconstituyó usando un procedimiento estándar, es decir, inyectando agua en el vial. Se midió con un cronómetro el tiempo necesario para que la torta se disolviera completamente hasta obtener una solución transparente.

10 Aspecto (antes y después de la reconstitución)

Se comprobó visualmente la integridad estructural de la torta y se informó de cualquier defecto. Las observaciones fueron apoyadas en material fotográfico. Se realizó un análisis de apariencia de las muestras reconstituidas para confirmar el color y detectar partículas visibles. El análisis del aspecto se basó en una evaluación visual.

15

Concentración de proteínas:

La concentración de proteína se determinó al medir la absorción a 280 nm después de la dilución a aproximadamente 1 mg/ml y se analizó utilizando un espectrofotómetro que ha sido calibrado, de acuerdo con procedimientos estándar. En el caso de que la muestra esté visiblemente agregada, es posible que sea necesario centrifugarla brevemente para eliminar el precipitado y determinar la concentración en el sobrenadante aspirado. Luego se calcula la

20

concentración de la muestra con la siguiente fórmula utilizando el coeficiente de extinción establecido:

$$c = \frac{A_{280} \cdot x \cdot dil}{E_m \cdot b}$$

- (con c= concentración de proteína (mg/ml); A_{280} = absorbancia a 280 nm;
 5 dil = factor de dilución; E_m = coeficiente de extinción (0.82 ml/mg.cm); b= longitud de trayecto (cm)).

Agregación de proteínas, especies de alto peso molecular y especies de bajo peso molecular:

- Se usaron SEC o SE-HPLC de acuerdo con procedimientos estándar para
 10 resolver y cuantificar especies relacionadas con el producto (por ejemplo, especies de bajo peso molecular, agregados y especies de alto peso molecular) en formulaciones reconstituidas. La detección y cuantificación se realizaron mediante absorbancia UV a 214 nm.

Especies ácidas y básicas:

- 15 Se utilizó el análisis CEX para determinar el perfil de carga y proporcionar valores para las especies ácidas y básicas totales, de acuerdo con procedimientos estándar (usando detección de fluorescencia en la emisión a 340 nm y excitación a 280 nm).

Ejemplo 1: cribado preliminar

- 20 El desarrollo de la formulación se inició con un estudio de selección preliminar para preseleccionar al menos el tampón y el estabilizador (consulte la

Tabla 1). Se aplicaron procedimientos estándar para la liofilización. Las formulaciones previas a la liofilización contenían 100 mg/ml de Fab1 y se prepararon mediante intercambio de tampón.

Tabla 1 – Formulaciones de detección preliminares

	Tampón	Estabilizante	Agente de carga	Tensioactivo
1	20 mM His pH6.0	60 mM Suc	2 % Man	0.01 % Tween
2	20 mM His pH6.0	60 mM Suc	Ninguno	0.01 % Tween
3	20 mM His pH6.0	60 mM Suc	2 % Pov	0.01 % Tween
4	20 mM His pH6.0	60 mM Tre	2 % Man	Ninguno
5	20 mM His pH6.0	60 mM Tre	2 % Man	Ninguno
6	20 mM His pH6.0	60 mM Tre	Ninguno	Ninguno
7	20 mM His pH6.0	60 mM Tre	Ninguno	Ninguno
8	20 mM His pH6.0	60 mM Tre	2 % Pov	Ninguno
9	20 mM His pH6.0	60 mM Tre	2 % Pov	Ninguno
10	20 mM Lac pH4.5	60 mM Suc	2 % Man	Ninguno
11	20 mM Lac pH4.5	60 mM Suc	Ninguno	Ninguno
12	20 mM Lac pH4.5	60 mM Suc	2 % Pov	Ninguno
13	20 mM Lac pH4.5	60 mM Tre	2 % Man	0.01 % Tween
14	20 mM Lac pH4.5	60 mM Tre	2 % Man	0.01 % Tween
15	20 mM Lac pH4.5	60 mM Tre	Ninguno	0.01 % Tween
16	20 mM Lac pH4.5	60 mM Tre	Ninguno	0.01 % Tween
17	20 mM Lac pH4.5	60 mM Tre	2 % Pov	0.01 % Tween
18	20 mM Lac pH4.5	60 mM Tre	2 % Pov	0.01 % Tween

5

Las muestras liofilizadas se reconstituyeron inyectando 0.5 ml de agua en el vial para la formulación que tenía una concentración de Fab1 de 100 mg/ml e

inyectando 1.0 ml de agua en el vial para la formulación que tenía una concentración de anticuerpo de 50 mg/ml.

Las formulaciones de liofilización se evaluaron de acuerdo con la apariencia de torta del producto liofilizado. Aparecieron como un pastel
5 aceptable, de color blanco, bien formado y sin defectos (no se muestran imágenes).

Tabla 2. Tiempo de reconstitución y concentración de Fab1 después de la reconstitución

	Concentración diana: 50 mg/ml		Concentración diana: 100 mg/ml	
	Tiempo de reconstitución (min)	Concentración Fab1 (mg/ml) ^a	Tiempo de reconstitución (min)	Concentración Fab1 (mg/ml) ^a
DS	7.1	48.7	20.6	100.1
1	1.8	45.1	2.9	87.4
2	1.7	47.8	4.5	90.7
3	1.3	44.7	9.6	84.3
4	1.4	48.7	5.1	93.2
5	1.6	49.8	5.8	91.7
6	1.3	48.8	3.8	90.5
7	1.5	44.4	5.6	87.8
8	2.4	46.3	9.7	93.2
9	1.6	45.9	12.4	91.3
10	0.7	44.5	3.4	88.9
11	1.0	46.2	7.7	93.5
12	1.2	44.9	11.4	94.9
13	0.8	41.8	4.3	87.2

	Concentración diana: 50 mg/ml		Concentración diana: 100 mg/ml	
	Tiempo de reconstitución (min)	Concentración Fab1 (mg/ml) ^a	Tiempo de reconstitución (min)	Concentración Fab1 (mg/ml) ^a
14	0.8	43.0	3.6	90.9
15	0.9	47.2	4.7	88.0
16	1.2	46.0	6.9	100.1
17	1.6	45.5	11.3	90.9
18	1.7	42.7	11.6	84.3
^a . <i>Las concentraciones de proteína fueron típicamente más bajas que en la formulación de liofilización inicial debido al efecto de volumen de la torta liofilizada.</i>				

Luego se evaluaron las muestras en cuanto al tiempo de reconstitución y la concentración de proteína (ver Tabla 2).

Como se puede observar, hay un aumento dramático en el tiempo de reconstitución entre las formulaciones de 50 mg/ml y las formulaciones de 100 mg/ml, siendo el tiempo de reconstitución más pronunciado para las formulaciones de 100 mg/ml. Cabe señalar que cuando se reconstituyeron con 0.5 ml de agua, las soluciones se diluyeron con respecto a la formulación previa a la liofilización.

También se determinó la agregación de proteínas para las formulaciones con 100 mg/ml de anticuerpo (ver Tabla 3). No se observaron diferencias significativas en la agregación de proteínas para las diferentes formulaciones.

Tabla 3. Agregación de proteínas antes de la liofilización/después de la reconstitución

	Agregación (%; SE-HPLC)	
	Antes de liofilización	Después de reconstitución
DS	0.5	N/A
1	0.6	0.6
2	0.6	0.7
3	--- ^a	--- ^a
4	0.6	0.7
5	0.6	0.7
6	0.6	0.7
7	0.6	0.7
8	--- ^a	--- ^a
9	--- ^a	--- ^a
10	0.5	0.6
11	0.5	0.6
12	--- ^a	--- ^a
13	0.5	0.5
14	0.5	0.6
15	0.5	0.6
16	0.5	0.6
17	--- ^a	--- ^a
18	--- ^a	--- ^a
^a . Sin datos, interferencia de Povidona en el cromatograma		

5 Dado que no se observaron diferencias significativas en la agregación de proteínas, solo se consideró el tiempo de reconstitución para comparar las diferentes formulaciones. Como ya quedó claro en un primer examen de los

datos, la povidona tuvo un efecto negativo en el tiempo de reconstitución. El manitol demostró tener un efecto positivo en el tiempo de reconstitución. El modelo dio preferencia a la histidina como tampón y a la sacarosa como estabilizador. El efecto del tensioactivo (0.01 % Tween 20) no fue significativo.

5 Ejemplo 2: cribado de optimización

El estudio de selección (Ejemplo 1) indicó que la preformulación óptima era una formulación de sacarosa/manitol y se evaluó adicionalmente para su optimización. Dado que las formulaciones de pH alto plantearon un problema para la estabilidad del producto con respecto a un aumento de especies ácidas, también se tuvieron en cuenta otros tampones además de histidina pH 6.0 para la optimización de la formulación y se evaluaron para un aumento de especies ácidas (ver formulaciones en la Tabla 4).

Tabla 4. formulaciones de optimización

	Tampón	pH	Estabilizante	Agente de carga	Surfactante	Concentración de proteína
20	20 mM Lac	4.5	1 % Suc	4 % Man	N/A	100 mg/ml
21	20 mM Lac	4.5	2.5 % Suc	2.5 % Man	N/A	100 mg/ml
22	20 mM Lac	4.5	4 % Suc	1 % Man	N/A	100 mg/ml
23	20 mM Cit	5.25	1 % Suc	4 % Man	N/A	100 mg/ml

	Tampón	pH	Estabilizante	Agente de carga	Surfactante	Concentración de proteína
24	20 mM Cit	5.25	2.5 % Suc	2.5 % Man	N/A	100 mg/ml
25	20 mM Cit	5.25	2.5 % Suc	2.5 % Man	N/A	100 mg/ml
26	20 mM Cit	5.25	4 % Suc	1 % Man	N/A	100 mg/ml
27	20 mM His	6.0	1 % Suc	4 % Man	N/A	100 mg/ml
28	20 mM His	6.0	2.5 % Suc	2.5 % Man	N/A	100 mg/ml
29	20 mM His	6.0	4 % Suc	1 % Man	N/A	100 mg/ml
30	20 mM Cit	5.25	5 % Suc	-	N/A	100 mg/ml
31	20 mM Cit	5.25	Ninguna	5 % Man	N/A	100 mg/ml
32	20 mM Cit	5.25	2.5 % Suc	2.5 % Man	0.01 % PS20	100 mg/ml
33	20 mM Cit	5.25	2.5 % Suc	2.5 % Man	0.05 % PS20	100 mg/ml
34	20 mM Cit	5.25	2.5 % Suc	2.5 % Man	N/A	150 mg/ml
35	20 mM Cit	5.25	2.5 % Suc	2.5 % Man	N/A	200 mg/ml

Todas las muestras se evaluaron en cuanto al tiempo de reconstitución, la agregación de proteínas y las especies ácidas (ver Tabla 5; valor en t0).

Tabla 5. Tiempo de reconstitución (tiempo de reconstitución), concentración de proteína después de la reconstitución (conc. Fab1) y agregación y especies

5 ácidas antes de la liofilización (prelio)/después de la reconstitución (después de la reconstitución)

	Tiempo de Recon^a (min)	conc Fab1 después recon (mg/ml)	Agregación (%; SEC)		Especies ácidas^b (%,CEX)	
			prelio	después recon	prelio	después recon
DS	24.9 ± 5.2	98.9	0.5	N/A	10.2	N/A
20	6.7 ± 0.3	88.3	0.4	1.0	10.0	10.7
21	6.5 ± 0.9	90.1	0.4	0.6	10.2	10.5
22	7.7 ± 1.3	94.9	0.4	0.5	10.2	10.3
23	4.9 ± 2.0	70.0	0.5	0.8	10.5	10.9
24	5.6 ± 0.9	78.5	0.5	0.5	10.6	11.0
25	7.9 ± 0.4	91.0	0.5	0.5	10.4	10.9
26	10.3 ± 1.9	84.6	0.5	0.5	10.8	11.1
27	5.3 ± 0.5	91.8	0.6	0.9	13.7	13.6
28	4.1 ± 0.5	92.6	0.6	0.7	13.3	13.4
29	5.8 ± 2.1	88.7	0.6	0.6	13.6	12.7
30	14.1 ± 4.7	88.7	0.5	0.5	10.8	11.1
31	5.0 ± 2.1	94.3	0.5	1.8	10.4	11.3
32	10.6 ± 2.9	94.9	0.5	0.6	11.6	10.4
33	7.4 ± 0.2	84.9	0.5	0.5	10.2	10.6
34	54 ± 24	116.3	0.5	0.7	8.4	10.8

35	>60	175.6	0.5	0.8	10.7	11.1
a.	Tiempo de reconstitución es la media de las tres mediciones					
b.	<i>El análisis CEX se retrasó, lo que resultó en un mayor contenido de especies ácidas, especialmente para las Formulaciones 8-10.</i>					

Luego se evaluó la capacidad de todas las formulaciones para estabilizar y proteger el producto Fab-PEG contra la degradación con respecto a la agregación de proteínas y los aumentos de especies ácidas con el tiempo (Tabla 5)

6). Las muestras líquidas (formulaciones no liofilizadas) y las muestras liofilizadas se incubaron a 2-8 °C y 30 °C durante cuatro semanas.

Tabla 6. Estabilidad acelerada: agregación de proteínas y especies ácidas

(después de 4 semanas, los valores T0 se informan en la Tabla 5).

	Agregación (% SE-HPLC)				Especies ácidas (% CEX)			
	Líquido		Liofilizado		Líquido		Liofilizado	
	2-8 °C ^a	30 °C ^a	2-8 °C ^a	30 °C ^a	2-8 °C ^b	30 °C ^b	2-8 °C	30 °C
DS	0.4	1.2	1.8	9.7	10.5	21.4	-	-
20	0.3	0.4	0.3	0.7	8.4	16.8	10.9	17.7
21	0.2	0.3	0.3	0.5	10.2	17.3	10.0	14.0
22	0.2	0.3	0.3	0.4	10.2	16.4	9.4	12.5
23	0.3	0.6	0.4	0.7	9.4	30.3	9.6	14.4
24	0.2	0.4	0.3	0.9	10.8	30.7	10.2	13.7
25	0.2	0.4	0.3	0.4	10.5	30.7	8.8	12.9
26	0.2	0.4	0.2	0.7	9.5	30.8	8.8	13.3
27	0.2	0.4	0.4	0.4	15.8	52.1	9.9	14.7
28	0.2	0.3	0.3	0.3	16.2	52.0	11.0	11.8
29	0.2	0.3	0.2	0.2	16.0	50.6	11.0	8.3

30	0.2	0.4	0.2	0.4	10.7	29.2	10.4	11.7
31	0.2	0.4	0.9	2.5	10.7	29.2	9.9	17.6
32	0.2	0.4	N/A	0.7	11.2	30.0	N/A	14.8
33	0.2	0.4	N/A	0.8	11.7	31.2	N/A	12.5
34	0.2	0.5	N/A	0.8	N/A	29.0	N/A	14.5
35	0.2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
a. <i>El rendimiento de la columna SEC se redujo, lo que explica el contenido aparentemente menor de especies de agregación después de 4 semanas de estabilidad en comparación con t0. Sin embargo, los datos aún permiten la comparación entre diferentes formulaciones.</i> b. <i>El análisis CEX se retrasó, lo que resultó en un mayor contenido de especies ácidas, especialmente para las Formulaciones 8-10.</i>								

Mientras que para la formulación DS (100 mg/ml Fab1, 50 mM Na-Acetato, 125 mM NaCl, pH 5.0) se observó un aumento importante en la agregación de proteínas y especies ácidas después de cuatro semanas a 30 °C,

5 la mayoría de los productos liofilizados demostraron ser estable. Las formulaciones que contienen una proporción más alta de sacarosa:manitol demostraron ser más estables que las formulaciones que contienen una proporción baja de sacarosa:manitol. En particular, la formulación que contenía sólo manitol mostró un aumento importante en la agregación de proteínas y

10 especies ácidas (Tabla 6, formulación 31). Las formulaciones que contienen tampón histidina demostraron ser más estables que el tampón lactato o citrato. Para las formulaciones líquidas, un pH más alto dio como resultado un aumento acelerado de especies ácidas; en particular, las formulaciones de histidina dieron

lugar a más del 50 % de especies ácidas. Esto muestra que la eliminación del agua mediante liofilización es el factor más importante para estabilizar el DP frente a un aumento de especies ácidas.

Como en el ejemplo 1, el tiempo de reconstitución fue el más corto para las formulaciones que comprenden tampón de histidina (Tabla 5).

Considerando tanto el tiempo de reconstitución como los aspectos de estabilidad, la histidina pH 6.0 demostró ser la mejor opción como tampón. La proporción de sacarosa:manitol fue un compromiso entre el tiempo de reconstitución (proporción baja de sacarosa:manitol) y la estabilidad (proporción alta de sacarosa:manitol). La composición óptima de la formulación de liofilización se determinó como histidina 20 mM, pH 6.0, sacarosa al 2.5 %, manitol al 2.5 %, 100 mg/ml de la molécula de anticuerpo. El tiempo de reconstitución para esta formulación fue inferior a 5 minutos (reconstituida con 0.5 ml de agua) y fue estable frente a un aumento de especies ácidas incluso después de 4 semanas a 30 °C.

Ejemplo 3: estudios de optimización adicionales

Una cuestión importante de la molécula es su estabilidad, en particular con respecto a la hidrólisis y la apertura del anillo del conector succinimida PEG, lo que da como resultado un aumento en los niveles de especies ácidas. La hidrólisis del conector depende fuertemente del pH. Al aumentar el pH, la hidrólisis se acelera. La tasa de aumento de especies ácidas se redujo en una formulación secada por congelamiento. Sin embargo, para minimizar la hidrólisis

del conector durante la preparación de la formulación y después de la reconstitución, se recomendó reducir el pH de la formulación secada por congelamiento, así como identificar una posible formulación optimizada adicional. A este respecto, se evaluaron formulaciones adicionales que

5 comprendían glicina en lugar de manitol a diferentes pH (Tabla 7).

Tabla 7. Composición de las formulaciones adicionales.

Formulación	Tampón	Estabilizante	Agente de carga	Surfactante
A1/A2^a	20 mM His pH 6.0	2.5 % suc	1.5 % Gly	0.05 % PS20
B1/B2^a	20 mM His pH 6.0	2.5 % suc	2.0 % Gly	0.05 % PS20
C	20 mM His pH 6.0	2.5 % suc	2.5 % Gly	0.05 % PS20
D	20 mM His pH 6.0	2.5 % suc	2.5 % Gly	Ninguno
E	20 mM Lac pH 4.5	2.5 % suc	2.5 % Gly	Ninguno
F	20 mM His pH 6.0	2.0 % suc	2.0 % Gly	0.05 % PS20
G	20 mM Lac pH 4.5	2.0 % suc	2.0 % Gly	0.05 % PS20
H	20 mM Lac pH 4.5	2.5 % suc	1.5 % Gly	0.05 % PS20

A1 y B1: liofilización con sublimación a -20 °C; A2 y B2: liofilización con sublimación a -5 °C

Tabla 8. Tiempo de reconstitución y concentración de proteína después de la reconstitución (las formulaciones se reconstituyeron hasta un volumen final de 0.5 ml con agua)

Formulación	T ₀		T _{4w, 4 °C}		T _{4w, 40 °C}	
	Tiempo de Recon (min)	Conc (mg/ml)	Tiempo de Recon (min)	Conc (mg/ml)	Tiempo de Recon (min)	Conc (mg/ml)
A1	4.2	111.0	7.1	101.5	4.6	112.5
A2	2.4	103.1	9.7	94.0	11.2	95.6
B1	2.7	98.2	4.4	101.0	2.8	98.4
B2	2.6	100.1	7.9	95.1	9.1	91.4
C	2.6	106.2	7.9	97.6	3.6	100.6
D	2.5	95.9	2.8	95.0	2.6	100.3
E	4.1	110.5	4.9	109.6	6.2	110.0
F	2.5	99.0	3.7	92.1	4.7	95.4
G	5.0	103.1	2.8	94.4	3.9	96.0
H	4.6	97.1	5.2	101.1	7.0	103.1

5

Tabla 9. Agregación y especies ácidas

Formulación	HMWS (%; SE-HPLC)			Especies ácidas (%; CEX)		
	T ₀	T _{4w, 4 °C}	T _{4w, 40 °C}	T ₀	T _{4w, 4 °C}	T _{4w, 40 °C}
DS	0.6	N/A	N/A	9.9	N/A	N/A
A1	0.5	0.6	1.1	9.8	11.1	14.3
A2	0.6	0.6	1.2	11.4	N/A	14.2
B1	0.6	0.6	1.2	10.7	11.1	14.5
B2	0.6	0.6	1.2	11.1	N/A	15.1

Formulación	HMWS (%; SE-HPLC)			Especies ácidas (%; CEX)		
	T ₀	T _{4w, 4 °C}	T _{4w, 40 °C}	T ₀	T _{t4w, 4 °C}	T _{4w, 40 °C}
C	0.7	0.6	1.2	9.9	11.1	14.5
D	0.6	0.6	1.1	13.1	10.9	13.9
E	0.7	0.6	1.7	10.3	10.8	16.8
F	0.6	0.6	1.3	11.1	N/A	16.4
G	0.5	0.5	1.8	10.4	N/A	22.3
H	0.5	0.5	1.3	10.5	N/A	18.7

La humedad residual estuvo entre 1 y 2 % para las formulaciones secadas por congelamiento obtenidas por sublimación a -20 °C y menor o igual al 1 % para las formulaciones secadas por congelamiento por sublimación a -5 °C (datos no mostrados).

Los tiempos de reconstitución fueron inferiores a 10 min o incluso inferiores a 3 min para determinadas formulaciones (Tabla 8). Después de 4 semanas de almacenamiento a 2-8 °C y especialmente después de 4 semanas a 40 °C, los tiempos de reconstitución aumentaron significativamente, especialmente para las formulaciones secadas por congelamiento obtenidas con un ciclo de liofilización con sublimación a -5 °C.

Para las formulaciones que contienen 2.5 % de sacarosa y 2.5 % de glicina, la osmolalidad fue superior a 450 mOsm y el pH de la formulación reconstituida fue de 0.2 a 0.5 superior al pH objetivo (datos no mostrados).

Los niveles de agregación fueron ligeramente superiores para las formulaciones de lactato, especialmente después de 4 semanas a 40 °C (Tabla

9). Además, se observó un aumento importante en los niveles de especies ácidas para las formulaciones de lactato (Tabla 9).

La glicina no cristalizó en formulaciones que contenían solo un 1.5 % de glicina. Pero en formulaciones con 2.0 % de glicina, y especialmente en
5 formulaciones con 2.5 % de glicina, se observó una cristalización parcial de glicina (datos no mostrados). Una temperatura de sublimación más alta no resultó en un mayor contenido de glicina cristalina. La glicina se cristalizó como polimorfo β , que es la forma polimórfica menos estable de glicina.

Se consideró una posible formulación de secado por congelamiento
10 alternativa para la liofilización de 100 mg/ml de Fab1 en 20 mM de histidina a pH 6.0, 2.5% de sacarosa, 2.0% de glicina y 0.05% de Tween20, como alternativa a la formulación de sacarosa/manitol identificada en los Ejemplos 1 y 2. La formulación de secado también mostró buenas propiedades de reconstitución y estabilidad. Sin embargo, la osmolalidad de esta formulación fue mayor que la
15 de la formulación de sacarosa y manitol.

La evaluación de la composición del tampón y el pH del tampón sugirió que un tampón de histidina a pH 5.5 sería la mejor opción para una formulación secada por congelamiento de Fab1.

Ejemplo 4: Estudios de estabilidad a largo plazo

20 Al aumentar el pH, existe el riesgo de acelerar la hidrólisis. Además, en el ejemplo 2 se demostró que el pH tiene un efecto espectacular sobre el aumento de especies ácidas. Además, como se muestra en el Ejemplo 3, en

formulaciones con 2.0 % de glicina, y especialmente en formulaciones con 2.5 % de glicina, se observó una cristalización parcial de glicina. Por lo tanto, todas las formulaciones más preferidas identificadas en los ejemplos anteriores se evaluaron a un pH más bajo, es decir, pH 5.5 en lugar de pH 6.0 (ver Tabla 10).

5 Tabla 10. Composiciones de las formulaciones.

Formulación	Tampón	Estabilizante	Agente de carga	Surfactante
I	20 mM His pH 5.5	2.5 % Suc	2.5 % Man	Ninguno
J	20 mM His pH 5.5	2.5 % Suc	2.5 % Man	0.05 % PS20
K	20 mM His pH 5.5	2.5 % Suc	2.0 % Gly	0.05 % PS20

Los liofilizados aparecieron como una torta aceptable, de color blanco, bien formada y sin defectos (no se muestran imágenes). Después de la reconstitución y hasta 2 meses después del inicio de los estudios de estabilidad,

10 las formulaciones aparecieron como un líquido incoloro, ligeramente opalescente, libre de partículas visibles. Después de la reconstitución, de 6 a 12 meses después del inicio de los estudios de estabilidad, las formulaciones aparecieron como un líquido ligeramente amarillo, ligeramente opalescente, libre de partículas visibles.

15 Tabla 11. Tiempo de reconstitución a lo largo del tiempo

Formulación	T (°C)	T=0M (min)	T=1M (min)	T=2M (min)	T=3M (min)	T=6M (min)	T=9M (min)	T=12M (min)
I	5	5.6	5.9	10.2	4	4		
	25		4.9	9.3	8.5	6.2		
	30		5.1	10.6	6.8	6.1		
	40		8.8	10.6	4.1			
J	5	5.4	12.5	7.6	8.8	5		
	25		17.4	8.8	3.7	6		
	30		12	6.4	11.2	5.4		
	40		5.4	5.1	11.5			
K	5	5.7	4.2	4.3	6.6	5.1	5.2	4.5
	25		4	2.5	6.5	5.3	5.1	5.7
	30		5.5	4.3	7	5.5		
	40		5.9	4.7	5.3			

25 °C/60 % HR; 30 °C/65 % HR y 40 °C/75 % HR

Tabla 12. Agregación (SE-HPLC) a lo largo del tiempo

Formulación	T (°C)	Prel o Agr (%)	T=0 Agr (%)	T=1 M Agr (%)	T=2 M Agr (%)	T=3 M Agr (%)	T=6 M Agr (%)	T=9 M Agr (%)	T=12 M Agr (%)
I	5	0.7	0.9	0.7	0.8	0.7	0.7		
	25			0.8	1	1.3	2.5		
	30			0.9	1.5	2	3.7		
	40			1.3	2.5	2.9			
J	5	0.7	0.8	0.6	0.7	0.6	0.7		
	25			0.8	1.1	1.3	2.4		
	30			0.9	1.5	1.9	3.8		
	40			1.2	2.2	3.1			

K	5	0.7	0.7	0.6	0.6	0.6	0.7	0.7	0.8
	25			0.7	1	1.1	2.2	2.5	3.5
	30			0.8	1.4	1.6	3.3		
	40			1.2	2.2	2.8			

Tabla 13. Especies de bajo peso molecular (SE-HPLC) a lo largo del tiempo

Formulaci ón	T (°C)	Preli o LMW S (%)	T=0 LMW S (%)	T=1 M LMW S (%)	T=2 M LMW S (%)	T=3 M LMW S (%)	T=6 M LMW S (%)	T=9 M LMW S (%)	T=12 M LMW S (%)
I	5	0.0	0.0	0.0	0.6	0.5	0.6		
	25			0.0	1.1	1.3	3.4		
	30			0.0	1.3	2.2	4.9		
	40			0.0	1.8	2.2			
J	5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.5	0.6		
	25			0.0	1.1	1.6	3.5		
	30			0.0	1.4	2.0	5.1		
	40			0.0	1.6	2.8			
K	5	0.0	0.0	0.0	0.4	0.5	0.6	0.1	N.D
	25			0.0	0.8	1.1	2.7	3.1	5.6
	30			0.0	1.1	1.7	3.9		
	40				1.6	2.6			

Tabla 14. Especies ácidas totales a lo largo del tiempo

Formulació n	T (°C)	Preli o (%)	T=0 (%)	T=1 M (%)	T=2 M (%)	T=3 M (%)	T=6 M (%)	T=9 M (%)	T=12 M (%)
-------------------------	------------------------	----------------------------	--------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	---------------------------

I	5	16.7	16. 6	14.7	15	15.4	17		
	25			15.2	16.7	17.1	18.4		
	30			15.6	17.9	19.2	21.8		
	40			18.4	22.5	24.2			
J	5	16.3	16. 1	14.6	15.3	15.7	17.1		
	25			15.4	16.9	17.3	19		
	30			15.6	18.1	18.9	21.5		
	40			18.5	22.5	26.2	0		
K	5	16.4	16. 4	15.1	15.5	16.1	16.6	13.7	14.9
	25			15.7	17.3	18	19.5	17.7	20.1
	30			16.1	18.6	19.8	22		
	40			18.9	23.5	25.1	0		

Tabla 15. Total de especies básicas a lo largo del tiempo

Formulació n	T (°C)	Preli o (%)	T= 0 (%)	T=1 M (%)	T=2 M (%)	T=3 M (%)	T=6 M (%)	T=9 M (%)	T=12 M (%)
I	5	1.5	1.3	4.3	4.9	4.7	0.7		
	25			4.5	5.7	5.3	2.3		
	30			4.2	6.7	6.7	3.7		
	40			5.8	9.6	9.3			
J	5	1.7	1.7	4.7	5	4	0.7		
	25			4.6	6	5.6	2.7		
	30			5.1	7	6.4	4		
	40			6.1	8.5	8.8			

K	5	1.7	1.7	4.3	4.3	3.2	0.8	2.7	4.3
	25			4.7	5.4	4.6	2.5	5.6	11.0
	30			5.1	6	5.7	3.5		
	40			5.9	8	9.3			

Las tres formulaciones se sometieron a un estudio de estabilidad durante seis meses (véanse las Tablas 11-15). En vista de los datos de estabilidad de seis meses, se seleccionó la formulación K y se mantuvo estable durante seis meses más. Sorprendentemente, la formulación seleccionada mostró el tiempo de reconstitución más consistente y más corto, el mejor perfil de estabilidad hacia la agregación (SE-HPLC y DLS) y una buena estabilidad hacia el aumento de especies ácidas (véanse las Tablas 11-15).

La formulación I no se seleccionó debido a un mayor contenido de agregados grandes que las formulaciones J y K que contienen polisorbato (datos no mostrados). No se seleccionó la formulación J debido a la mayor variabilidad en el tiempo de reconstitución en comparación con la formulación K.

REFERENCIAS

1. Chang L, et al., 2005, J. Pharm. Sci. 94:1445-55
2. Carpenter et al., 1997, Pharm. Tres. 14 :969-975
3. Meyer et al., 2009, Eur. J. Pharma Sci, 38:29-38
4. WO2007124090
5. WO2016128318
6. WO2017194646

7. US6372716

8. WO2019096776

9. Chapman, 2002, Advanced Drug Delivery Reviews, 54, 531-545

10. Liu et al., 2005, AAPS Pharm. Sci. Tech., 6 :E150-E157 (Nota interna:

5 Aunque no se menciona en la descripción, es necesario citarlo en el IDS.)

Otros aspectos de la invención:

1. Una composición farmacéutica líquida que comprende:

a. una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG en una concentración de aproximadamente 50 a aproximadamente 200 mg/ml,

10 b. un tampón que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0.

c. de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 % p/v de sacarosa,

d. de aproximadamente 0.5 a aproximadamente 4 % p/v de glicina, y

e. opcionalmente un tensioactivo.

15 2. Una formulación secada por congelamiento obtenida mediante secada por congelamiento de la composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 1.

3. Una formulación secada por congelamiento que comprende:

a. de aproximadamente 50 a aproximadamente 80 % p/p de una molécula
20 Fab-PEG o Fab'-PEG,

b. de aproximadamente 3 a aproximadamente 14 % p/p de un tampón que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0.

- c. de aproximadamente 7 a aproximadamente 30 % p/p de sacarosa,
- d. de aproximadamente 3.5 a aproximadamente 24 % p/p de glicina, y
- e. opcionalmente un tensioactivo.

4. La composición farmacéutica líquida de acuerdo con la reivindicación 1, o la formulación secada por congelamiento de acuerdo con la reivindicación 2 o la reivindicación 3, en la que la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG se deriva de un anticuerpo humano o humanizado.

5. La composición farmacéutica líquida de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 4, o la formulación secada por congelamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en la que la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG se une específicamente a CD40L.

6. La composición farmacéutica líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-5, o la formulación secada por congelamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 5, en la que la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG:

- a. comprende CDR-H1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:1; CDR-H2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:2; CDR-H3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:3; CDR-L1 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:4; CDR-L2 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:5 y CDR-L3 que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO:6; o

b. comprende una región variable ligera que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 7 y una región variable pesada que tiene la secuencia definida en SEQ ID NO: 8; o

5 c. comprende una región variable ligera que tiene al menos un 80 % de identidad, preferiblemente un 90 % de identidad con la secuencia como se define en SEQ ID NO: 7 y una región variable pesada que tiene al menos un 80 % de identidad, preferiblemente un 90 % de identidad con la secuencia como se define en SEQ ID NO: 8.

10 7. La composición farmacéutica líquida o la formulación secada por congelamiento de acuerdo con la reivindicación 6, en la que la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG tiene

a) un grupo maleimida unido covalentemente a un único grupo tiol en la región bisagra modificada; un residuo de lisina está unido covalentemente al grupo maleimida; y

15 b) se une un polímero de metoxipoli(etilenglicol) que tiene un peso molecular de aproximadamente 20 KDa a cada uno de los grupos amina del residuo de lisina.

20 8. La composición farmacéutica líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-7, o la formulación secada por congelamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 7, en la que el tampón es un tampón de histidina.

9. La composición farmacéutica líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-8, o la formulación secada por congelamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en la que la concentración del tampón es de aproximadamente 10 a aproximadamente 50 mM.

5 10. La composición farmacéutica líquida de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-8, o la formulación secada por congelamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 8, en la que el tensioactivo está en una cantidad de aproximadamente 0.01 a aproximadamente 0.2 %.

10 11. La composición farmacéutica líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-10 o la formulación secada por congelamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 10 en la que el tensioactivo opcional es un polisorbato.

15 12. La composición farmacéutica líquida o la formulación secada por congelamiento de acuerdo con la reivindicación 11, en la que el polisorbato es PS20.

13. La composición farmacéutica líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-12, o la formulación secada por congelamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 121, en la que la relación (p/p) de sacarosa:glicina es de o de aproximadamente 2 :3 a aproximadamente 2:1.

20 14. La composición farmacéutica líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-13, en la que la composición farmacéutica comprende aproximadamente 100 mg/ml de la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG,

aproximadamente 20 mM de tampón que mantiene el pH en aproximadamente 5.5, aproximadamente 2.5 % p/v de sacarosa, aproximadamente 2 % p/v de glicina y opcionalmente aproximadamente 0.05 % p/v de PS20.

15 15. La formulación secada por congelamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13, en la que la formulación secada por congelamiento comprende aproximadamente 67 % p/p de una molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, aproximadamente 2.5-2.6 % p/p de un tampón que mantiene el pH entre aproximadamente 5.0 y aproximadamente 7.0, aproximadamente 16.5-16.75 % p/p de sacarosa, aproximadamente 13.3-13.5 % p/p de glicina y
10 opcionalmente aproximadamente 0.3 % p/p de un tensioactivo.

16. Un procedimiento para producir una formulación secada por congelamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13 y 15, que comprende las etapas de:

a. formar una mezcla de la molécula Fab-PEG o Fab'-PEG, junto con el
15 tampón, la sacarosa, la glicina y el tensioactivo opcional para obtener una composición farmacéutica y

b. presentar la mezcla de la etapa a. para secado por congelamiento, y

c. recuperar la formulación secada por congelamiento.

17. Un procedimiento para reconstituir la formulación secada por
20 congelamiento de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13 y 15 a 16 añadiendo un disolvente, en el que el disolvente puede ser agua o un tampón salino.

18. Un artículo de fabricación que comprende un recipiente que comprende la composición farmacéutica líquida de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-14 o la formulación secada por congelamiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 2 a 13 y 15 a 17.