

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 413 090**

51 Int. Cl.:

A61K 9/19 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01)
A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.07.2010 E 10737891 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.05.2013 EP 2459167**

54 Título: **Formulación subcutánea de anticuerpo anti-HER2**

30 Prioridad:

31.07.2009 EP 09167025

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

15.07.2013

73 Titular/es:

F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (100.0%)
Grenzacherstrasse 124
4070 Basel, CH

72 Inventor/es:

ADLER, MICHAEL;
GRAUSCHOPF, ULLA;
MAHLER, HANNS-CHRISTIAN y
STAUCH, OLIVER BORIS

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 413 090 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Formulación subcutánea de anticuerpo anti-HER2

La presente invención se refiere a formulaciones altamente concentradas, fármacos estables de un anticuerpo anti-HER2 farmacéuticamente activo o una mezcla de dichas moléculas de anticuerpo para inyección subcutánea. Dichas formulaciones comprenden, además de altas cantidades de anticuerpo anti-HER2 o mezcla del mismo, un agente tamponador, un estabilizante o una mezcla de dos o más agentes estabilizantes, un tensioactivo no iónico y una cantidad efectiva de al menos una enzima hialuronidasa. La invención también está relacionada con un proceso para la preparación de dicha formulación y a los usos de dicha formulación.

El uso farmacéutico de los anticuerpos ha aumentado con el paso del tiempo. En muchos casos dichos anticuerpos se inyectan vía intravenosa (IV). Desgraciadamente, la cantidad de anticuerpo que puede inyectarse a través de la vía intravenosa está limitada por las propiedades físico químicas del anticuerpo, en particular mediante su solubilidad y estabilidad en una formulación líquida adecuada y mediante el volumen del líquido de infusión. Las rutas alternativas de administración son la inyección subcutánea o intramuscular. Estas vías de inyección requieren altas concentraciones de proteína en la solución final a inyectar [Shire, S.J., Shahrokh, Z. et al., "Challenges in the development of high protein concentration formulations", J. Pharm. Sci. 2004; 93(6): 1390-1402; Roskos, L.K., Davis C.G. et al., "The clinical pharmacology of therapeutic antibodies", Drug Development Research 2004; 61(3): 108-120]. Para poder aumentar el volumen, y por lo tanto la dosis terapéutica, que puede administrarse con comodidad y de forma segura por vía subcutánea, se ha propuesto utilizar enzima(s) glicosaminoglicanasa para aumentar el espacio intersticial en el que la formulación de anticuerpo puede inyectarse [WO2006/091871; US 2006/0104968].

Ejemplos de formulaciones estables de anticuerpos farmacéuticamente activos de uso terapéutico que están en la actualidad en el mercado son las siguientes:

HERCEPTIN™ (Trastuzumab) es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el receptor HER2 (anti HER2) que se comercializa en la actualidad en Europa en forma de un polvo liofilizado de 150 mg (que contiene el anticuerpo, α,α -trehalosa dihidratada, L-histidina y clorhidrato de L-histidina y polisorbato 20) que debe reconstituirse para las infusiones con agua para inyección para proporcionar una dosis de inyección de aproximadamente 21 mg/ml. En los EEUU y muchos otros países se comercializa un vial de dosis múltiples que contiene 440 mg de Trastuzumab.

AVASTIN™ (Bevacizumab) es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) que se comercializa en la actualidad en Europa como una formulación líquida en dos tipos de viales: a) Bevacizumab 100 mg en 4 ml y b) Bevacizumab 400 mg en 16 ml, respectivamente, proporcionando una concentración final de 25 mg/ml en agua para inyección que contiene los siguientes excipientes: trehalosa dihidratada, fosfato sódico y polisorbato 20.

Mientras que las formulaciones de anticuerpo anteriores son adecuadas para su uso en la administración intravenosa existe un deseo de proporcionar formulaciones altamente concentradas, estables de anticuerpos terapéuticamente activos para la inyección subcutánea. La ventaja de las inyecciones subcutáneas es que permiten al médico realizarlas en una intervención más bien corta con el paciente. Además, el paciente puede ser entrenado para realizar por sí mismo la inyección subcutánea. Dicha autoadministración es particularmente útil durante la dosis de mantenimiento debido a que no se necesita cuidado hospitalario (reducción de la utilización de recursos sanitarios). Normalmente las inyecciones mediante la ruta subcutánea están limitadas a aproximadamente 2 ml. Para los pacientes que requieren dosis múltiples, pueden inyectarse varias formulaciones de dosis unitarias en múltiples lugares de la superficie corporal.

Los siguientes dos productos de anticuerpo para la administración subcutánea ya están en el mercado.

HUMIRA™ (Adalimumab) es un anticuerpo monoclonal dirigido contra el factor de necrosis tumoral alfa (TNF alfa) que se comercializa en la actualidad en Europa en forma de una dosis de 40 mg en un volumen de inyección de 0,8 ml para su aplicación subcutánea (concentración: 50 mg anticuerpo /ml de volumen de inyección).

XOLAIR™ (Omalizumab) un anticuerpo monoclonal dirigido contra la inmunoglobulina E (anti IgE) que se comercializa en la actualidad en forma de polvo liofilizado de 150 mg (que contiene el anticuerpo, sacarosa, histidina y clorhidrato de histidina monohidratada y polisorbato 20) que debe reconstituirse con agua para inyección subcutánea para proporcionar una dosis para inyección de 125 mg/ml.

En la actualidad no está disponible en el mercado para su comercialización una formulación adecuada de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrado, estable para la administración subcutánea. Existe por lo tanto un deseo para proporcionar dichas formulaciones altamente concentradas, estables de anticuerpos terapéuticamente activos para la inyección subcutánea.

La inyección de fármacos parenterales en la hipodermis está limitada generalmente a volúmenes inferiores a 2 ml debido a la resistencia viscoelástica a la conductancia hidráulica en el tejido subcutáneo (SC), debido a la

contrapresión generada en la inyección [Aukland K. y Reed R., "Interstitial-Lymphatic Mechanisms in the control of Extracellular Fluid Volume", Physiology Reviews", 1993; 73:1-78], así como por las percepciones de dolor.

La preparación de formulaciones de proteína altamente concentradas es un desafío y existe una necesidad de adaptar cada formulación a las proteínas particulares utilizadas debida que cada proteína posee un comportamiento de agregación diferente. Se sospecha que los agregados provocan inmunogenicidad de proteínas terapéuticas en al menos alguno de los casos. La reacción inmunogénica frente a los agregados de proteína o anticuerpo puede conducir a la neutralización de los anticuerpos que pueden hacer inefectivos la proteína o anticuerpo terapéutico. Parece que la inmunogenicidad de los agregados de proteína es más problemático junto con las inyecciones subcutáneas, mientras que la administración repetida aumenta el riesgo de una respuesta inmune.

Mientras que los anticuerpos poseen una estructura general muy similar, dichos anticuerpos difieren en la composición de aminoácidos (en particular en las regiones CDR responsables de la unión del antígeno) y el patrón de glucosilación. Además puede haber modificaciones postraduccionales como la carga y las variantes de glucosilación. En el caso particular de los anticuerpos anti-HER2 dichas modificaciones postraduccionales se describen por ejemplo para el anticuerpo monoclonal humMAb4D5-8 humanizado (= Trastuzumab). Se han desarrollado métodos particulares de purificación para la eliminación de por ejemplo las variantes ácidas y Basey, C.D y Blank, G.S. en WO99/57134 proporcionaron por primera vez las composiciones que comprenden una cantidad reducida de variantes ácidas (predominantemente variantes desamidadas en las que uno o más residuo(s) de asparagina del polipéptido original se ha convertido en aspartato, es decir, que la cadena lateral de la amida neutral se ha convertido en un residuo con un carácter general ácido).

Las formulaciones de anticuerpo estable liofilizado que comprende un lioprotector, un tampón y un tensioactivo se ha descrito en Andya et al. (WO 97/04801 y las patentes estadounidenses N°. 6.267.958, 6.685.940, 6.821.151 y 7.060.268).

La WO 2006/044908 proporciona formulaciones de anticuerpo, que incluye anticuerpos monoclonales formulados en tampón histidina-acetato, pH 5,5 a 6,5, preferiblemente 5,8 a 6,2.

La US 2007/071675 proporciona proteínas de unión multivalentes y multiespecíficas de ingeniería y composiciones farmacéuticas apropiadas para administración parenteral.

La WO 2008/150949 proporciona anticuerpos humanizados a globulomer A β (20-42) y en particular anticuerpos y porciones de anticuerpo incorporadas a una composición farmacéutica apropiada para administración parenteral.

El problema a resolver por la presente invención es por lo tanto proporcionar nuevas formulaciones farmacéuticas estables altamente concentradas, de un anticuerpo farmacéuticamente activo anti-HER2 o una mezcla de dichas moléculas de anticuerpo para inyección subcutánea. Dichas formulaciones comprenden, además de las altas cantidades de anticuerpo anti-HER2 o mezclas de los mismos, un agente tamponador, un estabilizante o una mezcla de dos o más estabilizantes, un tensioactivo no iónico y una cantidad efectiva de al menos una enzima hialuronidasa. La preparación de formulaciones de anticuerpo altamente concentrado es un reto debido al aumento potencial en la viscosidad a una concentración de proteína superior y un aumento potencial en la agregación de proteína, un fenómeno que es per se dependiente de la concentración. Las altas viscosidades afectan negativamente en la capacidad del proceso (por ejemplo pasos de bombeo y filtración) de las formulaciones de anticuerpo y a la administración (por ejemplo la capacidad de la jeringa). Mediante la adición de excipientes, pueden disminuirse las altas viscosidades en algunos casos. El control y análisis de la agregación de proteína es un reto cada vez mayor. La agregación se encuentra potencialmente durante varios pasos del proceso de fabricación, que incluye fermentación, purificación, formulación y durante el almacenamiento. Diferentes factores, como la temperatura, concentración de proteína, estrés por agitación, congelación y descongelación, efectos del solvente y del tensioactivo, y modificaciones químicas, pueden influir en el comportamiento de la agregación de una proteína terapéutica. Durante el desarrollo de un formulación de anticuerpo altamente concentrada, la tendencia a la agregación de la proteína debe monitorizarse y controlarse mediante la adición de varios excipientes y tensioactivos [Kiese S. et al., J. Pharm. Sci., 2008; 97(10); 4347-4366]. El reto de preparar formulaciones farmacéuticas estables adecuadas altamente concentradas, del anticuerpo anti-HER2 farmacéuticamente activo de acuerdo con la presente invención aumenta por el hecho que dos proteínas diferentes deben formularse en una formulación líquida de forma que la formulación permanezca estable durante varias semanas y los ingredientes farmacéuticamente activos permanezcan activos durante el almacenamiento adecuado.

En un primer aspecto, la presente invención proporciona una formulación farmacéutica estable altamente concentrada, de un anticuerpo farmacéuticamente activo anti-HER2 o una mezcla de dichas moléculas de anticuerpo para inyección subcutánea, que está lista para usar.

Más en particular la formulación farmacéutica estable altamente concentrada, de un anticuerpo farmacéuticamente activo anti-HER2 de la presente invención comprende:

- alrededor de 50 a 350 mg/ml de anticuerpo anti-HER2;

- alrededor de 1 a 100 mM de un agente tamponador que proporciona un pH de $5,5 \pm 2,0$;
- alrededor de 1 a 500 mM de un estabilizante o una mezcla de dos o más estabilizantes, en la que está presente de forma opcional metionina como un estabilizante secundario por ejemplo en una concentración de 5 a 25 mM;
- de un 0,01 a un 0,1 % de un tensioactivo no iónico; y
- una cantidad efectiva de al menos una enzima hialuronidasa.

En otro aspecto el presente invento proporciona el uso de una formulación para la preparación de un medicamento útil para el tratamiento de una enfermedad o trastorno susceptible de tratamiento con un anticuerpo anti-HER2 tal como, por ejemplo cáncer o una enfermedad no maligna en un sujeto que comprende administrar a la formulación aquí descrita a un sujeto en una cantidad efectiva para tratar dicha enfermedad o trastorno. El anticuerpo anti-HER2 puede co-administrarse concomitantemente o secuencialmente con un agente quimioterapéutico.

En otro aspecto el presente invento proporciona métodos para el tratamiento de una enfermedad o trastorno que sea susceptible de tratamiento con un anticuerpo anti-HER2 (por ejemplo cáncer o una enfermedad no maligna) en un sujeto que comprende administrar la formulación aquí descrita a un sujeto en una cantidad efectiva para tratar dicha enfermedad o trastorno. El cáncer o una enfermedad no maligna implicará, generalmente, células que expresen HER2, de modo que el anticuerpo HER2 en la formulación SC farmacéutica terapéutica de conformidad con el presente invento sea apta para unirse a las células afectadas.

El presente invento proporciona también composiciones farmacéuticas constituidas por una formulación farmacéutica estable, altamente concentrada, de un anticuerpo anti-HER2 farmacéuticamente activo o una mezcla de un anticuerpo de esta índole y una cantidad apropiada de por lo menos una enzima hialuronidasa en forma de un kit que comprende los componentes de inyección e instrucciones apropiadas para su administración subcutánea.

Un aspecto adicional del presente invento se refiere a dispositivos de inyección que comprenden una formulación farmacéutica estable, altamente concentrada, de conformidad con el presente invento. Esta formulación puede estar constituida por un anticuerpo anti-HER2 farmacéuticamente activo o una mezcla de moléculas de anticuerpo y excipientes apropiados como se ha indicado antes y pueden comprender, adicionalmente, una glicoproteína de hialuronidasa como una formulación combinada o como una formulación separada para co-administración.

La formulación farmacéutica estable altamente concentrada, de un anticuerpo farmacéuticamente activo anti-HER2 de la presente invención puede proporcionarse en forma líquida o puede proporcionarse en forma liofilizada. De acuerdo con las enseñanzas de WO 97/04801, la concentración de anticuerpo en la formulación reconstituida puede aumentarse mediante la reconstitución de una formulación liofilizada para proporcionar una concentración de proteína en la formulación reconstituida que es de alrededor de 2-40 veces superior que la concentración de proteína en la mezcla antes del paso de liofilización.

La concentración de anticuerpo anti-HER2 es de 100 a 150 mg/ml, por ejemplo de 120 ± 18 mg/ml, alrededor de 110 mg/ml, alrededor de 120 mg/ml o alrededor de 130 mg/ml.

La concentración del agente tamponador que proporciona un pH de $5,5 \pm 2,0$ es de 1 a 50 mM, por ejemplo de 10 a 30 mM o alrededor de 20 mM. Varios agentes tamponadores son conocidos por los expertos en la materia como se indica más adelante. El agente tamponador puede ser un tampón de histidina, por ejemplo L-histidina/HCl. En una realización particular el pH del tampón L-histidina/HCl es de alrededor de 5,5 o alrededor de 6,0.

El estabilizante (se utiliza como sinónimo de "agente estabilizante" en la presente descripción de patente) es por ejemplo un carbohidrato o sacárido o un azúcar admitido por las autoridades como un aditivo adecuado o excipiente en las formulaciones farmacéuticas, por ejemplo α -trehalosa dihidratada o sacarosa. La concentración del estabilizante es de 15 a 250 mM, o 150 a 250 mM, o alrededor de 210 mM. La formulación puede contener un estabilizante secundario, en el que este estabilizante secundario puede ser metionina, por ejemplo, en una concentración de 5 a 25 mM o en una concentración de 5 a 15 mM (por ejemplo metionina en una concentración de alrededor de 5mM, a alrededor de 10 mM o alrededor de 15 mM).

Ejemplos adecuados de tensioactivos farmacéuticamente aceptables incluye ésteres de ácidos grasos de polioxietilen sorbitan (Tween), polietilen polipropilenglicoles, polioxietilen estearatos, éteres de polioxietilen alquilo, por ejemplo éter de polioxietilen monolauril, éteres de alquilfenilpolioxietileno (Triton-X), copolímero de polioxietilen polioxipropilén (Poloxámero, Plurónico), y dodecil sulfato sódico (SDS). Los ésteres de ácidos grasos de polioxietilen sorbitan más adecuados son polisorbato 20, (comercializado bajo la marca comercial de Tween 20™) y polisorbato 80 (comercializado bajo la marca comercial de Tween 80™). Los copolímeros de polietilen polipropileno más adecuados son aquellos comercializados bajo la marca comercial de Pluronic® F68 o Poloxamer 188™. Los éteres de polioxietilen alquilo más adecuados son aquellos comercializados bajo la marca comercial de Brij™. Los éteres de alquilfenilpolioxietileno más adecuados son aquellos comercializados bajo la marca comercial de Triton-X. El tensioactivo no iónico puede ser un polisorbato, seleccionado por ejemplo de entre el grupo de polisorbato 20, polisorbato 80 y copolímeros de polietilen polipropileno. La concentración de un tensioactivo no iónico es de 0,01 a 0,1 % (p/v), o 0,01 a 0,08 % (p/v), o 0,025 a 0,075 % (p/v), o más particularmente alrededor de 0,02, 0,04 o 0,06 %

(p/v).

La concentración de la enzima hialuronidasa depende de la actual enzima hialuronidasa utilizada en la preparación de la formulación de acuerdo con la invención. Una cantidad efectiva de la enzima hialuronidasa puede determinarse fácilmente por el experto en la materia en la descripción de más adelante. Se proporcionará en una cantidad suficiente para que sea posible un aumento en la dispersión y absorción del anticuerpo anti-HER2 coadministrado. La cantidad mínima de la enzima hialuronidasa es de > 150 U/ml. Más particularmente la cantidad efectiva de la enzima hialuronidasa es de alrededor de 1.000 a 16.000 U/ml, en la que dicha cantidad corresponde a alrededor de 0,01 mg a 0,16 mg de proteína basada en una actividad específica asumida de 100.000 U/mg. Alternativamente la concentración de la enzima hialuronidasa es de alrededor de 1.500 a 12.000 U/ml, o más particularmente alrededor de 2.000 U/ml o alrededor de 12.000 U/ml. Las cantidades especificadas hasta aquí corresponden a la cantidad de enzima hialuronidasa inicialmente añadida a la formulación. Como se evidencia en los ejemplos de formulaciones, las concentraciones de enzima hialuronidasa medidas en la formulación final puede variar dentro de cierto rango. Así, por ejemplo la medición actual de la concentración de enzima hialuronidasa (EH) medida justo después de añadir 12.000 U/ml de enzima mostró variaciones entre 12.355 U/ml a 15.178 U/ml (véase Tablas 1 Formulación A a F y Tabla 3 Formulación H). La enzima hialuronidasa está presente como una formulación final combinada o para utilizar para la coadministración, por ejemplo como una coformulación como se describe más adelante. La cuestión importante para la formulación de acuerdo con la presente invención es que a la vez está lista para utilizar y/o se inyecta, posee la composición según lo establecido en las reivindicaciones adjuntadas. La proporción (p/p) de la enzima hialuronidasa respecto al anticuerpo anti-HER2 está en el rango de 1 : 1.000 a 1 : 8.000, o en el rango de 1 : 4.000 a 1 : 5.000 o alrededor de 1 : 6.000.

La enzima hialuronidasa puede derivar de muestras de animales, muestras humanas o fabricada según la tecnología de DNA recombinante como se describe más adelante.

En alguna realización las formulaciones farmacéuticas altamente concentradas, estables de anticuerpo anti-HER2 de acuerdo con la presente invención presentan una de las siguientes composiciones:

a) 100 a 150 mg/ml de anticuerpo anti-HER2, por ejemplo seleccionado de entre el grupo de Trastuzumab, Pertuzumab y T-DM1; 1 a 50 mM de un tampón histidina, por ejemplo L-histidina / HCl a un pH de alrededor de 5,5; 15 a 250 mM de un estabilizante que es por ejemplo α,α -trehalosa dihidratada, y opcionalmente metionina como un segundo estabilizante a una concentración de 5 a 25 mM; alrededor de 0,01 a 0,08 % de un tensioactivo no iónico; y >150 a 16.000 U/ml, más particularmente de 1.000 a 16.000 U/ml de una enzima hialuronidasa como por ejemplo rHuPH20, por ejemplo a una concentración de alrededor de 2.000 U/ml o alrededor de 12.000 U/ml.

b) 120 $\pm$ 18 mg/ml de anticuerpo anti-HER2, por ejemplo seleccionado de entre el grupo de Trastuzumab, Pertuzumab y T-DM1; 10 a 30 mM, o alrededor de 20 mM de un tampón histidina como por ejemplo L-histidina / HCl a un pH de alrededor de 5,5; 150 a 250 mM o alrededor de 210 mM de un estabilizante, que es por ejemplo α,α -trehalosa dihidratada, y opcionalmente metionina como segundo estabilizante a una concentración de 5 a 25 mM, o 5 a 15 mM, o alrededor de 10 mM; alrededor de 0,01 a 0,08 % de un tensioactivo no iónico; y 1.000 a 16.000 U/ml, o 1.500 a 12.000 U/ml, alrededor de 2.000 U/ml o alrededor de 12.000 U/ml de una enzima hialuronidasa como por ejemplo rHuPH20.

c) Alrededor de 120 mg/ml de anticuerpo anti-HER2, por ejemplo seleccionado de entre el grupo de Trastuzumab, Pertuzumab y T-DM1; 10 a 30 mM, o alrededor de 20 mM de un tampón histidina, como por ejemplo L-histidina / HCl a un pH de alrededor de 5,5; 150 a 250 mM, por ejemplo alrededor de 210 mM de un estabilizante, que es por ejemplo α,α -trehalosa dihidratada, y opcionalmente metionina como un segundo estabilizante a una concentración de 5 a 25 mM, o 5 a 15 mM, o alrededor de 10 mM; alrededor de 0,01 a 0,08 % de un tensioactivo no iónico; y 1.000 a 16.000 U/ml, o 1.500 a 12.000 U/ml, o más particularmente alrededor de 2.000 U/ml o alrededor de 12.000 U/ml de una enzima hialuronidasa como por ejemplo rHuPH20.

d) Alrededor de 120 mg/ml de anticuerpo anti-HER2, por ejemplo seleccionado de entre el grupo de Trastuzumab, Pertuzumab y T-DM1; alrededor de 20 mM de un tampón histidina como por ejemplo L-histidina / HCl a un pH de alrededor de 5,5; alrededor de 210 mM de α,α -trehalosa dihidratada, y opcionalmente alrededor de 10 mM de metionina como segundo estabilizante; 0,04 o 0,06 % de polisorbato 20; y alrededor de 12.000 U/ml de una enzima hialuronidasa como rHuPH20; y particularmente la Formulación A especificada más adelante.

e) Alrededor de 120 mg/ml de anticuerpo anti-HER2, por ejemplo seleccionado de entre el grupo de Trastuzumab, Pertuzumab y T-DM1; alrededor de 20 mM de un tampón histidina como por ejemplo L-histidina / HCl a un pH de alrededor de 5,5; alrededor de 210 mM de α,α -trehalosa dihidratada, y opcionalmente 10 mM de metionina como segundo estabilizante; 0,04 o 0,06 % de polisorbato 20; y alrededor de 2.000 U/ml de una enzima hialuronidasa como rHuPH20; y particularmente la Formulación X especificada más adelante.

f) Una formulación liofilizada que comprende 120 mg/ml de anticuerpo anti-HER2, por ejemplo seleccionado de entre el grupo de Trastuzumab, Pertuzumab y T-DM1; 20 mM de un tampón histidina como por ejemplo L-histidina / HCl a un pH de alrededor de 5,5; 210 mM de α,α -trehalosa dihidratada y opcionalmente 10 mM de metionina como segundo estabilizante; alrededor de 0,04 a 0,06 % de un tensioactivo no iónico; y particularmente la Formulación Y especificada más adelante. Estas formulaciones pueden reconstituirse con 1.000 a 16.000 U/ml, o 1.500 a 12.000 U/ml, o más particularmente alrededor de 2.000 U/ml o alrededor de 12.000 U/ml de una enzima hialuronidasa como por ejemplo rHuPH20.

En otra realización las formulaciones farmacéuticas altamente concentradas, estables de anticuerpo anti-HER2 de acuerdo con la presente invención poseen una de las composiciones especificadas en la Tabla 1, 3 y 4, en la que las formulaciones C, D, E y F son menos preferibles debido a las propiedades menos deseables descritas en los Ejemplos y en la Tabla 1 anexada.

Se ha propuesto facilitar la inyección subcutánea de proteínas terapéuticas y anticuerpos utilizando pequeñas cantidades de glicoproteínas solubles de hialuronidasa (sHASEGPs); véase WO2006/091871. Se ha observado que la adición de dichas glicoproteínas solubles de hialuronidasa (como una formulación combinada o mediante coadministración) facilita la administración del fármaco terapéutico en la hipodermis. La despolimerización rápida de hialuronano HA en el espacio extracelular, la sHASEGP reduce la viscosidad del intersticio, aumentando así la conductancia hidráulica y permitiendo la administración de mayores volúmenes de forma segura y confortable en el tejido subcutáneo. El aumento de la conductancia hidráulica inducida por el sHASEGP a través de la viscosidad intersticial reducida permite una mayor dispersión, aumentando de forma potencial la biodisponibilidad sistémica del fármaco terapéutico administrado por vía SC.

Las formulaciones farmacéuticas altamente concentradas, estables de la presente invención que comprende una glicoproteína soluble de hialuronidasa son por lo tanto particularmente adecuados para la inyección subcutánea. El experto en la materia entiende claramente que dicha formulación que comprende un anticuerpo anti-HER2 y una glicoproteína soluble de hialuronidasa puede proporcionarse para la administración en forma de una formulación única combinada o alternativamente en forma de dos formulaciones separadas que pueden mezclarse justo antes de la inyección subcutánea. Alternativamente el anticuerpo anti-HER2 y la glicoproteína soluble de hialuronidasa puede administrarse como inyecciones separadas en diferentes lugares del cuerpo, preferiblemente en los lugares que están inmediatamente adyacentes el uno del otro. Es también posible inyectar los agentes terapéuticos presentes en la formulación de acuerdo con la presente invención como inyecciones consecutivas, por ejemplo primero la glicoproteína soluble de hialuronidasa seguida de la inyección de la formulación de anticuerpo anti-HER2. Estas inyecciones pueden también realizarse en el orden inverso, inyectando primero la formulación de anticuerpo anti-HER2 seguido de la inyección de la de la glicoproteína soluble de hialuronidasa. En el caso de que el anticuerpo anti-HER2 y la glicoproteína soluble de hialuronidasa se administren como inyecciones separadas, una o ambas de las proteínas deben proporcionarse con el agente tamponador, el(los) estabilizante(s) y el tensioactivo no iónico en las concentraciones como se especifica en las reivindicaciones anexadas pero excluyendo la enzima hialuronidasa. La enzima hialuronidasa puede proporcionarse entonces por ejemplo en un tampón L-histidina / HCl a un pH de alrededor de 6,5, 100 a 150 mM de NaCl y 0,01 a 0,1 % (p/v) de polisorbato 20 o polisorbato 80. En particular la enzima hialuronidasa se proporciona en tampón 20 mM de L-histidina / HCl a un pH de 6,5, 130 mM de NaCl, 0,05 % (p/v) de polisorbato 80 como se ejemplifica específicamente en la Formulación G de la Tabla 1 de más adelante.

Tal como se ha dicho antes, la glicoproteína soluble de hialuronidasa puede considerarse como un excipiente adicional en la formulación anti-HER2. La glicoproteína soluble de hialuronidasa puede añadirse a la formulación anti-HER2 en el momento de la fabricación de la formulación anti-HER2 o puede añadirse justo antes de la inyección. Alternativamente la glicoproteína soluble de hialuronidasa puede proporcionarse como una inyección separada. En el último caso la glicoproteína soluble de hialuronidasa puede proporcionarse en un vial separado en forma liofilizada que debe reconstituirse con diluyentes adecuados antes de realizar la inyección subcutánea, o puede proporcionarse como una formulación líquida por el fabricante. La formulación anti-HER2 y la glicoproteína soluble de hialuronidasa pueden procurarse como entidades separadas o pueden también proporcionarse como equipos que comprenden ambos componentes de inyección e instrucciones adecuadas para su administración subcutánea. Las instrucciones adecuadas para la reconstitución y / o administración de una o ambas formulaciones puede también proporcionarse.

Por lo tanto la presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas que consisten en una formulación farmacéutica estable altamente concentrada, de un anticuerpo farmacéuticamente activo anti-HER2 o una mezcla de dicho anticuerpo y una cantidad adecuada de al menos una enzima hialuronidasa en forma de un equipo que comprende ambos componentes inyectables e instrucciones adecuadas para su administración subcutánea.

Otro aspecto de la presente invención está relacionado con los dispositivos de inyección que comprende una formulación farmacéutica estable altamente concentrada, de acuerdo con la presente invención. Dicha formulación puede consistir en un anticuerpo anti-HER2 farmacéuticamente activo o una mezcla de dichas moléculas de anticuerpo y excipientes adecuados como se describe más adelante y puede comprender además una glicoproteína soluble de hialuronidasa como una formulación combinada o como una formulación separada para la coadministración.

Se conoce una variedad de anticuerpos anti-HER2 en el estado anterior de la técnica. Dichos anticuerpos son preferiblemente anticuerpos monoclonales. También se denominan anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados o anticuerpos totalmente humanos. También pueden ser anticuerpo anti-HER2 de longitud completa; fragmentos de anticuerpo anti-HER2 con la misma actividad biológica; que incluye variantes de secuencia de aminoácidos y / o variantes de glicosilación de dichos anticuerpos o fragmentos. Ejemplos de anticuerpos anti-HER2 humanizados se conocen bajo los nombres INN Trastuzumab y Pertuzumab. Otro anticuerpo anti-HER2 adecuado

es T-DM1, que es un conjugado de anticuerpo-toxina que consiste de huMAb4D5-8 (HERCEPTIN) y un maitansinoide (a saber, DM1 = N²-deacetil-N^{2'}-(3-mercapto-1-oxopropil)-maitansina; un agente antimicrotúbulos altamente potente) que conjugado (con un enlazante MCC) que está actualmente en desarrollo para el cáncer de mama metastásico. Se han descrito otros anticuerpos HER2 con varias propiedades en Tagliabue et al., Int. J. Cancer, 47:933-937 (1991); McKenzie et al., Oncogene, 4:543-548 (1989); Cancer Res., 51:5361-5369 (1991); Bacus et al., Molecular Carcinogenesis, 3:350-362 (1990); Stancovski et al., PNAS (USA), 88:8691-8695 (1991); Bacus et al., Cancer Research, 52:2580-2589 (1992); Xu et al., Int. J. Cancer, 53:401-408 (1993); WO94/00136; Kasprzyk et al., Cancer Research, 52:2771-2776 (1992); Hancock et al., Cancer Res., 51:4575-4580 (1991); Shawver et al., Cancer Res., 54:1367-1373 (1994); Arteaga et al., Cancer Res., 54:3758-3765 (1994); Harwerth et al., J. Biol. Chem., 267:15160-15167 (1992); Patente estadounidense N° 5.783.186; y Klapper et al., Oncogene, 14:2099-2109 (1997). El anticuerpo terapéutico anti-HER2 con más éxito es el Trastuzumab comercializado por Genentech Inc. y F. Hoffmann-La Roche Ltd bajo el nombre comercial de HERCEPIN™. Más detalles sobre el antígeno HER2 y los anticuerpos dirigidos contra ellos se describen en muchas publicaciones de patente y no patentes (para una revisión adecuada véase Patente estadounidense N° 5.821.337 y WO 2006/044908).

El anticuerpo anti-HER2 se selecciona por ejemplo de entre el grupo de Trastuzumab, Pertuzumab y T-DM1 y puede también consistir en una mezcla de anticuerpos anti-HER2 como por ejemplo Trastuzumab y Pertuzumab o T-DM1 y Pertuzumab. Se ha encontrado que la combinación de Pertuzumab y Trastuzumab es activa y bien tolerada en pacientes con cáncer de mama metastásico HER2-positivo que han sufrido una progresión antes de la terapia con trastuzumab [véase por ejemplo Baselga, J. et al., Journal of Clin. Oncol. Vol 28 (7) 2010: pp. 1138-1144]. La formulación de acuerdo con la presente invención se ejemplifica aquí con el anticuerpo anti-HER2 Trastuzumab. Los términos "Trastuzumab", "Pertuzumab" y "T-DM1" abarcan todos los correspondientes anticuerpos anti-HER2 que cumplen todos los requisitos necesarios para obtener una autorización de comercialización como un producto idéntico o biosimilar en un país o territorio seleccionado de entre el grupo de países que consisten en los Estados Unidos, Europa y Japón. Trastuzumab posee las regiones CDR definidas en la PE-B-590058. Pertuzumab posee las regiones CDR definidas en la WO 01/00245. La actividad de Trastuzumab en el ensayo de antiproliferación de BT-474 [Nahta, R. et al., "The HER-2-targeting antibodies Trastuzumab and Pertuzumab synergistically inhibit the survival of breast cancer cells", Cancer Res. 2004; 64:2343,2346] se ha encontrado que está entre 0,7 – 1,3 x 10⁴ U/mg. El T-DM1 se describe en la WO 2005/117986.

HERCEPIN™ (Trastuzumab) se ha aprobado en la UE para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama metastásico (CMM) que presenta tumores que sobreexpresa HER2 como sigue:

- Como monoterapia para el tratamiento de pacientes que han recibido al menos dos regímenes de quimioterapia para su enfermedad metastásica. Antes de la quimioterapia debe haberse incluido al menos una antraciclina y un taxano a no ser que los pacientes sean inadecuados para estos tratamientos. Los pacientes positivos para el receptor hormonal deben también haber fracasado en la terapia hormonal, a no ser que los pacientes sean inadecuados para estos tratamientos.

- En combinación con paclitaxel para el tratamiento de estos pacientes que no han recibido quimioterapia para su enfermedad metastásica y para los que no es adecuada una antraciclina.

- En combinación con docetaxel para el tratamiento de estos pacientes que no han recibido quimioterapia para su enfermedad metastásica.

- En combinación con un inhibidor de aromatasa para el tratamiento de pacientes postmenopáusicas no tratadas previamente con Trastuzumab para el CMM positivo para el receptor hormonal.

Trastuzumab también se ha aprobado en la UE para el tratamiento de pacientes con CMM que poseen tumores que sobreexpresan HER2 para el tratamiento de pacientes con cáncer de mama de estadio temprano HER2- positivo (CMT) seguido de cirugía, quimioterapia (neoadyuvante o adyuvante) y radioterapia (si es aplicable).

Además el Trastuzumab se está desarrollando en la actualidad para el tratamiento de cáncer gástrico.

Los regímenes de dosificación están aprobados en la actualidad para Trastuzumab (Tabla 1); una vez a la semana (q1w) y cada 3 semanas (q3w) para ambos cáncer de mama metastásico (CMM) y cáncer de mama temprano (CMT). En el régimen de dosis q1w la dosis de carga es de 4 mg/kg seguida de una dosis a 2 mg/kg. En el régimen de dosis q3w la dosis de carga es de 8 mg/kg seguida de una dosis posterior a 6 mg/kg.

Como se ha dicho antes, HERCEPIN™ (Trastuzumab) para la administración intravenosa se comercializa en la actualidad en forma liofilizada en viales. En la formulación comercializada en Europa cada vial contiene el residuo seco obtenido tras la liofilización de un volumen de relleno de 6,25 ml de una solución acuosa estéril que contiene los siguientes componentes: 150 mg de Trastuzumab (156,3 mg efectivos para asegurar que la cantidad nominal de 150 mg puede obtenerse del producto final tras la reconstitución), 3,50 mg de clorhidrato de L-histidina, 2,25 mg de L-histidina, 141,9 mg de α,α-trehalosa dihidratada, 0,63 mg de Polisorbato 20. El liofilizado disuelto contiene alrededor de 24 mg/ml de Trastuzumab, 5 mM L-histidina/HCl pH 6,0, 60 mM de α,α-trehalosa dihidratada, 0,01% de

polisorbato 20. La solución se añade entonces a la solución de infusión y después la infusión se administra a el paciente durante 90 minutos (las infusiones posteriores pueden administrarse durante 30 minutos en el CMM, si se tolera bien).

- 5 Se conoce un número de glicoproteína soluble de hialuronidasa en el estado de la técnica. Para poder definir mejor la función, el mecanismo de acción y las propiedades de dichas glicoproteínas solubles de hialuronidasa, se proporciona la siguiente información de fondo.

10 La matriz SC (hipodérmica) intersticial está comprendida por una red de proteínas fibrosas incrustadas dentro de un gel viscoelástico de glicosaminoglicanos. El hialuronano (HA), que es un disacárido lineal repetido no sulfatado, es el glicosaminoglicano más destacado del tejido SC. El HA se secreta en el intersticio o los fibroblastos como un polímero viscoso de alto peso molecular, que se degrada posteriormente de forma local, en la linfa, y en el hígado, a través de la acción de las hialuronidasas y exoglicosidasas lisosomales. Aproximadamente el 50% del hialuronano en el cuerpo se produce por el tejido SC, que se encuentra aproximadamente a 0,8 mg/gm peso húmedo de tejido
15 [Aukland K. y Reed R., supra]. Se estima que un adulto medio de 70 kg contiene 15 gramos de HA, del que el 30 por ciento se renueva (sintetiza y degrada) cada día [Laurent L.B., et al., "Catabolism of hyaluronan in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver", Exp. Physiol. 1991; 76: 695-703]. Como principal constituyente del componente similar a un gel de la matriz hipodérmica, el HA contribuye significativamente a su viscosidad.

20 Los glicosaminoglicanos (GAG) son polisacáridos lineales complejos de la matriz extracelular (MEC). Los GAG se caracterizan por repetir las estructuras de disacáridos de una hexosamina N-sustituida y un ácido urónico (en el caso de hialuronano (HA), condroitin sulfato (CS), condroitin (C), dermatan sulfato (DS), heparan sulfato (HS), y heparina (H)), o una galactosa (en el caso de queratan sulfato (KS)). Excepto para el HA, todos existen unidos covalentemente a las proteínas principales. Los GAG con sus proteínas principales se refieren estructuralmente
25 como proteoglicanos (PG).

El hialuronano (HA) se encuentra en los mamíferos predominantemente en los tejidos conectivos, piel, cartílago, y el líquido sinovial. El hialuronano es también el constituyente principal del vítreo del ojo. En el tejido conectivo, el agua de hidratación asociada con el hialuronano crea matrices hidratadas entre tejidos. El hialuronano juega un papel clave en el fenómeno biológico asociado con la motilidad celular que incluye un desarrollo rápido, regeneración, reparación, embriogénesis, desarrollo embrionario, curación de heridas, angiogénesis, y tumorigénesis (Toole, Cell Biol. Extracell. Matrix, Hay (ed), Plenum Press, New York, 1991; pp. 1384-1386; Bertrand et al., Int. J. Cancer 1992; 52:1-6; Knudson et al., FASEB J. 1993; 7:1233-1241]. Además, los niveles de hialuronano se correlacionan con la agresividad del tumor [Ozello et al., Cancer Res. 1960; 20:600-604; Takeuchi et al., Cancer Res. 1976; 36:2133-2139; Kimata et al., Cancer Res. 1983; 43:1347-1354].
30

El HA se encuentra en la matriz extracelular de muchas células, especialmente en los tejidos conectivos blandos. Al HA se le ha asignado varias funciones fisiológicas, como es la homeóstasis de proteínas en agua y plasma [Laurent T.C. et al., FASEB J., 1992; 6: 2397-2404]. La producción de HA aumenta en las células en proliferación y puede tener un papel importante en la mitosis. También se ha visto implicado en la locomoción y migración celular. El HA parece tener papeles importantes en la regulación, desarrollo y diferenciación celular [Laurent et al., supra].
40

La HA se ha utilizado ampliamente en la medicina clínica. Sus propiedades protectoras de tejido y rheológicas son útiles en la cirugía oftálmica (por ejemplo para proteger el endotelio de la córnea durante la cirugía de cataratas). El HA en suero es diagnóstico de enfermedad hepática y varias condiciones inflamatorias, como la artritis reumatoide. El edema intersticial provocado por la acumulación de HA puede provocar la disfunción en varios órganos [Laurent et al., supra].
45

Las interacciones de proteína de hialuronano también están implicadas en la estructura de la matriz extracelular "sustancia fundamental".
50

Las hialuronidasas son un grupo de enzimas generalmente activas neutrales o ácidas encontradas a lo largo del reino animal. Las hialuronidasas varían respecto a la especificidad de sustrato, y los mecanismos de acción (WO 2004/078140). Existen tres clases generales de hialuronidasas:
55

1. Hialuronidasas de tipo mamífero, (EC 3,2,1,35) que son endo-beta-N- acetilhexosaminidasas con tetrasacáridos y hexasacáridos como los productos finales principales. Ambos presentan actividades hidrolíticas y transglicosidasa, y pueden degradar hialuronano y condroitin sulfatos (CS), generalmente C4-S y C6-S.

60 2. Hialuronidasas bacterianas (EC 4,2,99,1) que degradan hialuronano y, hasta cierto grado, CS y DS. Son endo-beta-N-acetilhexosaminidasas que actúan mediante una reacción de beta eliminación que produce principalmente disacáridos como productos finales.

65 3. Hialuronidasas (EC 3,2,1,36) de sanguijuelas, otros parásitos, y crustáceos que son endo-beta-glucuronidasas que generan tetrasacáridos y hexasacáridos como productos finales a través de hidrólisis del enlace beta 1-3.

Las hialuronidasas de mamíferos pueden dividirse además en dos grupos: enzimas activas neutrales o ácidas. Existen seis genes similares a la hialuronidasa en el genoma humano, HYALI, HYAL2, HYAL3, HYAL4, HYALPI y PH20/SPAM1. HYALPI es un pseudogen, y HYAL3 no se ha visto que posea actividad enzimática hacia ningún sustrato conocido. HYAL4 es una condroitinasa y presenta cierta actividad hacia hialuronano. HYALI es el enzima prototípico activo ácido y PH20 es el enzima prototípico activo neutral. Las hialuronidasas activas ácidas, como HYALI y HYAL2 generalmente carecen de actividad catalítica a un pH neutro (es decir, pH 7). por ejemplo, HYALI posee cierta actividad catalítica in vitro por encima de pH 4,5 [Frost I.G. y Stern, R., "A microtiter-based assay for hyaluronidase activity not requiring specialized reagents", *Anal. Biochemistry*, 1997; 251:263-269]. HYAL2 es una enzima activa ácida con una actividad específica in vitro muy baja.

Las enzimas similares a hialuronidasa pueden también caracterizarse por aquellos que generalmente están anclados a la membrana mediante un anclaje de glicosilfosfatidil inositol como el HYAL2 humano y PH20 humano [Danilkovitch-Miagkova et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U SA*, 2003; 100(8):4580-4585; Phelps et al., *Science* 1988; 240(4860): 1780-1782], y aquellos que generalmente son solubles como el HYALI humano [Frost, I.G. et al., "Purification, cloning, and expression of human plasma hyaluronidase", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 236(1):10-15]. No obstante, existen variaciones entre especies: por ejemplo el PH20 bovino se une de forma muy débil a la membrana plasmática y no se ancla a través de un enlace sensible a fosfolipasa [Lalancette et al., *Biol. Reprod.*, 2001; 65(2):628- 36]. Esta característica única de la hialuronidasa bovina ha permitido el uso de enzima hialuronidasa soluble de testículo bovino como un extracto para uso clínico (Wydase™, Hyalase™). Otras especies de PH20 son enzimas ancladas a lípidos que generalmente no son solubles sin el uso de detergentes o lipasas. Por ejemplo, la PH20 humana se ancla a la membrana plasmática a través de un ancla de GPI. Los intentos de construir DNA de PH20 humano que no tenga un anclaje lipídico en el polipéptido resultó en un enzima catalíticamente inactivo, o un enzima insoluble [Arming et al., *Eur. J. Biochem.*, 1997; 247(3):810-4]. La hialuronidasa de esperma de macaco natural se encuentra en las dos formas solubles y unido a membrana. Mientras que la forma unida a membrana de 64 kDa posee actividad enzimática a pH 7,0, la forma de 54 kDa es sólo activa a pH 4,0 [Cherr et al., *Dev. Biol.*, 1996;10; 175(1): 142-53]. Así, las formas solubles de PH20 a menudo carecen de actividad enzimática en condiciones neutrales.

Como se ha dicho antes y de acuerdo con las enseñanzas en WO2006/091871, pequeñas cantidades de glicoproteínas solubles de hialuronidasa (sHASEGPs) pueden introducirse en una formulación para facilitar la administración de fármaco terapéutico en la hipodermis. La rápida despolimerización de HA en el espacio extracelular las sHASEGP reducen la viscosidad del intersticio, aumentando así la conductancia hidráulica y permitiendo la administración de mayores volúmenes de forma segura y confortable en el tejido SC. El aumento de la conductancia hidráulica inducida por sHASEGP a través de la reducción de la viscosidad intersticial permite una mayor dispersión, aumentando potencialmente la biodisponibilidad sistémica del fármaco terapéutico administrado SC.

Cuando se inyecta en la hipodermis, la despolimerización del HA por el sHASEGP se localiza en el sitio de la inyección en el tejido SC. La evidencia experimental muestra que el sHASEGP está inactivado localmente en el espacio intersticial con una vida media de 13 a 20 minutos en ratones, sin una absorción sistémica detectable en la sangre tras la dosis única intravenosa en ratones CD-1. Dentro del compartimiento vascular, sHASEGP demuestra una vida media de 2,3 y 5 minutos en ratones y monos *Cynomolgus*, respectivamente, con dosis de hasta 0,5 mg/kg. La eliminación rápida de sHASEGP, combinada con la síntesis continua del sustrato HA en el tejido SC, resulta en un aumento transitorio de la permeación y localmente activa para otras moléculas coinyectadas, cuyos efectos son totalmente reversibles en las 24 a 48 horas tras la administración [Bywaters G.L., et al., "Reconstitution of the dermal barrier to dye spread after Hyaluronidase injection", *Br. Med. J.*, 1951; 2 (4741): 1178-1183].

Además de sus efectos sobre la dispersión de fluido local, sHASEGP también actúa como potenciador de la absorción. Las macromoléculas mayores de 16 kilodaltons (kDa) se excluyen en gran medida de la absorción a través de los capilares mediante la difusión y se absorben mayoritariamente mediante el drenaje en los nódulos linfáticos. Una macromolécula administrada por vía subcutánea como por ejemplo un anticuerpo terapéutico (peso molecular de aproximadamente 150 kDa) debe por lo tanto atravesar la matriz intersticial antes de alcanzar el drenaje linfático para una posterior absorción en el compartimiento vascular. Aumentando la dispersión local, sHASEGP aumenta la tasa (K_a) de absorción de muchas macromoléculas. Esto conduce a un aumento del pico de niveles en sangre (C_{max}) y potencialmente a un aumento de la biodisponibilidad relativa a la administración SC en ausencia de sHASEGP [Bookbinder L.H., et al., "A recombinant human enzyme for enhanced interstitial transport of therapeutics", *J. Control. Release* 2006; 114: 230-241].

Los productos de hialuronidasa de origen animal se ha utilizado clínicamente durante los últimos 60 años, principalmente para aumentar la dispersión y la absorción de otros fármacos coadministrados y para la hipodermoclisis (inyección/infusión SC de líquido en gran volumen) [Frost G.I., "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", *Expert Opinion on Drug Delivery*, 2007; 4: 427-440]. Los detalles sobre el mecanismo de acción las hialuronidasas se ha descrito en detalle en las siguientes publicaciones: Duran-Reynolds F., "A spreading factor in certain snake venoms and its relation to their mode of action", *CR Soc Biol Paris*, 1938; 69-81; Chain E., "A mucolytic enzyme in testes extracts", *Nature* 1939; 977-978; Weissmann B., "The transglycosylative action of testicular hyaluronidase", *J. Biol. Chem.*, 1955; 216: 783-94;

Tammi, R., Saamanen, A.M., Maibach, H.I., Tammi M., "Degradation of newly synthesized high molecular mass hialuronane in the epidermal and dermal compartments of human skin in organ culture", J. Invest. Dermatol. 1991; 97:126-130; Laurent, U.B.G., Dahl, L.B., Reed, R.K., "Catabolism of hialuronane in rabbit skin takes place locally, in lymph nodes and liver", Exp. Physiol. 1991; 76: 695-703; Laurent, T.C. y Fraser, J.R.E., "Degradation of Bioactive Substances: Physiology and Pathophysiology", Henriksen, J.H. (Ed) CRC Press, Boca Raton, FL; 1991. pp. 249-265; Harris, E.N., et al., "Endocytic function, glicosaminoglican specificity, and antibody sensitivity of the recombinant human 190-kDa hialuronane receptor for endocytosis (HARE)", J. Biol. Chem. 2004; 279:36201-36209; Frost, G.I., "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4: 427-440. Los productos de hialuronidasa aprobados en los países de la UE incluye Hylase® "Dessau" e Hyalase®. Los productos de hialuronidasa de origen animal aprobados en los EEUU incluye Vitrase™, Hydase™, y Amphadase™.

La seguridad y eficacia de los productos de hialuronidasa se han establecido ampliamente. El riesgo de seguridad más significativo identificado es la hipersensibilidad y/o alergenidad, que se cree que está relacionado con la falta de pureza de las preparaciones derivadas del animal [Frost, G.I., "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4 : 427-440]. Cabe señalar que existen diferencias respecto a las dosis aprobadas de las hialuronidasas derivadas de animales entre Reino Unido, Alemania y los EEUU. En el Reino Unido, la dosis normal como adyuvante a la inyección subcutánea o intramuscular es de 1500 unidades, añadidas directamente a la inyección. En los EEUU, la dosis normal utilizada para este propósito es de 150 unidades. En la hipodermoclis, se utiliza la hialuronidasa para ayudar a la administración subcutánea de relativamente grandes volúmenes de líquidos. En el Reino Unido, se administran normalmente 1500 unidades de hialuronidasa con cada 500 a 1000 ml de fluido para uso subcutáneo. En los EEUU, se consideran adecuadas 150 unidades por cada litro de solución de hipodermoclis. En Alemania, se consideran adecuadas 150 a 300 unidades para este propósito. En el Reino Unido, la difusión de anestesia local se ve acelerada por la adición de 1500 unidades. En Alemania y los EEUU se consideran adecuadas 150 unidades para este propósito. Se ha descrito a pesar de las diferencias en las dosis (la dosis en el Reino Unido es diez veces mayor que en los EEUU), no hay diferencias aparentes en los perfiles de seguridad de los productos de hialuronidasa derivados de animales comercializados en los EEUU y Reino Unido, respectivamente.

El 2 de diciembre de 2005, Halozyne Therapeutics Inc. recibió la aprobación de la FDA para una formulación inyectable de la hialuronidasa humana recombinante, rHuPH20 (HYLENEX™). La FDA aprobó HYLENEX™ a una dosis de 150 unidades para administración SC de las siguientes indicaciones:

- como adyuvante para aumentar la absorción y dispersión de otros fármacos inyectados
- para la hipodermoclis
- como adyuvante para la urografía SC para mejorar la resorción de agentes radiopacos.

Como parte de esta revisión regulatoria se estableció que rHuPH20 posee las mismas propiedades para aumentar la dispersión y absorción de otros fármacos inyectados como las preparaciones de hialuronidasa derivadas de animales previamente aprobadas, pero con un perfil de seguridad mejorado. En particular, el uso de hialuronidasa recombinante humana (rHuPH20) comparada con las hialuronidasas derivadas de animales minimiza el riesgo potencial de contaminación con patógenos animales y encefalopatías espongiformes transmisibles.

Las glicoproteínas de hialuronidasa solubles (sHASEGP), un proceso para su preparación y su uso en las composiciones farmacéuticas se ha descrito in WO 2004/078140. El uso de glicoproteínas de hialuronidasa solubles en combinación con un gran número de anticuerpos ejemplares, como por ejemplo Trastuzumab, se ha mencionado en WO 2006/091871.

EL trabajo experimental detallado como se indica más adelante ha demostrado que la formulación reivindicada de forma sorprendente posee una estabilidad de almacenamiento favorable y cumple todos los requisitos necesarios para la aprobación por parte de las autoridades sanitarias.

La enzima hialuronidasa en la formulación de acuerdo con la presente invención aumenta la liberación del anticuerpo anti-HER2 en la circulación sistémica, por ejemplo aumentando la absorción de la sustancia activa (actúa como un potenciador de la permeación). La enzima hialuronidasa también aumenta la liberación del anticuerpo anti-HER2 terapéutico en la circulación sistémica mediante la aplicación por vía subcutánea mediante la hidrólisis reversible del hialuronano, un componente extracelular del tejido SC intersticial. La hidrólisis del hialuronano en la hipodermis abre temporalmente los canales en el espacio intersticial del tejido SC y por lo tanto mejora la liberación del anticuerpo anti-HER2 terapéutico en la circulación sistémica. Además, la administración muestra dolor reducido en humanos y una menor hinchazón derivada del volumen del tejido SC.

La hialuronidasa, cuando se administra localmente provoca su efecto completamente de forma local. En otras palabras, la hialuronidasa se inactiva y metaboliza localmente en minutos y no se ha detectado que posea efectos sistémicos o a largo plazo. La rápida inactivación de la hialuronidasa en minutos cuando se introduce en el torrente

sanguíneo impide que se pueda realizar de forma realista un estudio de biodistribución comparativa entre diferentes productos de hialuronidasa. Esta propiedad también minimiza cualquier potencial preocupación por la seguridad sistémica ya que el producto de hialuronidasa no puede actuar en lugares distantes.

5 La característica que unifica todas las enzimas hialuronidasa es su capacidad de despolimerizar hialuronano, independientemente de las diferencias en su estructura química, del origen de especie, del origen tisular o de los lotes de producto farmacéutico originado a partir de la misma especie y tejido. Son inusuales en el sentido de que su actividad es la misma (excepto la potencia) a pesar de tener diferentes estructuras.

10 El excipiente de la enzima hialuronidasa de acuerdo con la formulación de la presente invención se caracteriza por no tener efectos adversos sobre la integridad molecular del anticuerpo anti-HER2 en la formulación farmacéutica estable descrita hasta aquí. Además, la enzima hialuronidasa sólo modifica la liberación del anticuerpo anti-HER2 en la circulación sistémica pero no posee ninguna propiedad que pueda proporcionar o contribuir a los efectos terapéuticos del anticuerpo anti-HER2 sistémicamente absorbido. La enzima hialuronidasa no está sistémicamente biodisponible y no afecta de forma adversa la integridad molecular del anticuerpo anti-HER2 en las condiciones de almacenamiento recomendadas de la formulación farmacéutica estable de acuerdo con la invención. Debe considerarse por lo tanto como un excipiente en la formulación de anticuerpo anti-HER2 de acuerdo con esta invención. Como no ejerce un efecto terapéutico representa un constituyente de la forma farmacéutica aparte del anticuerpo anti-HER2 terapéuticamente activo.

20 Un número de enzimas hialuronidasas adecuadas de acuerdo con la presente invención son conocidas del estado de la técnica. La enzima preferible es una enzima humana hialuronidasa, más preferiblemente la enzima conocida como rHuPH20. rHuPH20 es un miembro de la familia de β -1,4 glicosil hidrolasas activas neutrales y ácidas que despolimerizan hialuronano mediante la hidrólisis del enlace β -1,4 entre la posición C1 de la N-acetil glucosamina y la posición C4 del ácido glucurónico. El hialuronano es un polisacárido hallado en la sustancia fundamental del tejido conectivo intracelular, como el tejido subcutáneo intersticial, y de ciertos tejidos especializados, como el cordón umbilical y el humor vítreo. La hidrólisis de hialuronano disminuye temporalmente la viscosidad del tejido intersticial y promueve la dispersión de los fluidos inyectados o de transudados o exudados localizados, lo que facilita su absorción. Los efectos de la hialuronidasa son locales y reversibles con la completa reconstitución del hialuronano del tejido entre las siguientes 24 a 48 horas [Frost, G.I., "Recombinant human hyaluronidase (rHuPH20): an enabling platform for subcutaneous drug and fluid administration", Expert Opinion on Drug Delivery, 2007; 4:427-440]. El aumento de la permeabilidad del tejido conectivo a través de la hidrólisis del núcleo de hialuronano está correlacionado con la eficacia de la hialuronidasa en su capacidad para aumentar la dispersión y absorción de las moléculas coadministradas.

35 El genoma humano contiene varios genes de hialuronidasa. Sólo el producto del gen PH20 posee la actividad hialuronidasa efectiva bajo condiciones extracelulares fisiológicas y actúa como un agente de propagación, mientras que las hialuronidasas activas ácidas no poseen esta propiedad.

40 rHuPH20 es la primera y única enzima hialuronidasa recombinante humana actualmente disponible para su uso terapéutico. La proteína humana PH20 natural posee un ancla lipídica unida a los aminoácidos carboxi terminal que la anclan a la membrana plasmática. La enzima rHuPH20 desarrollada por Halozyme es una variante de delección truncada que carece de dichos aminoácidos en el carboxi terminal responsables de la unión lipídica. Esto da lugar a una enzima soluble, activa a pH neutro similar a la proteína encontrada en las preparaciones de testículos bovinos. La proteína rHuPH20 se sintetiza con un péptido señal de 35 aminoácidos que se elimina del N-terminal durante el proceso de secreción. La proteína rHuPH20 madura contiene una secuencia auténtica de aminoácidos N-terminal ortóloga a la encontrada en algunas preparaciones de hialuronidasa bovina.

50 Las hialuronidasas PH20, que incluyen el PH20 derivado de animal y la rHuPH20 recombinante humana, despolimerizan el hialuronano mediante la hidrólisis del enlace β -1,4 entre la posición C1 de la N-acetil glucosamina y la posición C4 del ácido glucurónico. El tetrasacárido es el producto de digestión más pequeño [Weissmann, B., "The transglycosylative action of testicular hyaluronidase", J. Biol. Chem., 1955; 216: 783-94]. Esta estructura N-acetil glucosamina/ácido glucurónico no se encuentra en los glicanos N-unidos de los productos biológicos recombinantes y por lo tanto rHuPH20 no afectará a la glicosilación de anticuerpos con los que se formulan, como por ejemplo Trastuzumab. La enzima rHuPH20 en sí posee seis glicanos N-unidos por molécula con estructuras principales similares a las encontradas en los anticuerpos monoclonales. Como se ha anticipado antes, estas estructuras N-unidas no cambian a lo largo del tiempo, confirmando la falta de actividad enzimática de rHuPH20 en estas estructuras glicano N-unidas. La corta vida media de rHuPH20 y la síntesis constante de hialuronano conducen a una acción corta y local de la enzima en los tejidos.

60 La enzima hialuronidasa que es un excipiente en la formulación subcutánea de acuerdo con la presente invención puede prepararse utilizando tecnología de DNA recombinante. De este modo se asegura que se obtiene la misma proteína (idéntica secuencia de aminoácidos) todas las veces y que se evita una reacción alérgica, por ejemplo provocada por proteínas contaminantes copurificadas durante la extracción a partir de un tejido. La enzima hialuronidasa utilizada en la formulación como se ha ejemplificado hasta aquí, es una enzima humana, a saber, rHuPH20.

La secuencia de aminoácidos de rHuPH20 (HYLENEX™) se conoce bien y está disponible bajo el N° de registro CAS 75971-58-7. El peso molecular aproximado es de 61 kDa.

Se han realizado múltiples comparaciones estructurales y funcionales entre las hialuronidasas naturales de origen en mamíferos y los clones de cDNA PH-20 de humanos y otros mamíferos. El gen PH-20 es el gen utilizado por el producto recombinante rHuPH20; no obstante el producto del fármaco recombinante es una versión truncada de 447 aminoácidos de la proteína completa codificada por el gen PH-20. La similitud estructural respecto a las secuencias de aminoácidos rara vez exceden del 60% en cualquier comparativa. Las comparaciones funcionales muestran que la actividad de rHuPH20 es muy similar a la de los productos de hialuronidasa aprobados con anterioridad. Esta información es consistente con los hallazgos clínicos durante los pasados 50 años que independientemente de la fuente de hialuronidasa, la seguridad clínica y eficacia de las unidades de hialuronidasa son equivalentes.

El uso de rHuPH20 en el anticuerpo anti-HER2 de formulación SC de acuerdo con la presente invención permite la administración de mayores volúmenes de producto farmacológico y aumenta potencialmente la absorción del Trastuzumab administrado por vía subcutánea en la circulación sistémica.

La osmolaridad de la formulación farmacéutica estable de acuerdo con la invención es de 330 ± 50 mOsm/kg.

La formulación farmacéutica estable de acuerdo con la invención está esencialmente libre de partículas visibles (inspección ocular). Las subpartículas visibles (medidas por oscurecimiento de la luz) cumplen los siguientes criterios:

- máximo número de partículas $\geq 10\mu\text{m}$ por vial-> 6000
- máximo número de partículas $\geq 25\mu\text{m}$ por vial-> 600

En otro aspecto, la presente invención proporciona el uso de una formulación para la preparación de un medicamento útil para tratar una enfermedad o trastorno susceptible de tratarse con un anticuerpo anti-HER2 como por ejemplo cáncer o una enfermedad no tumoral en un sujeto que comprende la administración de la formulación descrita hasta aquí a un sujeto en una cantidad efectiva para tratar dicha enfermedad o trastorno. El anticuerpo anti-HER2 puede coadministrarse de forma concomitante o secuencialmente con un agente quimioterapéutico.

En otro aspecto, la presente invención proporciona un método para tratar una enfermedad o trastorno que es susceptible de tratarse con un anticuerpo anti-HER2 (por ejemplo cáncer o una enfermedad no tumoral) en un sujeto que comprende la administración de la formulación descrita hasta aquí a un sujeto en una cantidad efectiva para tratar dicha enfermedad o trastorno. El cáncer o enfermedad no tumoral generalmente involucrará a células que expresan HER2, de forma que el anticuerpo HER2 en la formulación farmacéutica SC terapéutica de acuerdo con la presente invención es capaz de unirse a las células afectadas. Varios tipos de cáncer o enfermedades no tumorales que pueden tratarse con una formulación de acuerdo con la presente invención se enumeran en la sección de definiciones más adelante.

La formulación farmacéutica estable del anticuerpo anti-HER2 farmacéuticamente activa de acuerdo con la invención puede administrarse como inyección subcutánea, en la que la administración se repite varias veces con intervalos de tiempo de 3 semanas (q3w). El volumen total del fluido de inyección se administra en la mayoría de casos en un intervalo de tiempo de 1 a 10 minutos, preferiblemente de 2 a 6 minutos, más preferiblemente de 3 ± 1 minutos. En pacientes con CMT adyuvante y entre los pacientes con CMM que reciben Trastuzumab en monoterapia, en las que no se administran otros agentes quimioterapéuticos intravenosos (IV), dicha administración subcutánea conduce a un aumento de la comodidad del paciente con la autoadministración potencial en su casa. Esto conduce a una mejora del cumplimiento y reduce / elimina los costes asociados con la administración IV (es decir, costes de enfermería para la administración IV, alquiler de camas por día, viajes del paciente). La administración subcutánea de acuerdo con la presente invención estará asociada más probablemente con una reducción de la frecuencia y / o intensidad de las reacciones relacionadas con la infusión.

La adición de la hialuronidasa a la formulación permite aumentar el volumen de inyección que puede administrarse de forma segura y confortable por vía subcutánea. Bajo circunstancias normales el volumen de inyección es de 1 a 15 ml. Se ha observado que la administración de la formulación de acuerdo con la presente invención aumenta la dispersión, absorción y biodisponibilidad del anticuerpo terapéutico. Las moléculas más grandes (es decir, > 16 kDa) que se administran por vía SC se absorben preferentemente en el compartimiento vascular a través del drenaje de los fluidos linfáticos [Supersaxo, A., et al., "Effect of Molecular Weight on the Lymphatic Absorption of Water-Soluble Compounds Following Subcutaneous Administration", 1990; 2:167-169; Swartz, M. A., "Advanced Drug Delivery Review, The physiology of the lymphatic system", 2001; 50: 3-20]. La tasa de introducción de estas moléculas grandes en la circulación sistémica se disminuye así en relación a la infusión intravenosa, por lo tanto podría resultar en la reducción de la frecuencia / intensidad de las reacciones relacionadas con la infusión.

La producción de la formulación subcutánea de Trastuzumab de acuerdo con la invención requiere altas concentraciones de anticuerpo (aprox. 120 mg/ml) en el paso final de purificación del proceso de fabricación. Por lo tanto se añade un paso adicional del proceso (ultrafiltración/diafiltración) al proceso convencional de fabricación de Trastuzumab. De acuerdo con las enseñanzas en WO 97/04801 la formulación farmacéutica de anticuerpo anti-

HER2 estable altamente concentrada, de acuerdo con la presente invención puede también proporcionarse como una formulación de proteína estabilizada que puede reconstituirse con un diluyente adecuado para generar una formulación reconstituida a alta concentración de anticuerpo anti-HER2.

La formulación SC del anticuerpo HER2 de acuerdo con esta invención se utiliza principalmente para tratar el cáncer. Por lo que los términos "cáncer" y "canceroso" se refieren a o describen la condición fisiológica en mamíferos que se caracteriza normalmente por un crecimiento celular descontrolado. Ejemplos de cáncer incluye, pero no se limita a, carcinoma, linfoma, blastoma (que incluye meduloblastoma, cáncero cervical, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer rectal, cáncer colorectal, carcinoma endometrial o uterino, carcinoma de glándula salival, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, carcinoma anal, carcinoma de pene, cáncer testicular, cáncer esofágico, tumores del tracto biliar, así como cáncer de cabeza y cuello.

El término "alrededor" tal como se utiliza en la presente especificación de patente quiere especificar que el valor específico proporcionado puede variar hasta cierto punto, como por ejemplo se indica en las variaciones en el rango de $\pm 10\%$, preferiblemente $\pm 5\%$, más preferiblemente $\pm 2\%$ incluidos en el valor dado.

Un cáncer que "sobreexpresa" un receptor HER es uno que posee niveles significativamente mayores de un receptor HER, como HER2, en su superficie celular, en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar provocada por una amplificación génica o por un aumento de la transcripción o traducción. La sobreexpresión del receptor HER puede determinarse en un ensayo de diagnóstico o pronóstico evaluando los niveles aumentados de la proteína HER presente en la superficie de una célula (por ejemplo a través de un ensayo inmunohistoquímico; IHC). Alternativamente, o adicionalmente, se pueden medir los niveles de ácido nucleico que codifica para HER en la célula, por ejemplo a través de hibridización fluorescente in situ (FISH; véase WO98/45479), Southern blotting, o técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como la PCR cuantitativa en tiempo real (RT-PCR). También se pueden estudiar la sobreexpresión del receptor HER midiendo el antígeno (por ejemplo, el dominio extracelular de HER) en un fluido biológico como es el suero [véase, por ejemplo, Patente estadounidense N° 4.933.294 expedida el 12 de Junio de 1990; WO91/05264 publicada el 18 de abril de 1991; Patente estadounidense N° 5.401.638 depositada el 28 de marzo de 1995; y Sias et al., J. Immunol. Methods 1990; 132: 73-80]. Al margen de los ensayos anteriores, varios ensayos in vivo están disponibles para el experto en la materia. Por ejemplo, se pueden exponer células dentro del cuerpo del paciente a un anticuerpo que está opcionalmente marcado con un marcaje detectable, por ejemplo un isótopo radioactivo, y puede analizarse la unión del anticuerpo a células en el paciente, por ejemplo por escaneo externo de radioactividad o analizando una biopsia tomada al paciente antes de exponerlo al anticuerpo.

A la inversa, un cáncer que "no sobreexpresa el receptor de HER2" es uno que no expresa niveles más altos de los normales del receptor HER2 en comparación con una célula no cancerosa del mismo tipo de tejido.

Un cáncer que "sobreexpresa" un ligando de HER es uno que produce significativamente niveles superiores de que le ligando en comparación con una célula cancerígena del mismo tipo de tejido. Dicha sobreexpresión puede estar provocada mediante amplificación génica o por aumento de la transcripción o traducción. La sobreexpresión del ligando HER puede determinarse mediante la evaluación del diagnóstico de los niveles del ligando (o ácidos nucleicos que los codifican) en el paciente, por ejemplo en una biopsia de tumor o mediante varios ensayos diagnósticos como IHC, FISH, southern blotting, PCR o ensayos in vivo bien conocidos en la técnica.

Se contempla que la formulación SC de anticuerpo HER2 de acuerdo con esta invención puede también utilizarse para tratar varias enfermedades o trastornos no malignos, que incluye una enfermedad autoinmune (por ejemplo psoriasis); endometriosis; escleroderma; restenosis; pólipos como pólipos de colon, pólipos nasales o pólipos gastrointestinales; fibroadenoma; enfermedad respiratoria; colecistitis; neurofibromatosis; enfermedad renal poliquística; enfermedades inflamatorias; trastornos de la piel que incluye psoriasis y dermatitis; enfermedad vascular; condiciones que involucran proliferación anormal de células epiteliales vasculares; úlceras gastrointestinales; enfermedad de Menetrier, adenomas secretores o síndrome de pérdida de proteína; trastornos renales; trastornos angiogénicos; enfermedad ocular como degeneración macular relacionada con la edad, síndrome ocular de presunta histoplasmosis, neovascularización retinal de retinopatía diabética proliferativa, vascularización retinal, retinopatía diabética, o degeneración macular relacionada con la edad; patologías asociadas con los huesos como la osteoartritis, raquitismo y osteoporosis; daño provocado por un evento isquémico cerebral; enfermedades fibróticas o edema como cirrosis hepática, fibrosis pulmonar, carcoidosis, troiditis, síndrome sistémico de hiperviscosidad, enfermedad de Osier Weber-Rendu, enfermedad pulmonar oclusiva crónica, o edema tras quemaduras, traumatismos, radiación, apoplejía, hipoxia o isquemia; reacción de la piel por hipersensibilidad;

retinopatía diabética y nefropatía diabética; síndrome de Guillain-Barre; enfermedad de injerto versus huésped o rechazo de trasplante; enfermedad de Paget; inflamación de hueso o articulación; fotoenvejecimiento (por ejemplo provocado por radiación UV de la piel humana); hipertrofia benigna de próstata; ciertas infecciones microbianas que incluye patógenos microbianos seleccionados de entre adenovirus, hantavirus, *Borrelia burgdorferi*, *Yersinia* spp. y *Bordetella pertussis*; trombos provocados por agregación de plaquetas; enfermedades reproductivas como endometriosis, síndrome de hiperestimulación ovárica, preeclampsia, sangrado uterino disfuncional, o menometrorragia; sinovitis; ateroma; nefropatías agudas y crónicas (que incluye glomerulonefritis proliferativa y enfermedad renal inducida por diabetes); eczema; formación de cicatrices hipertróficas; choque endotóxico e infección fúngica; poliposis adenomatosa familiar; enfermedades neurodegenerativas (por ejemplo enfermedad de Alzheimer, demencia relacionada con SIDA, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, retinitis pigmentosa, atrofia muscular espinal y degeneración cerebelar); síndromes mielodisplásico; anemia aplásica; daño isquémico; fibrosis pulmonar, renal o hepática; enfermedad de hipersensibilidad mediada por linfocitos T; estenosis pilórica hipertrófica infantil; síndrome urinario obstructivo; artritis psoriásica; y tiroiditis de Hashimoto. Ejemplos de indicaciones no tumorales para la presente terapia incluye psoriasis, endometriosis, escleroderma, enfermedad vascular (por ejemplo restenosis, arterosclerosis, enfermedad arterial coronaria, o hipertensión), pólipos de colon, fibroadenoma o enfermedad respiratoria (por ejemplo asma, bronquitis crónica, bronquiectasis o fibrosis quística).

Cuando la indicación es cáncer, el paciente puede tratarse con una combinación de la formulación de anticuerpo, y un agente quimioterapéutico. La administración combinada incluye la coadministración o administración simultánea, utilizando formulaciones separadas o una formulación farmacéutica única, y la administración simultánea en cualquier orden, en el que preferiblemente hay un periodo de tiempo en el que ambos (o todos) los agentes activos ejercen de forma simultánea su actividad biológica. Así, el agente quimioterapéutico puede administrarse antes, o después, de la administración de la formulación de anticuerpo de acuerdo con la presente invención. En esta realización, el tiempo entre al menos una administración del agente quimioterapéutico y al menos una administración de la formulación de anticuerpo de acuerdo con la presente invención es preferiblemente aproximadamente 1 mes o menos, y más preferiblemente aproximadamente 2 semanas o menos. Alternativamente, el agente quimioterapéutico y la formulación de anticuerpo de acuerdo con la presente invención se administra simultáneamente al paciente, en una formulación única o formulaciones separadas.

El tratamiento con dicha formulación de anticuerpo resultará en una mejora en los signos o síntomas de la enfermedad o cáncer. Por ejemplo, cuando la enfermedad a tratar es cáncer, dicha terapia puede resultar en una mejora de la supervivencia (supervivencia general y/o supervivencia libre de progresión) y / o puede resultar en una respuesta clínica objetiva (parcial o completa). Además, el tratamiento con la combinación del agente quimioterapéutico y la formulación de anticuerpo puede resultar en un beneficio terapéutico al paciente sinérgico o mayor que la suma de los tratamientos.

Normalmente el anticuerpo en la formulación administrada es un anticuerpo desnudo. No obstante, el anticuerpo administrado puede conjugarse con un agente citotóxico. El inmunoconjugado y/o antígeno al que se une se internaliza por la célula, lo que resulta en un aumento de la eficacia terapéutica del inmunoconjugado para matar las células cancerígenas a las que se une. En una realización, el agente citotóxico localiza o interfiere con los ácidos nucleicos en las células del cáncer. Ejemplos de dichos agentes citotóxicos incluye maitansinoides, caliohemocinas, ribonucleasas y endonucleasas de DNA. Los inmunoconjugados clínicamente más avanzados son los inmunoconjugados Trastuzumab maitansinoide (T-DM1) tal como se describen en WO 2003/037992, en particular el inmunoconjugado T-MCC-DM1, cuyo nombre químico es N2'-deacetil-N2'-(3-mercaptopropil)-maitansin-4-maleimidometil-ciclohexil-1-carboxil-Trastuzumab.

Para la liberación subcutánea, la formulación puede administrarse mediante un dispositivo adecuado, como puede ser (pero sin limitarse a) una jeringa; un dispositivo de inyección (por ejemplo el dispositivo INJECT-EASE™ y el dispositivo GENJECT™); una bomba de infusión (como por ejemplo Accu-Chek™); un lápiz inyector (como el GENPEN™; un dispositivo sin agujas (por ejemplo MEDDECTOR™ y BIOJECTOR™); o mediante un sistema de liberación en parche subcutáneo. Un sistema de liberación adecuado para las formulaciones de acuerdo con la presente invención se describe en WO 2010/029054. Tal dispositivo comprende alrededor de 5 a alrededor de 15 ml o más, particularmente 5 ml de la formulación líquida de acuerdo con la presente invención.

Para la prevención o tratamiento de la enfermedad, la dosis adecuada del anticuerpo dependerá del tipo de enfermedad a tratar, como se ha definido antes, la gravedad y curso de la enfermedad, si el anticuerpo se administra con propósitos preventivos o terapéuticos, en la terapia anterior, la historia clínica del paciente y su respuesta al anticuerpo, y según la discreción del médico. El anticuerpo se administra adecuadamente al paciente en una sola vez o durante una serie de tratamientos. Dependiendo del tipo y gravedad de la enfermedad, una dosis candidata inicial del anticuerpo anti-HER2 para la administración al paciente es de alrededor de 1 mg/kg hasta 50 mg/kg de peso corporal o más específicamente entre alrededor de 0,1 mg/kg a 20 mg/kg de peso corporal), en la que, por ejemplo, mediante una o más administraciones separadas, o mediante infusión continua. Más específicamente la dosis del anticuerpo estará en el rango desde alrededor de 0,05 mg de anticuerpo anti-HER2 / kg de peso corporal a alrededor de 10 mg de anticuerpo anti-HER2 / kg de peso corporal. Si se administra un agente quimioterapéutico, se administra normalmente en dosis conocidas, o opcionalmente menores debido a la acción combinada de los fármacos o efectos secundarios negativos atribuibles a la administración del agente quimioterapéutico. La

preparación y posología de dichos agentes quimioterapéuticos pueden utilizarse de acuerdo a las instrucciones del fabricante o como se ha determinado empíricamente por el experto en la materia. La preparación y posología para dicha quimioterapia también se describe en *Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992)*.

Pueden combinarse otros regímenes terapéuticos con el anticuerpo incluyendo, pero sin limitarse a un segundo (tercero, cuarto, etc) agente(s) quimioterapéutico(s) (en otra palabra un "cóctel" de diferentes agentes quimioterapéuticos); otro anticuerpo monoclonal; un agente inhibidor del crecimiento; un agente citotóxico; un agente quimioterapéutico; un fármaco dirigido contra EGFR; un inhibidor de la tirosin quinasa; un agente anti-angiogénico; y/o citoquina, etc.; o cualquier combinación adecuada de los mismos.

Además de los regímenes terapéuticos anteriores, el paciente puede someterse a una extirpación quirúrgica de las células cancerígenas y/o a terapia de radiación.

En otra realización de la invención, se proporciona un artículo de fabricación que contiene la formulación farmacéutica de la presente invención y proporciona instrucciones para su uso. Este artículo de fabricación comprende un contenedor. Los contenedores adecuados incluye, por ejemplo, botellas, viales (por ejemplo viales de cámara múltiples o duales), jeringas (como jeringas de cámara múltiples o duales) y tubos de ensayo. El contenedor puede estar formado por una serie de materiales como el vidrio o el plástico. El contenedor contiene la formulación y la etiqueta, o asociado a este, el contenedor puede indicar las instrucciones de uso. El contenedor que contiene la formulación puede ser un vial multiusos, que permite administraciones repetidas (por ejemplo de 2 a 6 administraciones) de la formulación reconstituida. El artículo de fabricación puede incluir además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y del usuario, que incluye otros tampones, diluyentes, filtros, agujas, jeringas, y prospectos con instrucciones de uso.

El término "formulación farmacéutica" se refiere a la preparación que de esta forma permite que la actividad biológica del ingrediente activo sea efectiva, y que no contiene componentes adicionales que son inaceptablemente tóxicos a un sujeto al que se le va a administrar la formulación. Dichas formulaciones son estériles.

Una formulación "estéril" es aséptica o libre de todo microorganismo vivo y sus esporas.

Una formulación "estable" es una en que todas las proteínas que lleva, retienen esencialmente su estabilidad física y/o química y/o actividad biológica tras su almacenamiento a la temperatura de almacenamiento propuesta, por ejemplo de 2 a 8°C. Es deseable que la formulación retenga esencialmente su estabilidad física y química, así como su actividad biológica tras el almacenamiento. El periodo de almacenamiento se selecciona generalmente en base a la duración prevista de la formulación. Además, la formulación deberá ser estable tras la congelación (hasta por ejemplo, -70° C) y descongelación de la formulación, por ejemplo tras 1, 2 o 3 ciclos de congelación y descongelación. Están disponibles varias técnicas analíticas en la técnica para medir la estabilidad de proteína y se revisan en *Peptide and Protein Drug Delivery*, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, New York, Pubs. (1991) y Jones, A. *Adv. Drug Delivery Rev.* 10: 29-90 (1993), por ejemplo. La estabilidad puede medirse a una temperatura seleccionada durante un periodo de tiempo seleccionado. La estabilidad puede analizarse cualitativamente y/o cuantitativamente de diferentes maneras, que incluye la evaluación de la formación de agregados (por ejemplo utilizando cromatografía de exclusión por tamaño, midiendo la turbidez, y/o por inspección visual); analizando la heterogeneidad de cargas utilizando cromatografía de intercambio de cationes o electroforesis capilar por zona; análisis de secuencia amino-terminal o carboxi-terminal; análisis por espectrometría de masas; análisis SDS-PAGE para comparar anticuerpos reducidos e intactos; análisis de mapeo de péptidos (por ejemplo triptico o LYS-C); evaluación de la actividad biológica o función de unión del antígeno al anticuerpo; etc. La inestabilidad puede involucrar cualquiera de: agregación, desamidación (por ejemplo desamidación de Asn), oxidación (por ejemplo oxidación de Met), isomerización (por ejemplo isomerización de Asp), recorte/hidrólisis/fragmentación (por ejemplo fragmentación de la región bisagra), formación de succinimida, cisteína(s) desemparejadas, extensión de N-terminal, procesamiento de C-terminal, cambios de glicosilación, etc. Un anticuerpo monoclonal "desamidado" aquí es uno que posee uno o más residuos de asparagina modificados, por ejemplo en un ácido aspártico o un ácido isoaspártico mediante una modificación postraducciona.

Tal como se utiliza aquí, el término "agente tamponador que proporciona un pH de 5,5 ± 2,0" se refiere a un agente que proporciona a la solución que lo contiene la resistencia a cambios de pH mediante la acción de sus componentes conjugados ácido/base. El tampón utilizado en las formulaciones de acuerdo con la presente invención posee un pH en el rango de alrededor de 5,0 a alrededor de 7,0, o desde alrededor de 5,0 a alrededor de 6,5, o desde alrededor de 5,3 a alrededor de 5,8. Un pH de alrededor de 5,5 es el más adecuado. Ejemplos de agentes tamponadores que controlan el pH en este rango incluye acetato, succinato, succinato, gluconato, histidina, citrato, glicilglicina y otros tampones ácidos orgánicos. El tampón más adecuado de acuerdo con la presente invención es un tampón histidina, como por ejemplo L-histidina/HCl.

Un "tampón histidina" es un tampón que comprende los aminoácidos histidina. Ejemplos de tampones histidina incluye cloruro de histidina, acetato de histidina, fosfato de histidina, sulfato de histidina. El tampón de histidina identificado en los ejemplos como el más adecuado es un tampón de cloruro de histidina. Dicho tampón de cloruro

de histidina se prepara tritiando L-histidina (base libre, sólido) con ácido clorhídrico diluido. En particular el tampón histidina o tampón de cloruro de histidina está a pH de $5,5 \pm 0,6$, más particularmente a un pH desde alrededor de 5,3 a alrededor de 5,8, y más particularmente posee un pH de 5,5.

- 5 Mediante "isotónico" se entiende que la formulación de interés posee esencialmente la misma presión osmótica que la sangre humana. Las formulaciones isotónicas generalmente poseen una presión osmótica desde alrededor de 250 a 350 mOsm. La isotonicidad puede medirse utilizando un osmómetro de presión de vapor o un osmómetro de tipo depresión en el punto de congelación.
- 10 Un "sacárido" comprende aquí la composición general $(CH_2O)_n$ y sus derivados, que incluye monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, polisacáridos, alcoholes de azúcares, azúcares reductores, azúcares no reductores, etc. Ejemplos de sacáridos incluye glucosa, sacarosa, trehalosa, lactosa, fructosa, maltosa, dextrano, glicerina, dextrano, eritritol, glicerol, arabitol, silitol, sorbitol, manitol, melibiosa, melezitosa, rafinosa, manotriosa, estaquiosa, maltosa, lactulosa, maltulosa, glucitol, maltitol, lactitol, iso-maltulosa, etc. Particularmente las formulaciones descritas aquí
- 15 comprenden un disacárido no reductor como un agente estabilizador, como un sacárido seleccionado de entre el grupo de trehalosa (por ejemplo en forma de α,α -trehalosa dihidratada) y sacarosa.

- Aquí, un "tensioactivo" se refiere a un agente activo en superficie, por ejemplo un tensioactivo no iónico. Ejemplos de tensioactivos aquí incluye polisorbato (por ejemplo, polisorbato 20 y, polisorbato 80); poloxámero (por ejemplo poloxámero 188); Triton; dodecil sulfato sódico (SDS); laurel sulfato sódico; octil glicósido sódico; lauril-, miristil-, linoleil-, o estearil-sulfobetaina; lauril-, miristil-, linoleil- o estearil-sarcosina; linoleil-, miristil-, o cetil-betaina; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil-, o isostearamidopropil-betaina (por ejemplo lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil-, o isoestearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil- sódico, o metil oleil-taurato disódico; y las series MONAQU AT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, New Jersey); polietilglicol, polipropilglicol, y copolímeros de etilen y propilenglicol (por ejemplo Pluronic, PF68 etc); etc.
- 20 Polisorbato 20 (PS20) y Polisorbato 80 (PS80), respectivamente se han encontrado que son particularmente adecuados en las formulaciones descritas hasta aquí.
- 25

- El término "anticuerpo" aquí se utiliza en el sentido más amplio y cubre específicamente los anticuerpos monoclonales de longitud completa, anticuerpos policlonales, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo anticuerpos biespecíficos) formados de al menos dos anticuerpos de longitud completa, y fragmentos de anticuerpo, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada.
- 30

- El término "anticuerpo monoclonal" tal como se utiliza aquí se refiere a un anticuerpo obtenido de un población de anticuerpos sustancialmente homogéneos, es decir, los anticuerpos individuales que comprenden la población son idénticos y/o se unen al mismo epítipo, excepto por posibles variantes que pueden aparecer durante la producción del anticuerpo monoclonal, dichas variantes generalmente se presentan en pequeñas cantidades. Al contrario que las preparaciones de anticuerpo policlonales que normalmente incluyen diferentes anticuerpos dirigidos a diferentes determinantes (epítopos), cada anticuerpo monoclonal está dirigido contra un determinante único del antígeno.
- 35 Además de su especificidad, los anticuerpos monoclonales tienen una ventaja, y es que no están contaminados por otras inmunoglobulinas. EL modificador "monoclonal" indica el carácter del anticuerpo obtenido de un población de anticuerpos sustancialmente homogénea, y no debe interpretarse como una exigencia de producción del anticuerpo por ningún método particular. Por ejemplo, los anticuerpos monoclonales a utilizar de acuerdo con la presente invención pueden obtenerse mediante el método del hibridoma descrito por primera vez por Köhler et al, Nature, 256:495 (1975), o pueden obtenerse mediante los métodos de DNA recombinante (véase por ejemplo, Patente estadounidense N° 4.816.567). Los "anticuerpos monoclonales" pueden también aislarse de bibliotecas fágicas de anticuerpos utilizando las técnicas descritas en Clarkson et al., Nature, 352:624-628 (1991) y Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991).
- 40
- 45

- Un "fragmento de anticuerpo" comprende una porción de un anticuerpo de longitud completa, en particular comprende la región de unión a antígeno o región variable del mismo. Ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluye fragmentos Fab, Fab', F(ab')₂, y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; moléculas de anticuerpo de una cadena; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de un fragmento(s) de anticuerpo.
- 50

- Un "anticuerpo de longitud completa" es uno que comprende una región variable de unión a antígeno así como un dominio constante de cadena ligera (CL) y dominios constantes de cadena pesada, CH1, CH2 y CH3. Los dominios constantes pueden ser un dominio constante de secuencia nativa (por ejemplo dominios constantes de secuencia nativa humana) o variantes de secuencia de aminoácidos de los mismos. En particular el anticuerpo de longitud completa posee una o más funciones efectoras.
- 55

- Una "variante de la secuencia de aminoácidos" de un anticuerpo es un anticuerpo con una secuencia de aminoácidos que difiere de las principales especies de anticuerpo. Usualmente, las variantes de secuencia de aminoácidos posee al menos alrededor del 70% de homología con las principales especies de anticuerpo, y preferiblemente, serán al menos alrededor del 80%, más preferiblemente al menos de alrededor del 90% homólogos con las principales especies de anticuerpo. Las variantes de la secuencia de aminoácidos posee sustituciones, deleciones, y/o adiciones en ciertas posiciones dentro o adyacentes a la secuencia de aminoácidos de las
- 60
- 65

principales especies de anticuerpo. Ejemplos de variantes de secuencia de aminoácidos incluye variante ácida (por ejemplo variante de anticuerpo desamida), variante básica, el anticuerpo con una extensión líder amino-terminal (por ejemplo VHS-) sobre una o dos cadenas ligeras de la misma, el anticuerpo con un residuo lisina C-terminal en una o dos cadenas pesadas de la misma, etc., e incluye combinaciones de variaciones en las secuencias de aminoácidos de las cadenas pesada y/o ligera. La variante de anticuerpo de interés particular es el anticuerpo que comprende una extensión líder amino-terminal en una o dos cadenas ligeras de la misma, opcionalmente comprende además otra secuencia de aminoácidos y/o diferencias de glicosilación relacionada con las principales especies de anticuerpo.

Una "variante de glicosilación" de un anticuerpo es un anticuerpo con una o más porciones de carbohidrato unidas al mismo que difiere de una o más porciones de carbohidrato unidas a las principales especies de anticuerpo. Ejemplos de variantes de glicosilación incluye anticuerpos con una estructura de oligosacárido G1 o G2, en lugar de estructura de oligosacárido G0, unida a una región Fc de la misma, un anticuerpo con una o dos porciones de carbohidrato unidas a una o dos cadenas ligeras del mismo, un anticuerpo sin carbohidrato unido a uno o dos cadenas pesadas del anticuerpo, etc., y combinaciones de alteraciones de glicosilación. Además el término "variante de glicosilación" incluye también anticuerpos glicodiseñados como los descritos en la PE 1.331.266 y USP 7.517.670.

Las "funciones efectoras" de un anticuerpo se refieren a aquellas actividades biológicas atribuibles a la región Fc (una secuencia nativa de la región Fc o variante de la secuencia de aminoácidos de la región Fc) de un anticuerpo. Ejemplos de funciones efectoras de anticuerpo incluye unión de C1q; citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); unión al receptor de Fc; citotoxicidad mediada por células dependientes de anticuerpo (CCDA); fagocitosis; regulación negativa de receptores de superficie celular (por ejemplo receptor de linfocitos B; BCR), etc.

Dependiendo de la secuencia de aminoácidos del dominio constante de sus cadenas pesadas, los anticuerpos de longitud completa pueden asignarse a diferentes "clases". Existen cinco clases principales de anticuerpos de longitud completa: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM, y varias de ellas pueden dividirse en "subclases" (isotipos), por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, y IgA2. Los dominios constantes de la cadena pesada que corresponden con las diferentes clases de anticuerpos se denominan $\square$ [alfa] $\square$ [delta], $\square$ [epsilon], $\square$ [gamma], y $\square$ [mu], respectivamente. Las estructuras de subunidades y las configuraciones tridimensionales de las diferentes clases de inmunoglobulinas son bien conocidas.

Aquí, la "la actividad biológica" de un anticuerpo monoclonal se refiere a la capacidad del anticuerpo de unirse a un antígeno y resulta en una respuesta biológica medible que puede medirse in vitro o in vivo. Dicha actividad puede ser antagonista (por ejemplo en la que el anticuerpo es un anticuerpo HER2) o agonista. En el caso de Pertuzumab, en una realización, la actividad biológica se refiere a la capacidad del anticuerpo formulado para inhibir la proliferación de la línea celular de cáncer de mama humano MDA-MB-175-VII.

El término "anticuerpos monoclonal" aquí específicamente incluye los denominados anticuerpos quiméricos en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga con la correspondiente secuencia en los anticuerpos derivados de una especie particular o pertenece a una clase o subclase de anticuerpo particular, mientras que el resto de la(s) cadenas(s) es idéntica u homóloga con la correspondiente secuencia en los anticuerpos derivados de otra especie o pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre y cuando presenten la actividad biológica deseada (Patente estadounidense N° 4.816.567; y Morrison et al, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Los anticuerpos quiméricos de interés incluye aquí anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias del sitio de unión a antígeno del dominio variable derivados de un primate no humano (por ejemplo mono del viejo mundo, mono, etc.) y secuencias de la región constante humana.

Las formas "humanizadas" de los anticuerpos no humanos (por ejemplo, roedores) son anticuerpos quiméricos que contienen una secuencia mínima derivada de la inmunoglobulina no humana. En la mayor parte, los anticuerpos humanizados son inmunoglobulinas humanas (anticuerpo receptor) en que los residuos de una región hipervariable del receptor se sustituyen por residuos de una región hipervariable de una especie no humana (anticuerpo donante) como de ratón, rata, conejo o primate no humano con la especificidad deseada, afinidad, y capacidad. En algunos casos, los residuos de la región marco (FR) de la inmunoglobulina humana se sustituyen por los correspondientes residuos no humanos. Además, los anticuerpos humanizados pueden comprender residuos que no se encuentran en el anticuerpo receptor o en el anticuerpo donante. Estas modificaciones se hacen para refinar el rendimiento del anticuerpo. En general, el anticuerpo humanizado comprenderá sustancialmente todos de al menos uno, y normalmente dos, dominios variables, en que todos o sustancialmente todos los lazos hipervariables corresponden con aquellos de las inmunoglobulinas no humanas y todos o sustancialmente todos los FR de una secuencia de una inmunoglobulina humana. El anticuerpo humanizado opcionalmente también comprenderá al menos una porción de una región constante de inmunoglobulina (Fc), normalmente la de una inmunoglobulina humana. Para más detalles, véase Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); y Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992).

Los anticuerpos HER2 humanizados incluye huMAb4D5-1, huMAb4D5-2, huMAb4D5-3, huMAb4D5-4, huMAb4D5-5, huMAb4D5-6, huMAb4D5-7 y huMAb4D5-8 o Trastuzumab (HERCEPTIN™) como se describe en la Tabla 3 de la

Patente Estadounidense 5.821.337; anticuerpos 520C9 humanizado (WO93/21319) y 2C4 humanizado, como Pertuzumab como se describe más adelante.

Con los presentes propósitos, "Trastuzumab", "HERCEPTIN™" y "huMAb4D5-8" se refieren a un anticuerpo anti-HER2 dirigido contra el epítipo 4D5. Dicho anticuerpo preferiblemente comprende las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera y pesada descritas por ejemplo en la Fig. 14 de WO 2006/044908.

El "epítipo 4D5" es la región en el dominio extracelular de HER2 al que se unen el anticuerpo 4D5 (ATCC CRL 10463) y Trastuzumab. Este epítipo está cerca del dominio transmembrana de HER2, y dentro del dominio IV de HER2. Para buscar anticuerpos que se unen al epítipo 4D5, puede realizarse un ensayo de rutina de bloqueo cruzado como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Alternativamente, puede realizarse el mapeo de epítopos para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 4D5 de HER2 (por ejemplo uno o más residuos en la región de alrededor del residuo 529 a alrededor de residuo 625, inclusive, de HER2). El "epítipo 7C2/7F3" es la región en el amino terminal, en el dominio I, del dominio extracelular de HER2 al que los anticuerpos 7C2 y/o 7F3 se unen. Para buscar anticuerpos que se unen al epítipo 7C2/7F3, puede realizarse un ensayo de rutina de bloqueo cruzado como el descrito en "Antibodies, A Laboratory Manual" (Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988)). Alternativamente, puede realizarse el mapeo de epítopos para establecer si el anticuerpo se une al epítipo 7C2/7F3 en HER2 (por ejemplo uno o más residuos en la región de alrededor del residuo 22 a alrededor del residuo 53 de HER2).

Aquí, "Pertuzumab" y "rhuMAb 2C4" se refieren a un anticuerpo que se une al epítipo 2C4 y preferiblemente que comprende las secuencias de aminoácidos de la región variable de la cadena ligera y región variable de la cadena pesada descritas en WO 2006/044908, más particularmente la versión 574 del 2C4 humanizado descrito en la Fig. 2 de WO 2006/044908.

El "epítipo 2C4" es la región en el dominio extracelular de HER2 al que se une el anticuerpo 2C4. Para buscar anticuerpos que se unen al epítipo 2C4, puede realizarse un ensayo de rutina de bloqueo cruzado como el descrito en Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow y David Lane (1988). Alternativamente, puede realizarse el mapeo de epítopos para evaluar si el anticuerpo se une al epítipo 2C4 de HER2. El epítipo 2C4 comprende los residuos del dominio II del dominio extracelular de HER2. 2C4 y Pertuzumab se unen al dominio extracelular de HER2 en la unión de los dominios I, II y III (Franklin et al. Cancer Cell 5:317-328 (2004)).

Un "agente inhibidor del crecimiento" cuando se usa aquí se refiere a un compuesto o composición que inhibe el crecimiento de una célula, especialmente una célula cancerígena que expresa HER ya sea in vitro o in vivo. Así, el agente inhibidor del crecimiento puede ser uno que reduce significativamente el porcentaje de células que expresan HER en la fase S. Ejemplos de agentes inhibidores del crecimiento incluye agentes que bloquean el ciclo de progresión (en un lugar diferente a la fase S), como los agentes que inducen la parada en G1 y la parada en la fase M. Los bloqueantes clásicos de la fase M incluye las vincas (vincristina y vinblastina), taxanos, e inhibidores de topo II como la doxorubicina, epirubicina, daunorubicina, etoposido, y bleomicina. Los agentes que paran en G1 también se extienden hasta la parada en fase S, por ejemplo, los agentes alquilantes del DNA como tamoxifeno, prednisona, dacarbazina, mecloretamina, cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, y ara-C. Se puede encontrar más información en "The Molecular Basis of Cancer", Mendelsohn y Israel, eds., capítulo 1, titulado "Regulación del ciclo celular, oncogenes, y fármacos antineoplásicos" de Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especialmente la página 13.

Ejemplos de anticuerpos "inhibidores del crecimiento" son aquellos que se unen a HER2 e inhiben el crecimiento de las células cancerígenas que sobreexpresan HER2. Los anticuerpos HER2 inhibidores del crecimiento preferibles inhiben el crecimiento de las células de tumor de mama SK-BR-3 en cultivo celular en más de un 20%, y preferiblemente superior al 50% (por ejemplo entre alrededor del 50% y alrededor del 100%) a una concentración de anticuerpo de alrededor de 0,5 a 300 µg/ml, en la que la inhibición del crecimiento se determinó seis días tras la exposición de las células SK-BR-3 al anticuerpo (véase Patente estadounidense N° 5.677.171 expedida el 14 de octubre de 1997). El anticuerpo inhibidor del crecimiento preferible es una variante humanizada del anticuerpo monoclonal 4D5 murino, por ejemplo, Trastuzumab.

"Tratamiento" se refiere a ambos tratamientos terapéuticos y medidas profilácticas o preventivas. Aquellos que necesitan el tratamiento incluye aquellos con la enfermedad así como aquellos en los que la enfermedad debe prevenirse. Por lo tanto, el paciente a tratar aquí debe estar diagnosticado de una enfermedad o debe estar predispuesto o susceptible a dicha enfermedad.

El término "agente citotóxico" tal como se utiliza aquí se refiere a una sustancia que inhibe o previene la función de las células y/o provoca la destrucción de las células. El término pretende incluir isótopos radioactivos (por ejemplo At 211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212, P32 e isótopos radioactivos de Lu), agentes quimioterapéuticos, y toxinas como toxinas de moléculas pequeñas o toxinas enzimáticamente activas de origen bacteriano, fúngico, vegetal o animal, que incluye fragmentos y/o variantes de los mismos.

Un "agente quimioterapéutico" es un compuesto químico útil en el tratamiento del cáncer. Ejemplos de agentes quimioterapéuticos incluyen los agentes alquilantes como la tiotepa y ciclofosfamida (CYTOXAN™); sulfonatos de alquilo como el busulfano, improsulfano y piposulfano; aziridinas como la benzodopa, carbocuna, meturedopa y uredopa; etileniminas y metilamelaminas que incluyen la altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilenfosforamida y trimetilolomelarnina; acetogeninas (especialmente bullatacina y bullatacinona); delta-9-tetrahidro-cannabinol (dronabinol, MARENOL™); beta-lapachona; lapachol; colchicinas; ácido betulínico; una camptotecina (que incluye el análogo sintético topotecano (HYCAMTIN™), CPT-11 (irinotecano, C AMPTOSAR™), acetilcamptotecina, escopolectina y 9-aminocamptotecina); briostatina; callistatina; CC-1065 (que incluye sus análogos sintéticos adozelesina, carzelesina y bizelesina); podofilotoxina; ácido podofilínico; teniposida; criptoficinas (particularmente la criptoficina 1 y criptoficina 8); dolastatina; duocarmicina (que incluye los análogos sintéticos KW-2189 y CBI-TMI); eleuterobina; pancratistatina; una sarcodictina; espongiostatina; mostazas nitrogenadas como clorambucilo, clornafacina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalan, novembichina, fenesterina, prednimustina, trofosfa[pi]nida, mostaza de uracilo; nitrosoureas como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina y ranimustina; antibióticos como los antibióticos enedíina (por ejemplo, calicheamicina, especialmente calicheamicina gamma 11 y calicheamicina omega 11 (véase por ejemplo, Angew, Chemie Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994))); dinemicina, que incluye la dinemicin A; una esperamicina; así como cromóforo neocarzinostatina y cromóforos antibióticos enedíina cromoproteína relacionados), aclacinomisinas, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinornicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicina, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina (que incluye ADRIAMYCIN™, morfolino-doxorubicina, cianomorfolino-doxorubicina, 2-pirrolino-doxorubicina, inyección de liposomas de doxorubicina HCl (DOXIL™), doxorubicina liposomal TLC D-99 (MYOCET™), doxorubicina liposomal pegilada (CAELYX™), y deoxidoxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas como mitomicina C, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorubicina; anti-metabolitos como el metotrexato, gemcitabina (GEMZAR™), tegafuro (UFTORAL™), capecitabina (XELODA™), una epotilona, y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico como la denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina como la fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina como la ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofuro, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, enocitabina, floxuridina; anti-adrenales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reforzador de ácido fólico como el ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glucósido; ácido aminolevulínico; eniluracilo; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuna; elfornitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxiaurea; lentinano; lonidainina; maitansinoides como maitansina y ansamitocinas; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitraerina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; losoxantrona; 2-etilhidrazida; procarbazona; complejo polisacárido PSKL™ (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxano; rizoxina; sizofirano; espirogermarao; ácido tenuazónico; triazicuna; 2,2',2"-triclorotrietilamina; tricotecenos (especialmente toxina T-2, verracurina A, roridina A y anguidina); uretano; dacarbazona; mannomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinosido ("Ara-C"); tiotepa; taxoide, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL™), formulación de nanopartículas de ingeniería con albúmina de paclitaxel (ABRAXANE™), y docetaxel (TAXOTERE™); cloranbucilo; 6-tioguanina; mercaptopurina; metliotrexato; agentes con platino como el cisplatino, oxaliplatino y carboplatino; vincas, que evitan la polimerización de tubulina a partir de los microtúbulos en formación, que incluye vinblastina (VELBAN™), vincristina (ONCOVIN™), vindesina (ELDISINE™), FILDESIN™, y vinorelbina (NAVELBINE™); etoposido (VP-16); ifosfamida; mitoxantrona; leucovovina; novantrona; edatrexato; daunomicina; aminopterina; ibandronato; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); retinoides como el ácido retinoico, que incluye el bexaroteno (TARGRETIN™); bisfosfonatos como el clodronato (por ejemplo, BONEFOS™ o OSTAC™), etidronato (DIDROCAL™), NE-58095, ácido zoledrónico/ zoledronato (ZOMETA™), alendronato (FOSAMAJX™), pamidronato (ARELIA™), tiludronato (SKELID™), o risedronato (ACTONEL™); troxacitabina (un análogo de 1,3-dioxolano nucleósido citosina); oligonucleótidos antisentido, particularmente los que inhiben la expresión de genes en las vías de señalización implicadas en la proliferación celular aberrante, como por ejemplo, PKC-alfa, Raf, H-Ras y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGF-R); vacunas como la vacuna THERATOPE™ y las vacunas de terapia génica, por ejemplo, la vacuna ALLOVECTIN™, vacuna LEUVECTIN™ y vacuna VAXID™; inhibidores de la topoisomerasa 1 (por ejemplo LURTOTECAN™); rmRH (por ejemplo ABARELIX™); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (Pfizer); perifosina, inhibidores de COX-2 (por ejemplo celecoxib o etoricoxib), inhibidores del proteasoma (por ejemplo PS341); bortezomib (VELCADE™); CCI-779; tipifarnib (RI 1577); orafenib, ABT510; inhibidor de Bcl-2 como oblimersen sódico (GENASENSE™); pixantrona; inhibidores de EGFR (véase la definición a continuación); inhibidores de las tirosina quinasas (véase la definición a continuación); y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como combinaciones de dos o más de los anteriores como CHOP, una abreviatura de una terapia combinada de ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisolona, y FOLFOX, una abreviatura de un regimen de tratamiento con oxaliplatino (ELOXATIN™) combinado con 5-FU y leucovovina.

También se incluyen en esta definición los agentes anti-hormonales que actúan regulando o inhibiendo la acción de las hormonas sobre los tumores como los anti-estrógenos con un perfil mixto agonista/ antagonista, lo que incluye, el tamoxifeno (NOLVADEX™), 4-hidroxitamoxifeno, toremifeno (FARESTON™), idoxifeno, droloxifeno, raloxifeno (EVTSTA™), trioxifeno, keoxifeno y moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERM) como SERM3; anti-estrógenos puros sin propiedades agonistas, como el fulvestrant (FASLODEX™), y EM800 (tales agentes pueden bloquear la dimerización del receptor de estrógenos (ER), inhiben la unión al DNA, aumentan el recambio de ER y/o

suprimen los niveles de ER); inhibidores de la aromatasa, lo que incluye los inhibidores de la aromatasa esteroideos como el formestano y exemestano (AROMASIN™), y los inhibidores de la aromatasa no esteroideos como el anastrozol (ARIMIDEX™), letrozol (FEMARA™) y aminoglutetimida, y otros inhibidores de la aromatasa que incluyen vorozol (RIVISOR™), acetato de megestrol (MEGASE™), fadrozol, imidazol; agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante, lo que incluye la leuprolida (LUPRON™ y ELIGARD™), goserelina, buserelina y tripterelina; esteroides sexuales, lo que incluye progestinas como acetato de megestrol y acetato de medroxiprogesterona, estrógenos como dietilstilbestrol y premarina, y andrógenos/ retinoides como la fluoximesterona, el ácido todo transretiónico y fenretinida; onapristona; anti-progesteronas; reguladores negativos del receptor de estrógenos (ERD); anti-andrógenos como la flutamida, nilutamida y bicalutamida; testolactona; y las sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores; así como las combinaciones de dos o más de los anteriores.

Como se utiliza, el término "fármaco dirigido a EGFR" se refiere a un agente terapéutico que se une a EGFR y, opcionalmente, inhibe la activación del EGFR. Ejemplos de tales agentes incluyen los anticuerpos y pequeñas moléculas que se unen a EGFR. Ejemplos de anticuerpos que se unen a EGFR incluyen MAb 579 (ATCC CRL HB 8506), MAb 455 (ATCC CRL HB8507), MAb 225 (ATCC CRL 8508), MAb 528 (ATCC CRL 8509) (véase la Patente estadounidense N° 4.943.533, Mendelsohn et al.) y variantes de los mismos, como el 225 quimérico (C225 o Cetuximab; ERBITUX™) y el 225 remodelado humano (H225) (véase la WO 96/40210, Imclone Systems Inc.); anticuerpos que se unen al EGFR mutante de tipo II (Patente estadounidense N° 5.212.290); anticuerpos humanizados y quiméricos que se unen a EGFR como se describe en la Patente estadounidense N° 5.891.996; y anticuerpos humanos que se unen a EGFR, como ABX-EGF (véase la WO 98/50433, Abgenix). El anticuerpo anti-EGFR puede estar conjugado con un agente citotóxico, generando así un inmunocóncugado (véase, por ejemplo, la PE-A-659439, Merck Patent GmbH). Ejemplos de moléculas pequeñas que se unen a EGFR incluyen ZD 1839 o Gefitinib (IRESSA™; Astra Zeneca), CP-358774 o Erlotinib HCl (TARCEVA™ Genentech/Roche/OSI) y AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen)

Un "inhibidor de tirosina quinasa" es una molécula que inhibe en cierta medida la actividad tirosina quinasa de una tirosina quinasa como el receptor HER. Ejemplos de tales inhibidores incluyen los fármacos dirigidos a EGFR indicados en el párrafo precedente así como pequeñas moléculas inhibidoras de la tirosina quinasa HER2 como TAKI 65 disponible de Takeda, los inhibidores de HER duales como EKB-569 (disponible de Wyeth) que se une preferentemente a EGFR pero inhibe tanto las células que sobreexpresan HER2 como EGFR, GW572016 (disponible de Glaxo) un inhibidor oral de HER2 y la tirosina quinasa EGFR, y PKI-166 (disponible de Novartis); inhibidores pan-HER como canertinib (CI-1033; Pharmacia); inhibidores de Raf-1 como el agente antisentido ISIS-5132 disponible de ISIS Pharmaceuticals que inhibe la señalización de Raf-1; inhibidores de TK no dirigidos a HER como Imatinib mesilato (Gleevec™) disponible de Novartis; inhibidor CI-1040 de la quinasa I regulada por la MAPK extracelular (disponible de Farmacia); quinazolininas, como PD 153035, 4-(3-cloroanilino)quinazolina; piridopirimidinas; pirimidopirimidinas; pirrolopirimidinas, como CGP 59326, CGP 60261 y CGP 62706; pirazolopirimidinas, 4-(fenilamino-7H-pirrol[2,3-d]pirimidinas; curcumin(diferuloil metano, 4,5-bis(4-fluoroanilino)ftalimida); porciones nitrotiofeno que contienen tirfostinas; PD-0183805 (Warner-Lambert); moléculas antisentido (por ejemplo las que se unen a ácidos nucleicos que codifican HER); quinoxalinas (Patente estadounidense N° 5.804.396); tirfostinas (Patente estadounidense N° 5.804.396); ZD6474 (Astra Zeneca); PTK-787 (Novartis/Schering AG); inhibidores pan-HER como CI-1033 (Pfizer); Affinitac (ISIS 3521; Isis/Lilly); PKI 166 (Novartis); GW2016 (Glaxo SmithKline); CI-1033 (Pfizer); EKB-569 (Wyeth); Semaxinib (Sugen); ZD6474 (AstraZeneca); PTK-787 (Novartis/ Schering AG); INC-IC11 (Imclone); o como se describe en cualquiera de las siguientes publicaciones de patente: Patente estadounidense N° 5.804.396; WO 99/09016 (American Cyanamid); WO 98/43960 (American Cyanamid); WO 97/38983 (Warner Lambert); WO 99/06378 (Warner Lambert); WO 99/06396 (Warner Lambert); WO 96/30347 (Pfizer, Inc); WO 96/33978 (Zeneca); WO 96/3397 (Zeneca); y WO 96/33980 (Zeneca).

Un "agente antiangiogénico" se refiere a un compuesto que bloquea o interfiere en cierto grado el desarrollo de los vasos sanguíneos. El factor antiangiogénico puede ser por ejemplo una molécula pequeña o anticuerpo que se une a un factor de crecimiento o receptor de un factor de crecimiento involucrado en promover la angiogénesis. El factor antiangiogénico preferible aquí es un anticuerpo que se une al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), como el Bevacizumab (AVASTIN™).

El término "citoquina" es un término genérico para las proteínas liberadas por una población de células que actúan sobre otra célula como mediadores intercelulares. Ejemplos de tales citoquinas son las linfoquinas, monoquinas y las hormonas polipéptido tradicionales. Entre las citoquinas se incluyen las hormonas de crecimiento, como la hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento humana N-metionilo y hormona de crecimiento bovina, la hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina; prorelaxina, hormonas glicoproteína como la hormona estimuladora de folículos (FSH), hormona estimuladora de la tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno placentario, factor de necrosis tumoral α y β sustancia inhibidora mulleriana, factor asociado a gonadotropina de ratón, inhibina; activina, factor de crecimiento endotelial vascular, integrina, trombopoyetina (TPO), factores de crecimiento nerviosos como NGF α y β , factor de crecimiento de las plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) como TGF- α y TGF- β , factor de crecimiento similar a la insulina I y II, eritropoyetina (EPO), factores osteoinductivos; interferones como el interferon- α , β y γ , factores estimuladores de colonias (CSF) como el CSF de macrófagos (M-CSF), CSF de

granulocitos-macrófagos (GM-CSF), y CSF de granulocitos (G-CSF), interleuquinas (IL) como la IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, un factor necrosis tumoral como TNF- α o TNF- β , y otros factores polipeptídicos que incluyen LIF y ligando de kit (KL). Como se utiliza aquí, el término citoquina incluye las proteínas de origen natural o de cultivo celular recombinante y los equivalentes biológicamente activos de las citoquinas de secuencia nativa.

El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad que proporciona el efecto deseado. En el caso de un ingrediente de la formulación como la enzima hialuronidasa de acuerdo con la presente invención, una cantidad efectiva es la cantidad necesaria para aumentar la dispersión y absorción del anticuerpo anti-HER2 coadministrado de forma que el anticuerpo anti-HER2 pueda actuar de forma terapéuticamente efectiva como se ha indicado anteriormente. En el caso de una sustancia farmacológica es la cantidad de ingrediente activo efectiva para tratar una enfermedad en el paciente. Cuando la enfermedad es el cáncer, la cantidad efectiva del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferiblemente detener) la infiltración de células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierta medida y preferiblemente detener) la metástasis del tumor; inhibir, en cierta medida, el crecimiento tumoral; y/o eliminar en cierta medida uno o más síntomas asociados con el cáncer. En función de la extensión con la que el fármaco puede evitar el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. La cantidad efectiva puede aumentar la supervivencia libre de progresión, resultar en una respuesta objetiva (que incluye una respuesta parcial, PR, o una respuesta completa, CR), aumentar el tiempo de supervivencia total y/o mejorar uno o más síntomas del cáncer.

El anticuerpo que se formula de acuerdo con la presente invención preferiblemente es esencialmente puro y es deseable que sea esencialmente homogéneo (es decir libre de proteínas contaminantes, etc, en el que la enzima hialuronidasa en la formulación de acuerdo con esta invención no debe considerarse una proteína contaminante del anticuerpo monoclonal anti-HER2 de acuerdo con la presente invención). Un anticuerpo "esencialmente puro" se refiere a una composición que comprende al menos alrededor de un 90% en peso del anticuerpo, en base al peso total de la composición, preferiblemente al menos alrededor del 95% en peso. Un anticuerpo "esencialmente homogéneo" se refiere a una composición que comprende al menos alrededor de un 99% en peso del anticuerpo, en base al peso total de la composición.

La invención se entenderá más completamente en referencia a los siguientes Ejemplos. No obstante, no deben entenderse como limitantes del alcance de la invención. Todas las citas bibliográficas y de patentes se incorporan aquí por referencia.

Los Ejemplos son ilustrados adicionalmente por las figures anexas, que muestran los siguientes resultados experimentales:

Fig. 1 Estabilidad de las formulaciones de A a F (véase la Tabla 1 a continuación) tras 8 semanas con respecto a las especies de bajo peso molecular (BPM) detectadas mediante HPLC de exclusión por tamaño. Como se muestra en esta figura las formulaciones de PS20 A, C y E mostraron una estabilidad ligeramente mejor que las formulaciones de PS80 B, D y F tras el almacenamiento a 30°C.

Fig. 2 Estabilidad de las formulaciones de A a F (véase la Tabla 1 a continuación) tras 8 semanas con respecto a las especies de elevado peso molecular (APM) detectadas mediante HPLC de exclusión por tamaño. Como se muestra en esta figura las formulaciones A y B que contienen trehalosa sin adición de cloruro sódico muestran un incremento menor de APM tras 8 semanas de tiempo de almacenamiento.

Fig. 3 Estabilidad tras 8 semanas con respecto a la turbidez. Como se muestra en esta figura, las formulaciones que contienen trehalosa A y B muestran una menor turbidez; mientras las formulaciones de C a F que contienen NaCl muestran una turbidez mucho mayor. Las formulaciones E y F que contienen tanto trehalosa como NaCl mostraron una turbidez intermedia. No se observó un aumento significativo tras el almacenamiento durante 8 semanas.

Fig. 4 Viscosidad de las formulaciones líquidas de A a F (véase Tabla 1 a continuación) medida utilizando un viscosímetro de cono y placa a temperatura ambiente. Todas las formulaciones están dentro del rango de baja viscosidad que permite la inyección subcutánea.

Ejemplos

Las formulaciones anti-HER2 para la administración subcutánea de acuerdo con la invención se desarrollaron en base a los resultados experimentales que se proporcionan a continuación utilizando los métodos generales preparativos y analíticos y los ensayos que se indican como se describe a continuación.

A) Preparación de los componentes para la formulación

El trastuzumab se fabrica mediante técnicas generalmente conocidas de la producción de proteínas recombinantes. Una línea de células de ovario de hámster chino (CHO) diseñada mediante ingeniería genética preparada como se describe en la PE-B-590058 se expande en un cultivo celular a partir de un banco de células originales. El

anticuerpo monoclonal trastuzumab se recoge del fluido del cultivo celular y se purifica utilizando una cromatografía de afinidad con proteína A inmovilizada, cromatografía de intercambio de cationes (por ejemplo SP-Sepharose FF), un paso de filtración para eliminar las contaminaciones virales (por ejemplo una membrana de PVDF (comercializada por Milipore bajo el nombre de filtros Viresolve), seguido de una cromatografía de intercambio aniónico (por ejemplo Q-Sepharose FF) y un paso de ultrafiltración/ diafiltración. Para preparar las formulaciones de acuerdo con estos ejemplos se proporcionó Trastuzumab a una concentración de aproximadamente 100 mg/ml en un tampón histidina 20 mM a un pH de aproximadamente 6,0.

El rHuPH20 se fabrica mediante técnicas generalmente conocidas para la producción de proteínas recombinantes. El proceso empieza con la descongelación de las células a partir de un banco de células de trabajo (WCB) o banco de células de originales (MCB) y su expansión mediante cultivo celular en una serie de frascos de agitación seguido de la expansión en un bioreactor. Tras la finalización de la fase de producción, el líquido de cultivo celular se clarifica mediante filtración, y entonces se trata con solvente/ detergente para inactivar los virus. La proteína se purifica entonces mediante una serie de procesos de cromatografía en columna para eliminar las impurezas del proceso y las relacionadas con el producto. Se realiza un paso de filtración viral, y entonces el producto filtrado se concentra, y se formula en el tampón final: 10 mg/mL rHuPH20 en tampón L-histidina/HCl 20 mM, pH 6,5, NaCl 130 mM, polisorbato 80 al 0,05% (p/v). El producto rHuPH20 se almacena a continuación a -70°C.

El resto de excipientes de la formulación de acuerdo con la presente invención son ampliamente utilizados en la práctica y son conocidos para el experto en la materia. No existe por lo tanto la necesidad de explicarlos en detalle.

Las formulaciones de producto farmacológico líquidas para su administración subcutánea de acuerdo con la invención se desarrollaron como sigue:

Ejemplo 1: Preparación de las formulaciones líquidas

Para la preparación de las formulaciones líquidas de Trastuzumab se intercambió el tampón con un tampón de diafiltración que contiene la composición de tampón anticipada y cuando era necesario, se concentró mediante diafiltración hasta una concentración de anticuerpo de aproximadamente 150 mg/ml. Tras completar la operación de diafiltración, los excipientes (por ejemplo trehalosa, rHuPH20) se añadieron como soluciones de reserva a la solución de anticuerpo. El tensioactivo se añadió entonces como una solución de reserva concentrado de 50 a 200 veces. Finalmente la concentración de proteína se ajustó con un tampón hasta la concentración final de Trastuzumab de alrededor de 110 mg/ml, 120 mg/ml o 130 mg/ml como se especifica en las formulaciones particulares en detalle a continuación.

Todas las formulaciones se filtraron para su esterilidad a través de un filtro de 0,22 µm de baja unión a proteína y se introdujeron de forma aséptica en viales de vidrio estériles de 6 ml tapados con obturadores de goma recubiertos de ETFE (copolímero de etileno y tetrafluoroetileno y tapones de alucrimp. El volumen de dosificado fue de aproximadamente 3,0 ml. Estas formulaciones se almacenaron a diferentes condiciones climáticas (5°C, 25°C y 30°C) durante diferentes intervalos de tiempo y se estresaron mediante métodos de estrés por agitación (1 semana a una frecuencia de agitación de 200 min⁻¹ a 5°C y 25°C) y de estrés por congelación-descongelación. Las muestras se analizaron antes y después de realizar las pruebas de estrés mediante los siguientes métodos analíticos:

- 1) espectrofotometría UV;
- 2) cromatografía de exclusión por tamaño (SEC);
- 3) cromatografía de intercambio iónico (IEC);
- 4) turbidez de la solución;
- 5) presencia de partículas visibles ; y
- 6) actividad rHuPH20.

La espectroscopia UV, utilizada para la determinación del contenido de proteína, se realizó en un espectrofotómetro UV Perkin Elmer λ35 en un rango de longitudes de onda entre 240 nm y 400 nm. Las muestras de proteína pura se diluyeron hasta aproximadamente 0,5 mg/ml con la correspondiente formulación de tampón. La concentración de proteína se calculó de acuerdo con la ecuación 1.

Ecuación

$$\text{Contenido de proteína} = \frac{A(280) - A(320) \times \text{dil. factor}}{\epsilon \left\langle \frac{\text{cm}^2}{\text{mg}} \right\rangle \times d \langle \text{cm} \rangle}$$

La absorción de luz UV a 280 nm se corrigió de la dispersión de la luz a 320 nm y se multiplicó por el factor de dilución, que se determinó a partir de las masas pesadas y las densidades de la muestra pura y del tampón de dilución. El numerador se dividió por el producto de la longitud de paso de la cubeta d y el coeficiente de extinción molar ε.

La cromatografía de exclusión por tamaño (SEC) se utilizó para detectar especies solubles de elevado peso

molecular (agregados) y productos de hidrólisis de bajo peso molecular (BPM) en las formulaciones. El método se realizó en un instrumento de HPLC Waters Alliance 2695 con un detector de absorbancia dual Waters W2487 y equipado con 2 columnas en fila de 4,6 x 300 mm TosoHaas TSK Gel SuperSW3000. El monómero intacto, los agregados y los de productos de hidrólisis se separaron mediante un perfil de elución isocrático, utilizando como fase móvil fosfato sódico 50 mM, perclorato sódico 420 mM, pH 7,0, y se detectaron a una longitud de onda de 280 nm.

La cromatografía de intercambio iónico (IEC) se realizó para detectar los productos de degradación química que alteran la carga neta del Trastuzumab en las formulaciones. Para este propósito el Trastuzumab se digirió con carboxipeptidasa B. El método utilizó un instrumento de HPLC adecuado equipado con un detector UV (detección con longitud de onda a 214 nm) y una columna de intercambio de cationes analítica Dionex ProPac™ WCX-10 (4 x 250 mm). Se utilizó como fase móvil A y B tampón de fosfato sódico 10 mM pH 7,5 en H₂O y tampón de fosfato sódico 10 mM pH 7,5 y NaCl 100 mM, respectivamente, con una tasa de flujo de 0,8 ml/min.

Para la determinación de la turbidez, se midió la opalescencia en FTU (unidades de turbidez) utilizando un turbidímetro HACH 2100AN a temperatura ambiente.

Se analizó la presencia de partículas visibles en las muestras utilizando un instrumento de inspección visual Seidenader V90-T.

Se utilizó como ensayo de actividad un ensayo in vitro enzimático del rHuPH20 como hialuronidasa. El ensayo se basa en la formación de un precipitado insoluble cuando el hialuronano (hialuronato sódico) se une a un precipitante catiónico. La actividad de la enzima se midió incubando rHuPH20 con sustrato de hialuronano y luego precipitando el hialuronano no digerido con albúmina sérica acidificada (de suero equino). La turbidez se midió a una longitud de onda de 640 nm y el descenso de la turbidez resultante de la actividad enzimática en el sustrato de hialuronano es una medida de la actividad enzimática. El procedimiento se realiza utilizando una curva estándar generada con diluciones de un estándar de referencia para el ensayo de rHuPH20, y la actividad de la muestra se obtiene a partir de esta curva.

Se realizaron experimentos adicionales que incluyen las siguientes variaciones:

- variaciones del pH de alrededor de aproximadamente 5,0 a aproximadamente 6,0 o variaciones del contenido de proteína de alrededor de aproximadamente 110 mg/ml a aproximadamente 130 mg/ml
- variaciones del tensioactivo de aproximadamente 0,02% a aproximadamente 0,06%
- variaciones del estabilizante (metionina) de alrededor de 5 mM a alrededor de 15 mM

Las composiciones y los resultados de las pruebas de estabilidad de las formulaciones de producto farmacológico líquido anti-HER-2 (Formulaciones de A a X) se proporcionan en la Tabla 1 añadida a continuación en la que se utilizan las siguientes abreviaturas:

ffp: = libre de partículas; effp: = esencialmente libre de partículas; wafp: = con algunas partículas; F/T: = congelación/descongelación; agit.: = agitación; nd: = no determinado

Las formulaciones especificadas más adelante muestran que es posible proporcionar formulaciones líquidas con concentraciones elevadas de dos proteínas diferentes. Tales formulaciones pueden prepararse con mayor facilidad y un coste inferior al de las formulaciones liofilizadas. Además tales formulaciones son más fáciles de manipular ya que no es necesaria la redisolución del producto final liofilizado (reconstitución), está listo para su uso. Se ha detectado que las formulaciones especificadas en las Tablas 1, 3 y 4 también son adecuadas para la formulación de formulaciones farmacéuticas estables altamente concentradas de anticuerpos farmacéuticamente activos anti-HER2 que carecen de la enzima hialuronidasa. Por lo tanto, un aspecto de la presente invención está relacionado también con las formulaciones que contienen los ingredientes especificados pero que carecen de la enzima hialuronidasa.

Tabla 1: Composición y datos de estabilidad de las formulaciones de producto farmacológico líquido anti-HER2 de acuerdo con esta invención.

La Formulación A es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 120 mg/ml, L-histidina/HCl 20 Mm pH 5,5, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 10 mM, polisorbato 20 0,04%, rHuPH20 12.000 U/ml.

ES 2 413 090 T3

Condición de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento	Concentración de proteína (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbidez (FTU)	Partículas visibles	Actividad HE (U/ml)
			AP M (%)	Monómero (%)	BP M (%)	Pico principal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	111	0,4	98,9	0,7	60	15	10	5,0	ffp	13613
Agit.5°C	1 semana	nd	0,4	98,7	0,9	nd	nd	nd	5,2	ffp	13775
Agit.25°C	1 semana	nd	0,4	98,7	0,9	60	11	12	5,7	ffp	12053
F/T	(5 ciclos)	nd	0,4	98,7	0,9	nd	nd	nd	6,0	effp	12558
5°C	8 semanas	105	0,4	98,5	1,1	60	15	11	4,8	ffp	13204
	21 semanas	nd	0,4	98,7	0,8	62	12	11	5,3	ffp	14940
	36 semanas	nd	0,4	98,7	0,8	59	11	12	3,8	ffp	12613
25°C	8 semanas	106	0,5	98,3	1,2	53	8	19	4,7	ffp	12176
	21 semanas	nd	0,6	97,7	1,7	42	7	26	5,2	ffp	13976
	36 semanas	nd	0,7	97,2	2,1	33	7	34	3,8	ffp	12348
30°C	8 semanas	105	0,6	97,8	1,6	45	6	26	4,4	ffp	13294
	21 semanas	107	0,8	96,3	2,9	33	6	25	5,5	ffp	nd

La Formulación B es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 120 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 5,5, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 10 mM, polisorbato 80 0,06%, rHuPH20 12.000 U/ml.

Condición de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento	Concentración de proteína (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbidez (FTU)	Partículas visibles	Actividad HE (U/ml)
			APM (%)	Monómero (%)	BPM (%)	Pico principal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	111	0,4	98,9	0,7	59	15	10	4,4	ffp	13293
Agit.5°C	1 semana	nd	0,4	98,7	0,9	nd	nd	nd	5,2	ffp	13530

Agit.25 °C	1 semana	nd	0,4	98,7	0,8	61	12	12	5,2	ffp	9390
F/T	(5 ciclos)	nd	0,4	98,7	0,9	nd	nd	nd	5,5	ffp	12532
5°C	8 semanas	109	0,4	98,7	0,9	60	15	11	5,1	ffp	13508
	21 semanas	nd	0,5	98,8	0,8	nd	nd	nd	5,3	ffp	nd
	36 semanas	nd	0,4	98,8	0,8	nd	nd	nd	4,5	ffp	nd
25°C	8 semanas	109	0,5	98,2	1,3	53	8	19	4,6	ffp	nd
	21 semanas	nd	0,7	97,6	1,8	nd	nd	nd	5,2	effp	nd
	36 semanas	nd	0,8	97,1	2,1	nd	nd	nd	5,3	ffp	nd
30°C	8 semanas	109	0,6	97,7	1,7	45	6	26	4,8	ffp	13394
	21 semanas	107	0,9	96,2	2,9	nd	nd	nd	5,3	ffp	nd

La Formulación C es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 120 mg/ml, L-histidina/HCL 20 mM

pH 5,5, cloruro sódico 130 mM, metionina 10 mM, polisorbato 20 0,04%, rHuPH20 12.000 U/ml.

Condi- ción de almace- namiento	Tiempo de almacena- miento	Concen- tración de pro- teína (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visi- bles	Activi- dad HE (U/ml)
			APM (%)	Mon óme ro (%)	BP M (%)	Pico prin- ci- pal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	129	0,5	98,8	0,7	59	15	10	24,2	ffp	12355
Agit.5°C	1 semana	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	26,0	ffp	13123
Agit.25°C	1 semana	nd	0,5	98,5	0,9	60	12	11	25,3	ffp	12209
F/T	(5 ciclos)	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	24,8	ffp	12576
5°C	8 semanas	126	0,5	98,7	0,8	60	15	11	25,4	ffp	12463
	21 semanas	nd	0,6	98,4	1,0	62	13	9	23,6	ffp	15409
	36 semanas	nd	0,6	98,6	0,8	59	12	12	26,3	ffp	13218
25°C	8 semanas	125	0,7	98,0	1,3	54	9	18	25,0	ffp	13038
	21 semanas	nd	0,9	97,5	1,6	42	9	22	24,3	ffp	14972
	36 semanas	nd	1,0	97,0	2,1	32	9	31	25,7	ffp	12028
30°C	8 semanas	125	0,8	97,6	1,6	46	8	25	23,0	ffp	12751

ES 2 413 090 T3

	21 semanas	125	1,2	96,3	2,6	32	8	29	25,7	ffp	nd
--	---------------	-----	-----	------	-----	----	---	----	------	-----	----

La Formulación D es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 120 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 5,5, cloruro sódico 130 mM, metionina 10 mM, polisorbato 80 0,06%, rHuPH20 12.000 U/ml.

Condi- ción de alma- cena- miento	Tiempo de almace- namiento	Con- centra- ción de proteí- na (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visibles	Activi- dad HE (U/ml)
			APM (%)	Monó- mero (%)	BPM (%)	Pico prin- ci- pal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	128	0,4	98,9	0,7	59	15	10	25,1	ffp	15178
Agit.5° C	1 semana	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	24,1	effp	12201
Agit.25 °C	1 semana	nd	0,6	98,5	0,9	60	12	11	25,4	effp	8311
F/T	(5 ciclos)	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	24,8	effp	11906
5°C	8 semanas	125	0,5	98,7	0,8	60	15	11	25,0	ffp	13238
	21 semanas	nd	0,6	98,5	1,0	nd	nd	nd	24,3	ffp	nd
	36 semanas	nd	0,6	98,6	0,8	nd	nd	nd	26,1	ffp	nd
25°C	8 semanas	125	0,7	98,1	1,2	54	9	18	23,4	ffp	12661
	21 semanas	nd	0,9	97,3	1,8	nd	nd	nd	24,5	ffp	nd
	36 semanas	nd	1,1	96,8	2,1	nd	nd	nd	26,6	ffp	nd
30°C	8 semanas	124	0,9	97,5	1,7	45	8	25	23,7	ffp	12182
	21 semanas	125	1,3	96,1	2,6	nd	nd	nd	24,2	effp	nd

- 5 La Formulación E es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 120 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 5,5, α,α-trehalosa dihidratada 105 mM, cloruro sódico 65 mM, metionina 10 mM, polisorbato 20 0,04%, rHuPH20 12.000 U/ml.

Condi- ción de alma- cena- miento	Tiempo de almace- namiento	Con- centra- ción de proteí- na (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visibles	Activi- dad HE (U/ml)
			APM (%)	Monó- mero (%)	BPM (%)	Pico prin- ci- pal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	128	0,4	98,9	0,7	59	15	10	16,6	ffp	13475
Agit.5° C	1 semana	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	17,2	ffp	12363
Agit.25 °C	1 semana	nd	0,5	98,5	1,0	60	12	11	17,2	effp	12793

ES 2 413 090 T3

F/T	5 ciclos	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	16,5	effp	12374
5°C	8 semanas	125	0,5	98,7	0,8	60	15	11	16,9	ffp	13086
	21 semanas	nd	0,5	98,6	0,9	61	13	11	16,4	ffp	14896
	36 semanas	nd	0,5	98,7	0,8	59	12	12	16,5	ffp	13321
25°C	8 semanas	125	0,7	98,1	1,2	53	9	18	15,4	ffp	nd
	21 semanas	nd	0,8	97,5	1,7	41	8	29	19,2	ffp	14730
	36 semanas	nd	0,9	97,0	2,1	32	9	32	17,4	ffp	12028
30°C	8 semanas	124	0,8	97,7	1,5	45	8	25	15,7	ffp	11745
	21 semanas	123	1,1	96,3	2,6	32	8	24	17,4	ffp	nd

La Formulación F es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 120 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 5,5, α,α-trehalosa dihidratada 105 mM, cloruro sódico 65 mM, metionina 10 mM, polisorbato 80 0,06%, rHuPH20 12.000 U/ml.

Condi- ción de al- macena- miento	Tiempo de almace- namiento	Con- cen- tra- ción de pro- teí-na (mg/ ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- cu- las visibles	Actividad HE (U/ml)
			AP M (%)	Monó- mero (%)	BP M (%)	Pico prin- cipal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	127	0,4	98,9	0,7	59	15	10	16,7	effp	13069
Agit.5° C	1 semana	nd	0,5	98,6	0,9	nd	nd	nd	16,0	ffp	13188
Agit.25 °C	1 semana	nd	0,5	98,6	0,9	60	12	11	15,8	ffp	9764
F/T	5 ciclos	nd	0,5	98,7	0,8	nd	nd	nd	18,5	ffp	11769
5°C	8 semanas	125	0,5	98,7	0,8	60	15	11	16,5	ffp	nd
	21 semanas	nd	0,6	98,6	0,9	nd	nd	nd	16,6	ffp	nd
	36 semanas	nd	0,6	98,7	0,8	nd	nd	nd	17,2	ffp	nd
25°C	8 semanas	125	0,7	98,1	1,2	53	9	18	17,4	ffp	13570
	21 semanas	nd	0,9	97,4	1,7	nd	nd	nd	16,4	ffp	nd
	36 semanas	nd	1,0	96,9	2,1	nd	nd	nd	18,3	ffp	nd
30°C	8 semanas	124	0,8	97,5	1,7	45	8	25	16,2	ffp	11860

	21 semanas	123	1,8	95,6	2,9	nd	nd	nd	16,1	ffp	nd
--	---------------	-----	-----	------	-----	----	----	----	------	-----	----

La Formulación G es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 120 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 5,5, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 10 mM, polisorbato 20 0,04%.

Condi- ción de almace- namien- to	Tiempo de alma- cena- miento	Con-cen- tración de pro- teína (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visibles
			AP M (%)	Monó- mero (%)	BP M (%)	Pico prin- cipal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)		
-	Inicial	122	0,3	99,7	nd	71	11	7	4,2	ffp
5°C	4 semanas	nd	0,3	99,6	nd	60	11	11	nd	nd
	12 semanas	118	0,4	99,6	<0,3	70	10	7	4,8	ffp
	24 semanas	121	0,4	99,5	nd	68	9	9	4,1	ffp
	36 semanas	nd	0,5	99,5	0,1	67	8	10	nd	nd
15°C	4semana s	nd	0,4	99,6	nd	70	10	7	nd	nd
	12 semanas	121	0,5	99,4	<0,3	66	8	11	4,3	ffp
	24 semanas	121	0,5	99,3	<0,3	59	7	17	4,4	ffp
	36 semanas	nd	0,6	99,2	0,2	53	7	22	nd	nd
25°C	4 semanas	nd	0,5	99,5	<0,3	66	7	11	nd	nd
	12 semanas	121	0,6	97,2	2,1	53	6	22	4,2	ffp
	24 semanas	122	0,7	98,0	1,4	39	6	32	4,2	ffp

- 5 y se añadió rHuPH20 previamente a la inyección a partir de una solución con la siguiente composición:
rHuPH20 10 mg/ml en His/Histidina HCl 20 mM, pH 6,5, NaCl 130 mM, polisorbato 80 0,05% (p/v)

La Formulación H es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 110 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 5,0, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 5 mM, polisorbato 20 0,02%, rHuPH20 2.000 U/ml.

10

Condi- ción de almace- namien- to	Tiempo de alma- cena- miento	Con- centra- ción de prote- ína (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visi- bles	Activi- dad HE (U/ml)
			APM (%)	Monó- mero (%)	BPM (%)	Pico prin- cipal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	111	0,6	98,7	0,8	69	12	6	3,9	ffp	2081
Agit.5°C	1	nd	0,6	98,7	0,7	68	12	6	3,9	ffp	2406

ES 2 413 090 T3

	semana										
Agit.25° C	1 semana	nd	0,7	98,6	0,7	68	10	7	3,8	ffp	nd
F/T	5 ciclos	nd	0,7	98,7	0,7	68	12	6	3,8	ffp	2167
5°C	8 semanas	nd	0,6	98,8	0,6	69	10	8	4,0	ffp	2235
	12 semanas	110	0,6	98,7	0,7	66	10	9	3,9	ffp	1970
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	0,7	98,3	1,0	57	5	15	4,1	ffp	1891
	12 semanas	111	0,7	97,8	1,5	50	4	20	3,8	ffp	2079
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,4	94,1	4,5	31	3	30	4,1	ffp	nd
	12 semanas	111	1,6	92,5	5,9	28	5	35	4,7	ffp	nd

La Formulación I es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 110 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 6,0, α , α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 5 mM, polisorbato 20 0,02%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condi- ción de almace- namien- to	Tiempo de almacena- miento	Con- cen- traci- ón de prot eína (mg/ ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visi- bles	Activi- dad HE (U/ml)
			AP M (%)	Monó- mero (%)	BPM (%)	Pico princi- pal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	111	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,7	effp	1948
Agit. 5°C	1 semana	nd	0,8	98,6	0,7	68	12	7	5,1	ffp	2672
Agit.25° C	1 semana	nd	0,8	98,6	0,7	67	11	8	4,7	ffp	1724
F/T	(5 ciclos)	nd	0,8	98,6	0,7	68	12	7	4,5	ffp	2507
5°C	8 semanas	nd	0,8	98,6	0,6	68	11	8	4,5	ffp	1911
	12 semanas	112	0,8	98,5	0,7	65	11	10	4,7	ffp	2034
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	0,9	98,1	1,0	53	12	18	4,8	effp	1910
	12 semanas	111	1,0	97,8	1,2	45	12	21	4,9	ffp	2157
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

ES 2 413 090 T3

40°C	8 semanas	nd	1,6	95,3	3,1	26	9	26	5,0	ffp	nd
	12 semanas	112	1,9	93,9	4,3	20	9	22	5,7	ffp	nd

La Formulación J es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 110 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 5,0, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 5 mM, polisorbato 20 0,06%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condi- ción de almace- namien- to	Tiempo de almace- namiento	Con- cen- tra- ción de pro- teína (mg/ ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visi- bles	Activi- dad HE (U/ml)
			APM (%)	Monó- mero (%)	BPM (%)	Pico prin- cipal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	111	0,6	98,7	0,7	69	12	6	3,7	ffp	2198
Agit.5°C	1 semana	nd	0,6	98,6	0,7	68	12	6	4,3	effp	2528
Agit.25°C	1 semana	nd	0,6	98,6	0,8	68	10	7	4,0	effp	1993
F/T	(5 ciclos)	nd	0,7	98,7	0,7	68	12	6	3,7	ffp	2256
5°C	8 semanas	nd	0,6	98,8	0,6	68	10	8	4,1	ffp	2263
	12 semanas	111	0,6	98,6	0,8	66	10	9	3,9	ffp	2337
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	0,7	98,3	1,0	56	5	15	4,0	ffp	1931
	12 semanas	111	0,7	97,9	1,4	50	4	20	4,0	ffp	2291
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,3	94,5	4,2	30	3	35	4,2	ffp	nd
	12 semanas	111	1,6	92,4	6,0	27	5	35	4,2	ffp	nd

- 5 La Formulación K es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 110 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 6,0, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 5 mM, polisorbato 20 0,06%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condi- ción de almace- namien- to	Tiempo de almace- namiento	Con- cen- tra- ción de proteí- na (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visi- bles	Activi- dad HE (U/ml)
			APM (%)	Monó- mero (%)	BPM (%)	Pico prin- cipal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	111	0,8	98,6	0,7	69	12	7	4,7	ffp	2258
Agit.5°C	1 semana	nd	0,8	98,6	0,7	68	12	7	5,0	ffp	2680
Agit.25°C	1	nd	0,8	98,5	0,7	67	11	8	4,6	effp	2049

ES 2 413 090 T3

C	semana										
F/T	(5 ciclos)	nd	0,8	98,6	0,7	69	12	7	4,8	ffp	2316
5°C	8 semanas	nd	0,8	98,5	0,7	68	12	8	4,5	ffp	2132
	12 semanas	112	0,8	98,5	0,7	65	12	9	5,2	ffp	2260
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	0,9	98,3	0,8	53	12	18	4,5	ffp	1863
	12 semanas	112	1,0	97,9	1,2	46	12	21	4,7	ffp	1917
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,5	95,4	3,1	26	10	26	5,2	ffp	nd
	12 semanas	112	1,9	93,9	4,3	28	8	22	6,2	ffp	nd

La Formulación L es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 110 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM

pH 5,0, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 15 mM, polisorbato 20 0,02%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condi- ción de almace- namien- to	Tiempo de almace- namiento	Concen- tración de proteína (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visi- bles	Activi- dad HE (U/ml)
			APM (%)	Monó- mero (%)	BPM (%)	Pico princi- pal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	111	0,6	98,7	0,7	69	12	6	3,5	effp	2301
Agit.5°C	1 semana	nd	0,6	98,7	0,7	69	12	6	4,1	ffp	2574
Agit.25°C	1 semana	nd	0,6	98,7	0,7	68	10	7	4,1	ffp	nd
F/T	(5 ciclos)	nd	0,7	98,5	0,8	68	12	7	3,6	ffp	2435
5°C	8 semanas	nd	0,6	98,8	0,6	68	10	7	3,8	ffp	2263
	12 semanas	111	0,6	98,7	0,7	67	10	8	3,8	ffp	1857
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	0,7	98,4	1,0	56	5	15	3,8	ffp	1919
	12 semanas	111	0,7	97,9	1,4	50	4	19	3,8	ffp	2106
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,3	94,2	4,5	31	4	34	3,9	ffp	nd

ES 2 413 090 T3

	12 semanas	111	1,5	92,6	6,0	28	4	35	4,2	ffp	nd
--	------------	-----	-----	------	-----	----	---	----	-----	-----	----

La Formulación M es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 110 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 6,0, α,α-trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 15 mM, polisorbato 20 0,02%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condi- ción de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento	Con- cen- tración de proteí- na (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visi- bles	Activi- dad HE (U/ml)
			APM (%)	Monó- mero (%)	BP M (%)	Pico prin- cipal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	110	0,7	98,6	0,7	69	12	7	4,4	effp	2203
Agit.5° C	1 semana	nd	0,7	98,6	0,6	69	12	7	5,2	ffp	2169
Agit.25 °C	1 semana	nd	0,7	98,6	0,7	67	11	8	4,9	ffp	1661
F/T	(5 ciclos)	nd	0,7	98,6	0,6	68	12	7	4,6	ffp	2183
5°C	8 semanas	nd	0,7	98,6	0,7	68	12	8	4,5	ffp	2188
	12 semanas	111	0,8	98,6	0,7	66	12	9	4,9	effp	2028
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	0,9	98,1	1,1	53	12	18	4,5	ffp	1900
	12 semanas	111	0,9	98,0	1,2	46	12	21	4,7	ffp	1936
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,5	95,0	3,5	26	10	26	5,4	ffp	nd
	12 semanas	111	1,7	94,1	4,2	27	8	22	5,5	ffp	nd

5 La Formulación N es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 110 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 5,0, α,α-trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 15 mM, polisorbato 20 0,06%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condi- ción de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento	Con- cen- tración de proteí- na (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visi- bles	Activi- dad HE (U/ml)
			APM (%)	Monó- mero (%)	BPM (%)	Pico prin- cipal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	111	0,6	98,7	0,7	69	12	7	3,8	effp	2410
Agit.5° C	1 semana	nd	0,6	98,6	0,7	69	12	6	4,0	effp	2559
Agit.25 °C	1 semana	nd	0,6	98,6	0,8	68	10	7	3,7	ffp	2086
F/T	(5 ciclos)	nd	0,7	98,7	0,7	68	12	6	4,0	ffp	2457
5°C	8 semanas	nd	0,6	98,8	0,7	69	10	7	3,9	ffp	2102
	12 semanas	111	0,6	98,8	0,7	67	10	8	3,6	effp	2037
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

ES 2 413 090 T3

25°C	8 semanas	nd	0,7	98,2	1,1	57	5	15	3,8	ffp	2215
	12 semanas	111	0,7	97,9	1,4	50	4	19	3,7	ffp	2050
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,3	94,7	4,1	30	4	34	4,0	ffp	nd
	12 semanas	111	1,5	92,5	6,0	28	4	35	4,5	ffp	nd

La Formulación O es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 110 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 6,0, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 15 mM, polisorbato 20 0,06%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condi- ción de almace- namiento	Tiempo de almacena- miento	Con- cen- tra- ción de prote- ína (mg/ ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visi- bles	Activi- dad HE (U/ml)
			APM (%)	Monó- mero (%)	BPM (%)	Pico prin- cipal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	111	0,8	98,6	0,7	69	12	7	4,5	ffp	2153
Agit.5° C	1 semana	nd	0,7	98,6	0,7	69	12	7	4,7	ffp	1846
Agit.25 °C	1 semana	nd	0,7	98,5	0,7	67	11	8	4,9	effp	2192
F/T	(5 ciclos)	nd	0,7	98,6	0,7	69	12	7	4,3	effp	2323
5°C	8 semanas	nd	0,7	98,7	0,6	68	12	8	4,8	ffp	2049
	12 semanas	112	0,8	98,5	0,7	66	12	9	4,6	ffp	1903
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	0,9	98,2	0,9	53	12	18	4,8	ffp	2002
	12 semanas	112	0,9	97,9	1,2	46	13	21	4,8	ffp	2216
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,5	95,6	2,9	26	10	25	5,2	ffp	nd
	12 semanas	112	1,9	94,0	4,3	27	8	22	6,1	ffp	nd

- 5 La Formulación P es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 130 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 5,0, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 5 mM, polisorbato 20 0,02%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condi- ción de	Tiempo de	Concen- tración	HPLC de exclusión por tamaño	HPLC de intercambio iónico	Turbi- dez	Partí- culas	Activi- dad
-------------------	--------------	--------------------	---------------------------------	-------------------------------	---------------	-----------------	----------------

ES 2 413 090 T3

almacenamiento	almacenamiento	de proteína (mg/ml)	APM (%)	Monómero (%)	BPM (%)	Pico principal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)	(FTU)	visibles	HE (U/ml)
-	Inicial	128	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,8	ffp	2035
Agit.5° C	1 semana	nd	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,4	ffp	2728
Agit.25° C	1 semana	nd	0,7	98,6	0,7	68	10	7	3,9	ffp	nd
F/T	(5 ciclos)	nd	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,7	ffp	2559
5°C	8 semanas	nd	0,6	98,8	0,6	69	10	7	3,6	ffp	2217
	12 semanas	129	0,6	98,7	0,7	67	11	9	3,8	ffp	1878
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	0,8	98,2	1,0	57	5	15	3,5	ffp	2091
	12 semanas	128	0,8	97,8	1,4	51	4	19	4,3	ffp	1887
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,6	94,2	4,2	31	4	35	3,9	ffp	nd
	12 semanas	129	1,9	92,1	5,9	28	5	35	4,5	ffp	nd

La Formulación Q es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 130 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 6,0, α,α-trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 5 mM, polisorbato 20 0,02%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condicción de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento	Concentración de proteína (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbidez (FTU)	Partículas visibles	Actividad HE (U/ml)
			APM (%)	Monómero (%)	BPM (%)	Pico principal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	131	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,4	effp	2309
Agit.5° C	1 semana	nd	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,4	ffp	2522
Agit.25° C	1 semana	nd	0,9	98,4	0,7	67	11	8	4,8	ffp	1787
F/T	(5 ciclos)	nd	0,8	98,5	0,6	69	12	6	4,8	ffp	2312
5°C	8 semanas	nd	0,9	98,6	0,6	68	12	8	5,1	ffp	2131
	12 semanas	132	0,9	98,4	0,7	66	11	9	4,9	effp	1931

	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	1,1	97,8	1,1	54	12	18	5,1	ffp	1888
	12 semanas	132	1,1	97,8	1,1	46	12	21	4,7	ffp	1912
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,8	95,2	3,0	27	10	27	5,6	effp	nd
	12 semanas	132	2,2	93,4	4,4	28	8	22	6,1	ffp	nd

La Formulación R es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 130 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 5,0, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 5 mM, polisorbato 20 0,06%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condi- ción de almace- namiento	Tiempo de almace- namiento	Con- centra- ción de proteí- na (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visi- bles	Activi- dad HE (U/ml)
			AP M (%)	Monó- mero (%)	BPM (%)	Pico princi- pal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	131	0,7	98,6	0,7	69	12	6	3,7	effp	2096
Agit.5° C	1 semana	nd	0,7	98,7	0,6	69	12	6	3,7	effp	1856
Agit.25 °C	1 semana	nd	0,7	98,5	0,8	68	10	7	4,3	effp	1958
F/T	(5 ciclos)	nd	0,7	98,7	0,6	69	12	6	3,8	effp	2371
5°C	8 semanas	nd	0,7	98,7	0,6	69	10	7	3,5	effp	2075
	12 semanas	131	0,6	98,6	0,7	67	10	8	3,6	effp	2350
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	0,9	98,2	1,0	58	5	15	3,5	effp	1989
	12 semanas	131	0,9	97,7	1,4	51	4	20	3,9	effp	1999
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,6	94,3	4,1	32	4	35	4,2	ffp	nd
	12 semanas	132	2,0	92,0	6,0	29	5	35	4,6	effp	nd

5 La Formulación S es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 130 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 6,0, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 5 mM, polisorbato 20 0,06%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condi- ción de	Tiempo de	Con- cen-	HPLC de exclusión por tamaño	HPLC de intercambio iónico	Turbi- dez	Partí- culas	Activi- dad HE
-------------------	--------------	--------------	---------------------------------	-------------------------------	---------------	-----------------	-------------------

ES 2 413 090 T3

almacenamiento	almacenamiento	tracción de proteína (mg/ml)	APM (%)	Monómero (%)	BPM (%)	Pico principal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)	(FTU)	visibles	(U/ml)
-	Inicial	131	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,6	effp	2406
Agit.5° C	1 semana	nd	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,8	wafp	2808
Agit.25 °C	1 semana	nd	0,9	98,4	0,7	67	11	8	4,9	ffp	2141
F/T	(5 ciclos)	nd	0,8	98,5	0,6	69	12	6	4,7	ffp	2487
5°C	8 semanas	nd	0,8	98,5	0,7	69	12	8	4,8	effp	2076
	12 semanas	132	0,9	98,4	0,7	66	12	9	4,8	effp	1897
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	1,1	97,8	1,1	55	12	18	5,0	ffp	1956
	12 semanas	131	1,1	97,7	1,2	47	12	21	4,9	ffp	2094
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,9	95,2	3,0	27	9	27	5,7	ffp	nd
	12 semanas	133	2,2	93,5	4,3	21	9	22	6,1	ffp	nd

La Formulación T es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 130 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 5,0, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 15 mM, polisorbato 20 0,02%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condicción de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento	Concen-tración de proteína (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbidez (FTU)	Partículas visibles	Actividad HE (U/ml)
			APM (%)	Monómero (%)	BPM (%)	Pico principal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	131	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,7	effp	2311
Agit.5° C	1 semana	nd	0,7	98,7	0,7	69	12	6	3,7	ffp	2397
Agit.25 °C	1 semana	nd	0,7	98,5	0,8	68	10	7	4,0	effp	nd
F/T	(5 ciclos)	nd	0,7	98,7	0,6	68	12	6	3,7	ffp	2277
5°C	8 semanas	nd	0,6	98,8	0,5	67	10	7	3,5	ffp	2167
	12 semanas	131	0,6	98,6	0,7	69	10	7	3,7	ffp	2070
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

25°C	8 semanas	nd	0,8	98,2	1,0	56	5	15	3,6	ffp	2122
	12 semanas	131	0,8	97,8	1,4	52	4	19	3,7	ffp	2138
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,5	94,3	4,2	31	4	34	4,0	ffp	nd
	12 semanas	132	1,8	92,2	6,0	29	4	35	4,1	ffp	nd

La Formulación U es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 130 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 6,0, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 15 mM, polisorbato 20 0,02%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condi- ción de alma- cena- miento	Tiempo de alma- cena- miento	Concen- tración de pro- teína (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de inter- cambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visi- bles	Activi- dad HE (U/ml)
			APM (%)	Monó- Mero (%)	BPM (%)	Pico princi- pal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	131	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,5	effp	2768
Agit.5° C	1 semana	nd	0,8	98,6	0,7	68	12	7	4,7	effp	2884
Agit.25 °C	1 semana	nd	0,8	98,5	0,7	68	11	8	6,0	effp	2044
F/T	(5 ciclos)	nd	0,8	98,6	0,6	68	12	7	4,6	ffp	2617
5°C	8 semanas	nd	0,8	98,5	0,7	67	12	8	4,3	ffp	2571
	12 semanas	132	0,8	98,5	0,7	67	12	8	4,5	ffp	2164
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	1,0	98,0	1,0	52	12	18	4,9	ffp	2116
	12 semanas	131	1,0	97,7	1,3	47	13	21	5,0	effp	1990
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,7	95,4	2,9	24	10	24	5,4	ffp	nd
	12 semanas	132	2,0	93,7	4,3	19	9	20	5,7	ffp	nd

- 5 La Formulación V es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 130 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 5,0, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 15 mM, polisorbato 20 0,06%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condi- ción de	Tiempo de	Concen- tración	HPLC de exclusión por tamaño	HPLC de intercambio iónico	Turbi- dez	Partí- culas	Activi- dad
-------------------	--------------	--------------------	---------------------------------	----------------------------	---------------	-----------------	----------------

almacenamiento	almacenamiento	de proteína (mg/ml)	APM (%)	Monómero (%)	BPM (%)	Pico principal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)	(FTU)	visibles	dad HE (U/ml)
-	Inicial	131	0,7	98,7	0,7	68	12	6	3,7	effp	2323
Agit.5° C	1 semana	nd	0,7	98,6	0,7	69	12	6	3,7	ffp	2646
Agit.25 °C	1 semana	nd	0,7	98,5	0,8	68	10	7	3,8	ffp	2056
F/T	(5 ciclos)	nd	0,7	98,7	0,7	68	12	6	3,5	effp	2498
5°C	8 semanas	nd	0,6	98,9	0,5	67	10	7	3,5	effp	2179
	12 semanas	132	0,6	98,6	0,8	69	10	7	3,7	ffp	2119
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	0,8	98,1	1,1	56	5	15	3,6	ffp	2072
	12 semanas	132	0,8	97,8	1,4	52	4	19	3,9	effp	2348
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,5	94,2	4,3	31	4	34	3,9	ffp	nd
	12 semanas	132	1,8	92,3	5,9	30	5	34	4,3	ffp	nd

La Formulación W es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 130 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 6,0, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 15 mM, polisorbato 20 0,06%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condicción de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento	Concentración de proteína (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbidez (FTU)	Partículas visibles	Actividad HE (U/ml)
			APM (%)	Monómero (%)	BPM (%)	Pico principal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	131	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,7	ffp	2018
Agit.5° C	1 semana	nd	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,6	ffp	1790
Agit.25 °C	1 semana	nd	0,8	98,5	0,7	67	11	8	4,9	ffp	1918
F/T	(5 ciclos)	nd	0,8	98,6	0,7	69	12	7	4,7	ffp	2379
5°C	8 semanas	nd	0,8	98,7	0,5	67	11	8	4,4	ffp	2028
	12 semanas	131	0,8	98,4	0,8	67	12	8	4,7	effp	1964
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	1,0	98,0	1,0	53	12	18	4,3	ffp	2198

	12 semanas	131	1,0	97,8	1,2	47	13	20	5,0	ffp	1894
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,7	95,4	3,0	24	9	25	5,0	ffp	nd
	12 semanas	132	2,0	93,7	4,4	27	9	20	5,8	effp	nd

La Formulación X es una formulación líquida con una composición de Trastuzumab 120 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM

pH 5,5, α,α -trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 10 mM, polisorbato 20 0,04%, rHuPH20 2.000 U/ml.

Condi- ción de al- macena- miento	Tiempo de almace- namiento	Concen- tración de proteína (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbi- dez (FTU)	Partí- culas visi- bles	Activi- dad HE (U/ml)
			APM (%)	Monó- mero (%)	BPM (%)	Pico princi- pal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	121	0,8	98,5	0,7	69	12	7	4,2	effp	2277
Agit.5° C	1 semana	nd	0,8	98,6	0,7	69	12	6	4,2	ffp	1855
Agit.25° C	1 semana	nd	0,8	98,5	0,7	68	11	7	4,8	ffp	2070
F/T	(5 ciclos)	nd	0,8	98,6	0,7	69	12	6	4,5	ffp	2477
5°C	8 semanas	nd	0,8	98,6	0,6	68	10	8	4,3	ffp	2447
	12 semanas	122	0,7	98,6	0,7	67	10	9	4,3	ffp	2189
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
25°C	8 semanas	nd	0,9	98,2	1,0	57	7	18	4,5	ffp	2030
	12 semanas	122	0,9	97,8	1,3	50	7	23	4,5	ffp	2030
	36 semanas	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
40°C	8 semanas	nd	1,4	95,3	3,3	34	6	33	4,8	ffp	nd
	12 semanas	122	1,7	93,6	4,6	32	7	31	5,1	ffp	nd

5

Ejemplo 2: Preparación de una formulación liofilizada

Se preparó una solución de aproximadamente 60 mg/ml de Trastuzumab como se ha descrito anteriormente para las formulaciones líquidas. Todos los excipientes se añadieron a la mitad de concentración de la de la formulación líquida anteriormente mencionada. La formulación se filtró para esterilizarla a través de un filtro de 0,22 μ m y se dosificó de forma aséptica en cantidades iguales en viales de vidrio de 20 ml estériles. Los viales se taparon parcialmente con obturadores de goma recubiertos de ETFE (copolímero de etileno y tetrafluoroetileno) adecuados para su utilización en procesos de liofilización y se liofilizaron utilizando el ciclo de liofilización que se describe en la Tabla 2.

15

Tabla 2 Ciclo de liofilización

Paso	Temperatura bandejas (°C)	Tasa Rampa (°C/min)	Tiempo de mantenimiento (min)	Punto de vacío (µbar)
Pre-enfriamiento	5°C	0,0	60	-
Congelación	-40°C	1,0	120	-
Secado primario	-25°C	0,5	4560	80
Secado secundario	+25°C	0,2	300	80

El producto se enfrió en primer lugar desde temperatura ambiente hasta aproximadamente 5°C (pre-enfriamiento), seguido de un paso de congelación a -40°C con una tasa de enfriamiento de la placa de aproximadamente 1°C/ min, seguido de un paso de mantenimiento a -40°C de alrededor de 2 horas. El primer paso de secado se realizó a una temperatura de placa de aproximadamente -25°C y una presión de la cámara de aproximadamente 80 µbar durante alrededor de 76 horas. Subsiguientemente, el segundo paso de secado se inició con una rampa de temperatura de 0,2°C/ min desde -25°C a 25°C, seguido de un paso de mantenimiento a 25°C durante al menos 5 horas a una presión de cámara de aproximadamente 80 µbar.

La liofilización se realizó en un liofilizador Usifroid SMH-90 LN2 (Usifroid, Maurepas, Francia) o un liofilizador LyoStar II (FTS Systems, Stone Ridge, NY, USA). Las muestras liofilizadas se almacenaron en diferentes condiciones climáticas (5°C, 25°C y 30°C) durante diferentes intervalos de tiempo. Los viales liofilizados se reconstituyeron hasta un volumen final de 2,65 ml con agua para inyección (WFI) dando lugar a una formulación isotónica con una concentración de anticuerpo de aproximadamente 120 mg/ml. El tiempo de reconstitución de las pastillas liofilizadas fue de alrededor de 10 min. El análisis de las muestras reconstituidas se realizó tras un periodo de incubación de 24 horas de la muestra líquida reconstituida a temperatura ambiente.

Las muestras se analizaron de Nuevo mediante los siguientes métodos analíticos descritos anteriormente:

- 1) espectrofotometría UV;
- 2) cromatografía de exclusión por tamaño (SEC);
- 3) cromatografía de intercambio iónico (IEC);
- 4) turbidez de la solución; y
- 5) presencia de partículas visibles.

Los resultados de las pruebas de estabilidad de las formulaciones H se proporciona en la Tabla 3 de estabilidad que se añade a continuación en la que se utilizan las siguientes abreviaturas:

ffp: = libre de partículas; effp: = esencialmente libre de partículas; nd: = no determinado

Tabla 3: Composición y datos de estabilidad de una formulación liofilizada de producto farmacológico anti-HER2 de acuerdo con esta invención

La Formulación Y es una formulación liofilizada con una composición de Trastuzumab 120 mg/ml, L-histidina/HCl 20 mM pH 5,5, α,α-trehalosa dihidratada 210 mM, metionina 10 mM, polisorbato 20 0,04%, rHuPH20 12.000 U/ml tras la reconstitución.

Condición de almacenamiento	Tiempo de almacenamiento	Concentración de proteína (mg/ml)	HPLC de exclusión por tamaño			HPLC de intercambio iónico			Turbidez (FT U)	Partículas visibles	Actividad HE (U/ml)
			APM (%)	Monómero (%)	BPM (%)	Pico principal (%)	Pico 1 (%)	Pico 4 (%)			
-	Inicial	129	0,5	98,8	0,8	59	15	10	7,1	ffp	12451
5°C	8 semanas	124	0,6	98,6	0,9	59	16	10	5,7	effp	13380
	21 semanas	nd	0,8	98,6	0,7	62	15	8	5,9	effp	14927
	36 semanas	nd	0,8	98,5	0,7	59	16	10	6,0	ffp	13744
25°C	8 semanas	120	1,3	97,8	0,8	59	16	11	6,1	effp	13162
	21 semanas	nd	2,1	96,7	1,2	61	15	8	5,7	effp	15396

ES 2 413 090 T3

	36 semanas	nd	2,7	96,6	0,7	58	15	11	6,0	ffp	13673
30°C	8 semanas	121	1,9	97,5	0,9	58	16	11	5,7	effp	13425
	21 semanas	126	3,2	96,0	0,8	60	14	8	6,0	effp	nd
	36 semanas	nd	3,9	95,4	0,7	57	14	11	5,9	ffp	15034

Las propiedades de las formulaciones anteriormente proporcionadas se resumen en la siguiente Tabla 4:

F	Tr	His		Tre	NaCl	Met	PS		rHu
							20	80	
	mg/ml	mM	pH	mM	mM	mM	%	%	U/ml
A	120	20	5,5	210		10	0,04		12.000
B	120	20	5,5	210		10		0,06	12.000
C	120	20	5,5		130	10	0,04		12.000
D	120	20	5,5		130	10		0,06	12.000
E	120	20	5,5	105	65	10	0,04		12.000
F	120	20	5,5	105	65	10		0,06	12.000
G	120	20	5,5	210		10	0,04		
H	110	20	5,0	210		5	0,02		2.000
I	110	20	6,0	210		5	0,02		2.000
J	110	20	5,0	210		5		0,06	2.000
K	110	20	6,0	210		5	0,06		2.000
L	110	20	5,0	210		15	0,02		2.000
M	110	20	6,0	210		15	0,02		2.000
N	110	20	5,0	210		15	0,06		2.000
O	110	20	6,0	210		15	0,06		2.000
P	130	20	5,0	210		5	0,02		2.000
Q	130	20	6,0	210		5	0,02		2.000
R	130	20	5,0	210		5	0,06		2.000
S	130	20	6,0	210		5	0,06		2.000
T	130	20	5,0	210		15	0,02		2.000
U	130	20	6,0	210		15	0,02		2.000
V	130	20	5,0	210		15	0,06		2.000
W	130	20	6,0	210		15	0,06		2.000

ES 2 413 090 T3

X	120	20	5,5	210		10	0,04		2.000
Y	120	20	5,5	210		10	0,04		12.000 *)

F = Formulaci3n;

Tr = Trastuzumab;

His = L-histidina/HCl;

5 Tre = α,α -trehalosa dihidratada;

NaCl = Cloruro s3dico;

Met = metionina;

PS = polisorbato en % (p/v);

rHu = rHuPH20;

10 *) = Tras la reconstituci3n

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica estable altamente concentrada, de un anticuerpo farmacéuticamente activo anti-HER2 para inyección subcutánea que comprende:
 - a. entre alrededor de 50 y 350 mg/ml de anticuerpo anti-HER2;
 - b. entre alrededor de 1 y 100 mM de un agente tamponador que proporciona un pH de $5,5 \pm 2,0$;
 - c. entre alrededor de 1 y 500 mM de un estabilizante o una mezcla de dos o más estabilizantes;
 - d. entre alrededor de 0,01 y 0,08% de un tensioactivo no iónico; y
 - e. mas de 150 a alrededor de 16 000 U/ml, alrededor de 2 000 U/ml, o alrededor de 12 000 U/ml, respectivamente, de una enzima hialuronidasa.
2. Una formulación farmacéutica estable, altamente, concentrada, de anticuerpo anti-HER2 farmacéuticamente activo de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende alrededor de 1 000 a alrededor de 16 000 U/ml de una enzima hialuronidasa
3. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con las reivindicaciones 1 o 2, en donde la concentración de anticuerpo anti-HER-2 es de 100 a 150 mg/ml, 120 ± 18 mg/ml, alrededor de 120 mg/ml, o alrededor de 120 mg/ml, respectivamente.
4. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que hay un agente tamponador a una concentración de entre 1 y 50 mM.
5. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que el agente tamponador proporciona un pH de $5,5 \pm 0,6$.
6. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el agente tamponador es un tampón histidina, por ejemplo histidina/HCl 20 mM.
7. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el estabilizante es un sacárido, como por ejemplo α -trehalosa dihidratada o sacarosa.
8. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el estabilizante tiene una concentración de entre 15 y 250 mM o alrededor de 210 mM, respectivamente.
9. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con las reivindicaciones 7 u 8, en la que se utiliza metionina como segundo estabilizante, por ejemplo a una concentración de entre 5 y 25 mM.
10. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el tensioactivo no iónico es un polisorbato seleccionado de entre el grupo que consiste en polisorbato 20, polisorbato 80 y un copolímero de polietileno y polipropileno.
11. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con la reivindicación 10, en la que la concentración del polisorbato es del 0,02% (p/v), 0,04% (p/v) o 0,06% (p/v), respectivamente.
12. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el anticuerpo anti-HER2 se selecciona de entre el grupo que consiste en Trastuzumab, Pertuzumab y T-DM1 o una combinación de tales anticuerpos.
13. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12 que es estable tras la congelación y descongelación.
14. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que la enzima hialuronidasa es rHuPH20.
15. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 que comprende 120 mg/ml de Trastuzumab, 20 mM de L-histidina/HCl pH 5,5, 210 mM de dihidrato de α, α -trahalosa, 10 mM de metionina, 0,04% de polisorbato 20 y 2 000 U/ml de rHuPH20.
16. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con

cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 para su administración subcutánea o intramuscular.

17. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en forma líquida.

5 18. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16 en forma liofilizada.

10 19. Una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 para el tratamiento de una enfermedad o trastorno sujeto a tratamiento con un anticuerpo anti-HER2, como por ejemplo un cáncer o una enfermedad no tumoral.

15 20. Un dispositivo de inyección que comprende una formulación farmacéutica de anticuerpo anti-HER2 altamente concentrada y estable de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19.

21. El dispositivo de inyección de acuerdo con la reivindicación en donde la formulación se coadministra de forma concomitante o secuencial con un agente quimioterapéutico.

20 22. Un kit que comprende uno o mas viales que contiene la formulación de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 e instrucciones para administración subcutánea de la formulación a un paciente.

23. El kit de la reivindicación 22 que comprende además un dispositivo de inyección para administración subcutánea de la formulación a un paciente.

FIG 1

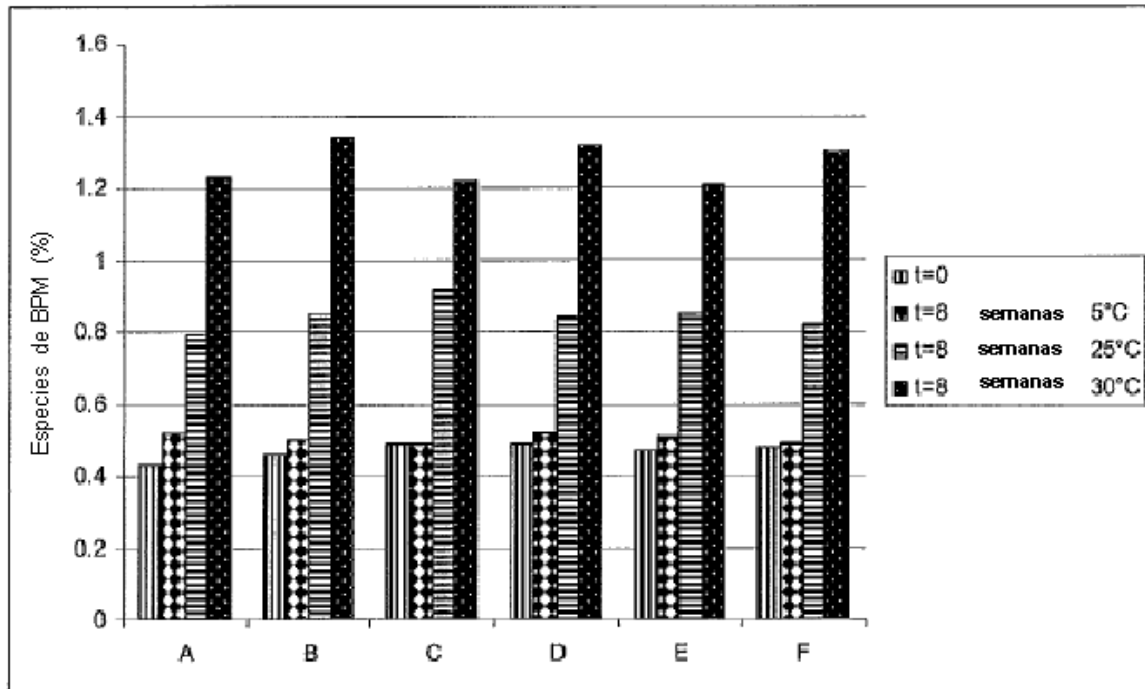


FIG 2

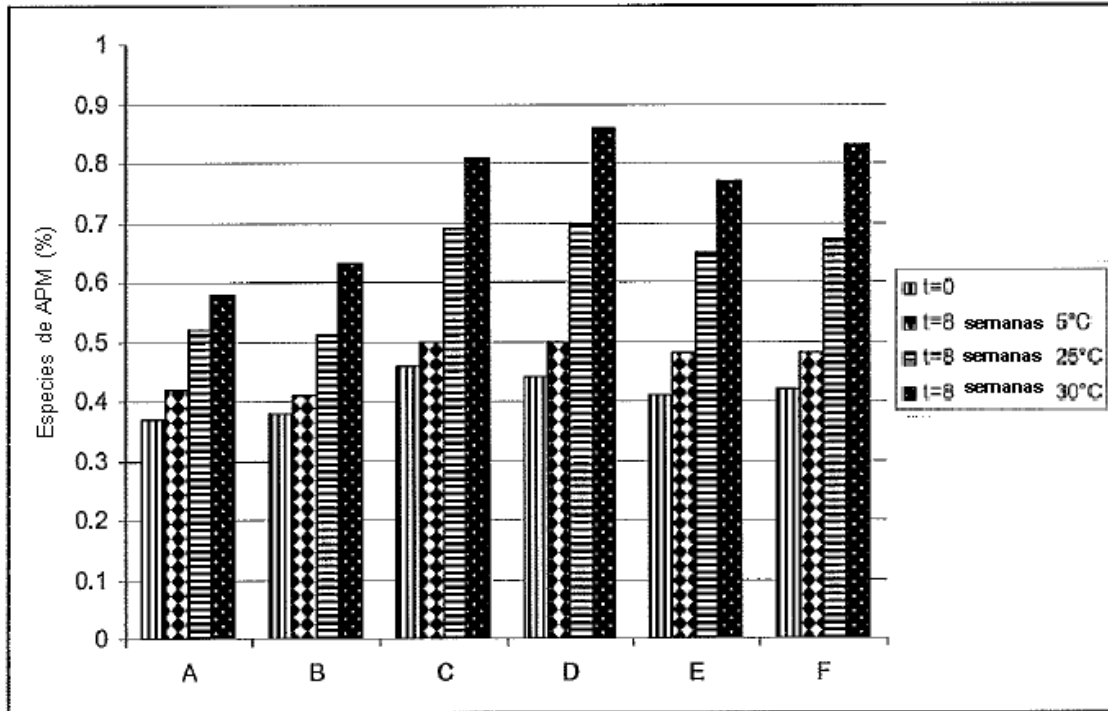


FIG 3

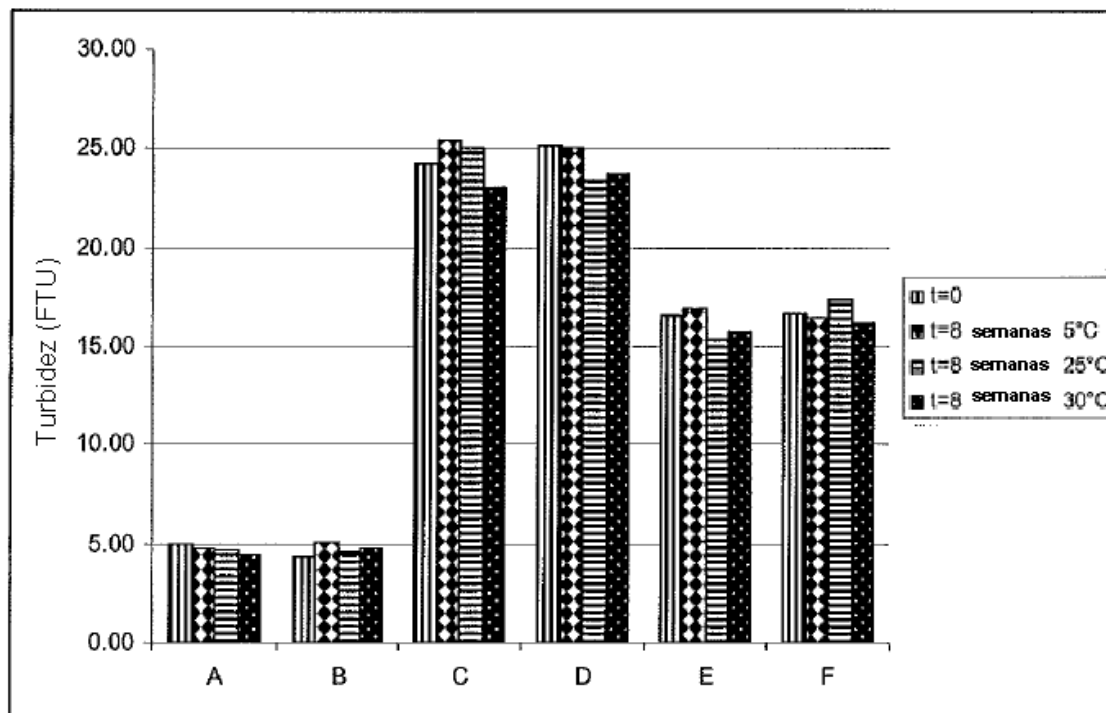


FIG 4

