(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 659 981**

(51) Int. CI.:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/22 (2006.01)
A61K 47/26 (2006.01)
C07K 16/24 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.12.2011 PCT/EP2011/074181**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **05.07.2012 WO12089778**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.12.2011 E 11807947 (4)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **15.11.2017 EP 2658575**

(54) Título: **Formulación farmacéutica que comprende un fármaco biofarmacéutico**

(30) Prioridad:

28.12.2010 EP 10197122

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
20.03.2018

(73) Titular/es:

HEXAL AG (100.0%)
Industriestrasse 25
83607 Holzkirchen, DE

(72) Inventor/es:

DANEK-BULIUS, MARTINA;
DEUTEL, BRITTA;
FÜRTINGER, SABINE;
PRAGL, BERNT y
KUZMAN, DRAGO

(74) Agente/Representante:

CARVAJAL Y URQUIJO, Isabel

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 farmacéutica que comprende un fármaco biofarmacéutico

La presente invención está relacionada con una formulación farmacéutica que comprende un fármaco biofarmacéutico.

Introducción

Los fármacos biofarmacéuticos, como las proteínas, son candidatos exigentes para la producción de una formulación galénica. Debido a que la ruta oral no es accesible para la mayoría de los fármacos biofarmacéuticos, la formulación debe ser adecuada para uso parenteral, lo que hace que las formulaciones acuosas y, por razones de estabilidad, también los polvos solubles en agua sean la formulación de elección.

Tal formulación debe cumplir una variedad de tareas. Tiene que ser tolerable con la administración, en el caso de una administración extravascular permitir la resorción apropiada del biofarmacéutico en la circulación a menos que el sitio de acción esté en la ubicación de administración y proporcione un entorno que garantice la estabilidad del fármaco biofarmacéutico en una concentración terapéuticamente efectiva. Adicionalmente, la formulación debe permitir una vida útil del fármaco de al menos dos años.

Usualmente, una formulación para un fármaco biofarmacéutico comprende uno o más reguladores), agentes isotonizantes y agua para inyección como un solvente. Adicionalmente, con frecuencia se añaden estabilizadores, como por ejemplo un agente crioprotector. Adicionalmente, se pueden agregar uno o más agentes quelantes de metales y tensioactivos. Algunos agentes pueden tener un doble papel, por ejemplo, algunos azúcares o alcoholes de azúcar pueden servir como un agente crioprotector y un agente isotonizante.

Un ejemplo para una formulación acuosa que se usa para formular un anticuerpo monoclonal humano se da en la siguiente tabla.

Compuesto	mg	Función
anticuerpo monoclonal humano	40	Compuesto activo
cloruro de sodio	4.93	agente isotonizante
dihidrogenofosfato de sodio x 2 H_2O	0.69	regulador
hidrogenofosfato de disodio x 2 H_2O	1.22	regulador
citrato de trisodio	0.24	regulador
ácido cítrico	1.04	regulador
Manitol	9.6	agente isotonizante
polisorbato 80 ("Tween 80")	0.8	surfactante
hidróxido de sodio		equilibrio de pH
Agua	ad 0.8 ml	solvente

Un ejemplo para una formulación liofilizada, que se usa para formular un anticuerpo monoclonal quimerizado, se da en la siguiente tabla.

Compuesto	mg por vial	Función
Anticuerpo monoclonal quimérico	100	Compuesto activo
dihidrogenofosfato de sodio x 1 H_2O	2.2	regulador
hidrogenofosfato de disodio x 1 H_2O	6.1	crioprotector
Sacarosa	500	agente isotonizante, crioprotector
polisorbato 80 ("Tween 80")	0.5	tensioactivo

Las formulaciones del tipo anterior cumplen los requisitos expuestos más arriba en cuanto a la tolerabilidad tras la administración, la estabilidad del fármaco biofarmacéutico y la vida útil.

Sin embargo, dichas formulaciones tienen un número de desventajas. Una desventaja es que muchos productos biofarmacéuticos tienden a agregarse, lo que inevitablemente altera sus propiedades fisiológicas. En el peor de los casos, tal agregación no solo reduce la eficacia prevista del fármaco, sino que también aumenta su inmunogenicidad, lo que puede conducir a efectos adversos graves. Una formulación favorable contribuiría así a reducir la agregación de fármacos.

Adicionalmente, algunos de los ingredientes utilizados en las formulaciones actuales son objeto de discusiones en cuanto a su tolerabilidad. Esto crea la necesidad de reemplazar dichos ingredientes.

Por lo tanto, es el objeto de la presente invención proporcionar formulaciones farmacéuticas para fármacos biofarmacéuticos que se pueden usar como una alternativa a aquellas formulaciones conocidas de la técnica anterior.

Es aún otro objeto de la presente invención proporcionar formulaciones farmacéuticas para fármacos biofarmacéuticos que sean ventajosas en comparación con aquellas formulaciones conocidas de la técnica anterior.

Es aún otro objeto más de la presente invención proporcionar formulaciones farmacéuticas para fármacos biofarmacéuticos que causen menos agregación de fármaco que las formulaciones conocidas de la técnica anterior.

Estos objetos se cumplen con métodos y medios de acuerdo con las reivindicaciones independientes de la presente invención. Las reivindicaciones dependientes están relacionadas con realizaciones preferidas. Aún debe entenderse que los rangos de valores delimitados por valores numéricos deben entenderse que incluyen dichos valores de delimitación.

La solicitud de patente US 2004/0033228 A1 divulga una formulación farmacéutica acuosa líquida que tiene una alta concentración de proteína, un pH de entre aproximadamente 4 y aproximadamente 8, y una estabilidad mejorada. Gokarn et al. (Journal of Pharmaceutical Sciences (2008) 97, 8, 3051-3066) describen formulaciones de anticuerpos autohibidores y los comparan con reguladores convencionales.

Sumario de la invención

Debe observarse que, tal como se usa en la especificación y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una" y "el, la" incluyen referentes singulares y/o plurales a menos que el contexto indique claramente otra cosa. Además, debe entenderse que, en el caso de que se den rangos de parámetros que estén delimitados por valores numéricos, se considera que los rangos incluyen estos valores de limitación.

La presente invención se refiere a una formulación farmacéutica que se define en la reivindicación independiente 1. La formulación farmacéutica está en algunas realizaciones para uso en el tratamiento de una condición patológica como se define en la reivindicación 13.

Se divulga también una formulación farmacéutica que comprende un fármaco biofarmacéutico, comprendiendo dicha formulación además al menos un ácido mono o dicarboxílico con un esqueleto de 2 - 6 átomos de C, o al menos una

sal del mismo. El ácido mono o dicarboxílico con un esqueleto de 2 - 6 átomos de C, o su sal, también se denominará "regulador" en el contexto de la presente invención.

De acuerdo con la técnica anterior, las formulaciones farmacéuticas comprenden un fármaco biofarmacéutico, ya sea un regulador no orgánico, o una sal del mismo, como un regulador de fosfato, o un ácido tricarboxílico, o una sal del mismo, como ácido cítrico/citrato. Este último es un ácido tricarboxílico, que por supuesto proporciona una función de regulador eficiente. Sin embargo, los inventores han descubierto que tal regulador puede dar lugar a problemas causados por la agregación de fármacos.

En sus estudios, los inventores sorprendentemente encontraron que una formulación que comprende ácido cítrico (ácido 2-hidroxipropan-1,2,3-tricarboxílico; $C_6H_8O_7$) o citrato tiene desventajas con respecto a la formación de agregados, en comparación con formulaciones que comprenden un ácido mono o dicarboxílico o sal del mismo (véanse resultados). El ácido cítrico es un ácido tricarboxílico ramificado con un esqueleto de 5 átomos de C. Sin estar ligados a ninguna teoría, la razón del bajo rendimiento del ácido cítrico podría ser un potencial efecto quelante que los tres grupos carboxílicos de tal ácido tricarboxílico tienen sobre las proteínas cargadas, como los anticuerpos monoclonales.

El término "2 - 6 Átomos de C" se debe entender que divulga todos los compuestos que tienen un esqueleto de 2, 3, 4, 5 o 6 átomos de C.

Como se usa aquí, el término "fármaco biofarmacéutico" incluirá cualquier compuesto terapéutico que es derivado de una fuente biológica o de biotecnológica, o sintetizado químicamente para ser equivalente a un producto de dicha fuente, por ejemplo, una proteína, un péptido, una vacuna, un ácido nucleico, una inmunoglobulina, un polisacárido, un producto celular, un extracto de planta, un extracto de animal, una proteína recombinante o combinaciones de los mismos. Comúnmente, el fármaco biofarmacéutico es el ingrediente activo de un biofármaco.

Como se usa aquí, el término "estabilizador" se referirá a un agente que ayuda a mantener la integridad estructural del fármaco biofarmacéutico, particularmente durante la congelación y/o liofilización y/o almacenamiento. Tales agentes son, en el contexto de la presente invención, también denominados "crioprotectores" o "lioprotectores".

Como se usa aquí, el término "ácido mono o dicarboxílico con un esqueleto de n átomos de C" se referirá a ácidos mono o dicarboxílicos que tienen un esqueleto lineal de alquilo o alquileno lineal con n átomos de C. Dicho esqueleto puede tener, por supuesto, cadenas laterales (por ejemplo, grupos metilo); sin embargo, los átomos de carbono comprendidos en estas cadenas no cuentan como átomos de C del esqueleto. De acuerdo con esta definición, los ácidos de azúcares cíclicos, como por ejemplo el ácido ascórbico, no califican como "ácido mono o dicarboxílico con un esqueleto de n átomos de C", ya que no tienen un esqueleto lineal de alquil o alquileno.

En un ejemplo de la divulgación, dicha formulación está en una forma seleccionada del grupo que consiste en

a) forma acuosa

b) forma liofilizada, y/o

c) suspensión.

En forma acuosa, dicha formulación puede estar lista para administración, mientras que en forma liofilizada dicha formulación puede transferirse a forma líquida antes de la administración, por ejemplo, mediante la adición de agua para inyección que puede comprender o no un conservante tal como alcohol bencílico, antioxidantes. como vitamina A, vitamina E, vitamina C, retinil palmitato y selenio, los aminoácidos cisteína y metionina, ácido cítrico y citrato de sodio, conservantes sintéticos como los parabenos metil paraben y propil paraben.

En una realización preferida del primer aspecto de la presente invención, dicha formulación da como resultado una agregación reducida de dicho fármaco biofarmacéutico en una solución acuosa, cuando se compara con formulaciones conocidas de la técnica anterior.

Como se usa aquí, el término "agregación de proteínas" significará la formación de especies de proteínas de mayor peso molecular, tales como oligómeros o multímeros, en lugar de las especies definidas deseadas del fármaco biofarmacéutico (por ejemplo, un monómero). La agregación de proteínas es, por tanto, un término universal para la formación de todo tipo de especies multiméricas no definidas más que están formadas por enlaces covalentes o interacciones no covalentes.

Para determinar la agregación de proteínas, se puede medir el índice de polidispersidad (PdI) y el radio de proteína promedio (Z-Promedio), por ejemplo, mediante el método de Dispersión de Luz Dinámica (DLS) como se describe a continuación. Los agregados también pueden medirse por cromatografía de Exclusión por Tamaño (SE-HPLC o SEQ)

como se describe a continuación. Los agregados y partículas en general también se pueden medir mediante el método Generación de Imágenes en Microflujo (MFI) como se describe a continuación.

Los ácidos mono o dicarboxílicos que caen bajo la definición anterior se mencionan en la siguiente tabla:

Tabla 1

nombre común	sal	nombre científico	Fórmula neta
ácido adípico	Adipato	Ácido hexanodioico	$C_6H_{10}O_4$
ácido málico	Malato	Ácido hidroxibutanidioico	$C_4H_6O_5$
ácido tartárico	Tartrato	Ácido 2,3-dihidroxibutanidioico	$C_4H_6O_6$
ácido succínico	succinato	Ácido butanidioico	$C_4H_6O_4$
Ácido acético	acetato	Ácido etanoico	$C_2H_4O_2$
Ácido Glutámico	glutamato	Ácido 2-aminopentanodioico	$C_5H_9NO_4$
ácido oxaloacético	oxalo acetato	Ácido oxobutanodioico	$C_4H_4O_5$
Ácido glutárico	glutarato	Ácido pentanodioico	$C_5H_8O_4$
Ácido α-cetoglutárico	α-cetoglutarato	Ácido 2-oxopentanodioico	$C_5H_6O_5$
maleico	maleato	Ácido cis-butenodioico	$C_4H_4O_4$
ácido fumárico	fumarato	Ácido trans-butenodioico	$C_4H_4O_4$

En un ejemplo de la divulgación, dicho ácido mono o dicarboxílico, o una sal del mismo, es un ácido dicarboxílico no ramificado (es decir, cadenas laterales que no contienen C) con un esqueleto de 4, 5 o 6 átomos de C, o una sal del mismo.

En un ejemplo de la divulgación, dicho ácido mono o dicarboxílico, o una sal del mismo, es un ácido monocarboxílico no ramificado con un esqueleto de 2 átomos de C, o una sal del mismo.

Particularmente preferido, dicho ácido mono o dicarboxílico, o dicha sal, es al menos uno seleccionado del grupo que consiste en:

- ácido acético o acetato
- ácido glutámico o glutamato
- ácido adípico o adipato
- ácido málico o malato
- ácido tartárico, o tartrato, y/o
- ácido succínico o succinato.

Entre estos, el ácido acético o acetato es un ácido carboxílico o sal particularmente preferido. Preferiblemente, se usa como el único ácido carboxílico o sal, o incluso como el único regulador en la formulación farmacéutica divulgada aquí. El ácido adípico, o adipato, es otro ácido carboxílico o sal particularmente preferido. Preferiblemente, se usa como el único ácido carboxílico o sal, o incluso como el único regulador en la formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

Se prefiere particularmente que dicho ácido mono o dicarboxílico esté presente en una forma acuosa de la formulación farmacéutica en una concentración de entre ≥ 1 y ≤ 100 mM, preferiblemente entre ≥ 2 y ≤ 50 mM, e incluso más preferiblemente entre ≥ 5 y ≤ 25 mM.

Adicionalmente, se prefiere que, además de dicho ácido mono o dicarboxílico, la formulación farmacéutica también pueda contener fosfato de sodio (aquí también denominado "NaP") y/o ácido cítrico o citrato. El término "fosfato de sodio" debe entenderse como que abarca el dihidrógenofosfato de sodio y el hidrógenofosfato de disodio, y todas las sales y/o hidratos posibles de los mismos.

Dicha forma acuosa de la formulación farmacéutica tiene, preferiblemente, un pH de entre ≥ 3 y ≤ 9, preferiblemente entre ≥ 4 y ≤ 8, más preferiblemente entre ≥ 5 y ≤ 7.

En aún otra realización preferida, dicha agregación de proteína se induce agitación por batido, esfuerzo de cizallamiento, ciclos múltiples de congelación-descongelación y/o almacenamiento a largo plazo y/o almacenamiento a altas temperaturas.

Como se usa aquí, el término "temperatura alta" se referirá a una temperatura de almacenamiento que es superior a -18 °C. Preferiblemente, dicha alta temperatura es mayor que una temperatura seleccionada del grupo que consiste en 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42 , 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50 °C o incluso más alta. Sin embargo, una limitación para la temperatura de almacenamiento es la temperatura de desnaturalización, que está en el rango de 45 - 80 °C, dependiendo de la naturaleza de la proteína respectiva y las condiciones del medio.

Como se usa aquí, el término "almacenamiento a largo plazo" se referirá al almacenamiento de una composición que comprende la formulación farmacéutica durante más de 1 mes, preferiblemente por más de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23 o incluso 24 meses.

En otro ejemplo de la divulgación, dicho fármaco biofarmacéutico es una proteína. Dicha proteína puede ser una proteína de origen natural, una proteína modificada (es decir, una proteína que ha sido modificada con respecto a su contraparte natural, también llamada andamio o plantilla) o una proteína totalmente sintética (es decir, una proteína que no tiene contraparte natural).

Dicha proteína puede aislarse de un organismo natural o puede obtenerse por fermentación de un organismo cultivado.

Adicinalmente, dicha proteína puede ser una proteína que es bien sea un homólogo o un heterólogo de la proteína que se ha obtenido del organismo.

Se prefiere particularmente que dicha proteína esté presente en una forma acuosa de la formulación farmacéutica en una concentración de entre ≥ 0,1 y ≤ 500 mg ml^{-1}, preferiblemente entre ≥ 20 y ≤ 200 mg ml^{-1}.

Se prefiere particularmente que dicha proteína sea un anticuerpo monoclonal, o un fragmento o derivado del mismo.

Como se usa aquí, la expresión "anticuerpo monoclonal (mAb)" se referirá a una composición de anticuerpo que tiene una población de anticuerpos homogénea, es decir, una población homogénea que consiste en una inmunoglobulina completa, o un fragmento o derivado de la misma. Particularmente preferido, tal anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en IgG, IgD, IgE, IgA y/o IgM, o un fragmento o derivado del mismo.

Como se usa aquí, el término "fragmento" se referirá a fragmentos de dicho anticuerpo que retienen, en algunos casos, capacidades de unión a objetivos, por ejemplo

- una CDR (región determinante de complementariedad)
- una región hipervariable,
- un dominio variable (Fv)
- una cadena pesada de IgG (que consiste de las regiones VH, CH1, bisagra, CH2 y CH3)

● una cadena ligera de IgG (que consiste de regiones VL y CL), y/o

● un Fab y/o $F(ab)_2$.

Como se usa aquí, el término "derivado" se referirá a construcciones de proteínas que son estructuralmente diferentes de, pero que todavía tienen alguna relación estructural con, el concepto de anticuerpo común, por ejemplo, scFv, Fab y/o $F(ab)_2$, así como constructos de anticuerpos específicos bi - tri- o superiores. Todos estos ítems se explican a continuación.

Otros derivados de anticuerpos conocidos por el experto en la materia son los Diacuerpos, Anticuerpos de camélidos, Anticuerpos de Dominio, homodímeros bivalentes con dos cadenas que consisten en scFvs, IgA (dos estructuras IgG unidas por una cadena J y un componente secretor), anticuerpos de tiburón, anticuerpos que consisten en un marco de primate del nuevo mundo más CDR de primate no del nuevo mundo, conmstructos dimerizados que comprenden CH3 + VL + VH, y conjugados de anticuerpos (por ejemplo, anticuerpo o fragmentos o derivados enlazados a una toxina, una citoquina, un radioisótopo o una etiqueta).

Los métodos para la producción y/o selección de mAbs quiméricos, humanizados y/o humanos son conocidos en la técnica. Por ejemplo, el documento US6331415 de Genentech describe la producción de anticuerpos quiméricos, mientras que el documento US6548640 del Medical Research Council describe técnicas de injerto de CDR y el documento US5859205 de Celltech describe la producción de anticuerpos humanizados. Las bibliotecas de anticuerpos in vitro se divulgan, entre otros, en los documentos US6300064 de MorphoSys y US6248516 de MRC/Scripps/Stratagene. Las técnicas de despliegue de fagos se divulgan, por ejemplo, en el documento US5223409 de Dyax. Las plataformas de mamíferos transgénicos se describen, por ejemplo, en el documento US200302048621 por TaconicArtemis.

IgG, scFv, Fab y/o $F(ab)_2$ son formatos de anticuerpos bien conocidos por la persona experta. Las técnicas de habilitación relacionadas están disponibles en los respectivos libros de texto.

Como se usa aquí, el término "Fab" se refiere a un fragmento de IgG que comprende la región de unión al antígeno, estando dicho fragmento compuesto por un dominio constante y uno variable de cada cadena pesada y ligera del anticuerpo.

Como se usa aquí, el término "$F(ab)_2$" se refiere a un fragmento de IgG que consiste en dos fragmentos de Fab conectados entre sí mediante enlaces disulfuro.

Como se usa aquí, el término "scFv" se refiere a un fragmento variable monocatenario que es una fusión de las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de inmunoglobulinas, unidas entre sí con un enlazante corto, usualmente serina (S) o glicina (G) . Esta molécula quimérica retiene la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y la introducción de un péptido elazante.

Los formatos de anticuerpos modificados son, por ejemplo, constructos de anticuerpos biespecíficos o triespecíficos, proteínas de fusión basadas en anticuerpos, inmunoconjugados y similares.

En un ejemplo particularmente preferido divulgado aquí, dicha proteína es al menos un anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, seleccionado del grupo que consiste en:

● anticuerpo derivado de hibridoma

● anticuerpo quimerizado

● anticuerpo humanizado, y/o

● anticuerpo humano.

En otro ejemplo preferido divulgado aquí, dicho anticuerpo, o fragmento o derivado del mismo, es un anticuerpo anti-TNFα.

Un ejemplo para un anticuerpo anti-TNFα se define mediante el listado de secuencias incluido en esta solicitud. En ella, SEQ ID No 1 define la secuencia de ácido nucleico codificante de la cadena pesada de IgG, SEQ ID No 2 define la secuencia de ácido nucleico codificante de la cadena ligera de IgG, y SEQ ID Nos 3 y 4 definen las secuencias de aminoácidos de la cadena pesada y la cadena ligera, respectivamente.

Las SEQ ID Nos 5, 7 y 9 definen las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de la cadena ligera (es decir, LC CDR 3, LC CDR 2 y LC CDR 1). Las SEQ ID Nos 6, 8 y 10 definen las secuencias de aminoácidos de las regiones determinantes de complementariedad de la cadena pesada (es decir, HC CDR 3, HC CDR 2 y HC CDR 1).

Tengase en cuenta que las SEQ ID Nos 1 y 2, o partes de las mismas, pueden ser reemplazadas de manera equivalente por

● secuencias de ácidos nucleicos que codifican las mismas proteínas, o las cadenas de proteínas, codificadas por las SEQ ID Nos 1 y 2, pero tienen sustituciones de nucleótidos que son tolerables bajo la degeneración del código genético,

● secuencias que codifican una fracción, variante, homólogo o derivado de las proteínas, o las cadenas de proteínas, codificadas por las SEQ ID Nos 1 y 2,

● secuencias de ácido nucleico que están optimizadas por código para un anfitrión de expresión dado, y/o

● molécula de ácido nucleico que tiene una identidad de secuencia de al menos 70, preferiblemente 95% con SEQ ID No 1 o 2

Obsérvese que las SEQ ID Nos 3 - 10, o partes de la misma, pueden reemplazarse de forma equivalente por secuencias de aminoácidos que llevan una o más sustituciones conservadoras de aminoácidos, es decir, una o más sustituciones que no afectan a características proteicas significativas, como afinidad de unión a objetivo, inmunogenicidad, respuesta ADCC, vida media en suero, solubilidad, y así sucesivamente.

Otros anticuerpos preferidos son anticuerpos que reconocen una cualquiera o una combinación de proteínas que incluyen, pero no se limitan a, cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente y/o los siguientes antígenos: CD2, CD3, CD4, CD8, CD11a, CD14, CD18, CD20. , CD22, CD23, CD25, CD33, CD40, CD44, CD52, CD80 (B7.1), CD86 (B7.2), CD147, IL-la, IL-1, IL-2, IL-3, IL-7 , IL-4, IL-5, IL-8, IL-10, receptor IL-2, receptor IL-4, receptor IL-6, receptor IL-13, subunidades del receptor IL-18, PDGF-β y análogos de los mismos, PLGF, VEGF, TGF, TGF-β2, TGF-pl, receptor de EGF, receptor de PLGF, receptor de VEGF, factor de crecimiento de hepatocitos, ligando de osteoprotegerina, interferón gamma, estimulador de linfocitos B, complemento C5, IgE, antígeno tumoral CA125, antígeno tumoral MUC1, antígeno PEM, ErbB2/HER-2, epítopos asociados a tumores que están presentes en niveles elevados en los sueros de pacientes, epítopos o proteínas asociados al cáncer expresados en células de cáncer de mama, colon, células escamosas, próstata, páncreas, pulmón y/o de riñón y/o en células de melanoma, glioma, o del neuroblastoma, el núcleo necrótico de un tumor, integrina alfa 4 beta 7, la integrina VLA-4, integrinas B2, receptores TRAIL 1,2,3 y 4, RANK, un ligando RANK, TNF-α, la molécula de adhesión VAP-1, molécula de adhesión de células epiteliales (EpCAM), molécula de adhesión intercelular-3 (ICAM-3), adhesina leucointegrina, glucoproteína plaquetaria gp IIb/IIIa, cadena pesada de miosina cardíaca, hormona paratiroidea, MHC I, antígeno carcinoembrionario (CEA) , alfa-fetoproteína (AFP), factor de necrosis tumoral (TNF), receptor Fc-y-1, HLA-DR 10 beta, antígeno HLA-DR, L-selectina e IFN-γ.

Es particularmente preferido que dicho anticuerpo sea una IgG.

Alternativamente, dicho fármaco biofarmacéutico es un mimético de anticuerpo, es decir, una molécula de proteína de unión a objetivo no basada en inmunoglobulina. Muchas de las técnicas mencionadas anteriormente son aplicables para estas moléculas de la misma forma. Tales miméticos de anticuerpos se derivan, por ejemplo, de Proteínas de Repetición de Anquirina, Lectinas de tipo C, proteínas de dominio A de Staphylococcus aureus, transferrinas, Lipocalinas, Fibronectinas, inhibidores de proteasa de dominio Kunitz, ubiquitina, nudos de cisteína o nudostinas, tiorredoxina A, etc. y son conocidos por el experto en la técnica a partir de la literatura respectiva.

En otra alternativa, dicho fármaco biofarmacéutico es una proteína de fusión recombinante que comprende cualquiera de las proteínas mencionadas anteriormente o proteínas sustancialmente similares. Por ejemplo, las proteínas de fusión recombinantes que comprenden una de las proteínas anteriormente mencionadas más un dominio de multimerización, tal como una cremallera de leucina, una espiral en espiral, una porción Fc de un anticuerpo, o una proteína sustancialmente similar, pueden ser un fármaco biofarmacéutico comprendido en las formulaciones divulgadas aquí. Específicamente incluidas entre tales proteínas de fusión recombinantes están las proteínas en las que al menos una porción de TNFR o RANK está fusionada a una porción Fc de un anticuerpo. Particularmente preferidas, dichas proteínas de fusión recombinantes comprenden un dominio de unión a objetivo y el dominio Fc de IgG (las denominadas moléculas -cept).

En aún otra realización preferida de la presente invención, la formulación comprende además al menos un estabilizante seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido, un poliol de azúcar, un disacárido y/o un polisacárido.

Preferiblemente, dicho disacárido es un agente seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, maltosa y/o lactosa.

Asimismo, preferiblemente, dicho poliol de azúcar es un agente seleccionado del grupo que consiste en manitol y/o sorbitol. Entre estos, el manitol es un poliol de azúcar particularmente preferido. Preferiblemente, se usa como el único poliol de azúcar, o incluso el único estabilizante en la formulación farmacéutica de acuerdo con la presente invención.

Los estabilizadores que caen bajo la definición anterior se mencionan en la siguiente tabla:

Tabla 2

nombre común	nombre científico	Formula neta
Arginina	Ácido (S)-2-amino-5-guanidinopentanoico	$C_6H_{14}N_4O_2$
Glicina	Ácido aminoacético	$C_2H_5NO_2$
Manitol	(2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-Hexano-1,2,3,4,5,6-hexol	$C_6H_{14}O_6$
sorbitol	(2S,3R,4R,5R)-Hexano-1,2,3,4,5,6-hexol	$C_6H_{14}O_6$
Xilitol	(2*R*,3*R*,4*S*)-Pentano-1,2,3,4,5-pentol	$C_5H_{12}O_5$
Sacarosa	β-D-fructofuranosol-(2→1)-α-D-glucoporanoside	$C_{12}H_{22}O_{11}$
Trehalosa	α- D -glucopiranosil α-D-glucoporanoside	$C_{12}H_{22}O_{11}$
Lactosa	4-*O*-β-D-galactopiranosil-D-glucosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$
Maltosa	4-*O*-α-D-Glucopiranosil-D-glucosa	$C_{12}H_{22}O_{11}$
Dextrano	polisacárido	$H(C_6H_{10}O_5)_XOH$

Se prefiere particularmente que dicho estabilizador esté presente en una forma acuosa de la formulación farmacéutica en una concentración de entre ≥ 1 mM y ≤ 300 mM, preferiblemente entre ≥ 2 mM y ≤ 200 mM, y más preferiblemente entre ≥ 5 mM y ≤ 150 mM. De acuerdo con la presente invención, dicha formulación es una formulación adecuada para administración parenteral, preferiblemente para administración intravenosa, intramuscular y/o subcutánea.

En aún otra realización preferida de la presente invención, dicha formulación comprende además al menos un agente seleccionado del grupo que consiste en:

- un surfactante
- un agente isotonizante, y/o
- un quelante de iones metálicos.

Dicho surfactante mejora la capacidad de humectación de los componentes y respalda su solubilidad. Esto es particularmente importante porque los fármacos biofarmacéuticos frecuentemente se formulan en altas concentraciones (por ejemplo,> 100 mg en 1 - 10 ml).

Surfactantes adecuados son, por ejemplo, lecitina y otros tensioactivos no iónicos, como Polisorbatos ("Tween") o poloxámeros. Los tensioactivos particularmente preferidos son Polisorbato 80 ("Tween 80") o Poloxámero 188.

Dicho agente isotonizante sirve para ajustar la presión osmótica de la formulación de acuerdo con la invención a un valor fisiológicamente aceptable, por ejemplo a la osmolaridad de la sangre.

El agente isotonizante es un componente fisiológicamente aceptable y no está particularmente limitado. Ejemplos típicos del agente isotonizante son, por ejemplo, una sal inorgánica tal como cloruro de sodio, cloruro de potasio o cloruro de calcio, y similares. Estos pueden usarse solos o en una mezcla de los mismos.

Dicho quelante de iones metálicos sirve para la formación compleja de metales pesados, que de lo contrario puede inactivar el fármaco biofarmacéutico comprendido en la formulación de acuerdo con la invención. Preferiblemente, dicho quelante de iones metálicos es EDTA y/o EGTA.

También se divulga un fármaco biofarmacéutico, siendo dicho fármaco formulado en una formulación de acuerdo con el primer aspecto divulgado anteriormente.

También se diculga un empaque primario, tal como una jeringa o lápiz precargado, un vial o una bolsa de infusión, que comprende la formulación de acuerdo con el primer aspecto de la invención y/o dicho fármaco biofarmacéutico de acuerdo con el segundo aspecto de la divulgación.

La jeringa o lápiz precargado puede contener la formulación ya sea en forma liofilizada (que luego tiene que solubilizarse, por ejemplo, con agua para inyección, antes de la administración), o en forma acuosa. Dicha jeringa o lápiz frecuentemente es un artículo desechable para un solo uso, y puede tener un volumen entre 0.1 y 20 ml. Sin embargo, la jeringa o el lápiz también pueden ser una jeringa o lápiz de múltiples usos o multidosis.

Dicho vial también puede contener la formulación en forma liofilizada o en forma acuosa, y puede servir como un dispositivo de uso único o múltiple. Como un dispositivo de uso múltiple, dicho vial puede tener un volumen mayor.

Dicha bolsa de infusión usualmente contiene la formulación en forma acuosa y puede tener un volumen entre 20 y 5000 ml.

Se divulga adicionalmente el uso de una formulación farmacéutica y/o dicho fármaco biofarmacéutico y/o dicho empaque primario de acuerdo con el primero, segundo y tercer aspecto, respectivamente, de la presente divulgación para el tratamiento de al menos una condición patológica seleccionada del grupo. que consiste en:

- enfermedades autoinmunes
- enfermedades infecciosas
- enfermedades neoplásicas y/o malignas (cáncer), y/o
- enfermedades del sistema nervioso.

Las enfermedades autoinmunes adecuadas son las enfermedades artríticas y reumáticas, como la psoriasis, enfermedad de Crohn o la artritis reumatoide. Las enfermedades infecciosas adecuadas son infecciones virales y/o bacterianas. Las enfermedades neoplásicas y/o malignas adecuadas son sarcomas, carcinomas, linfomas y leucemias, preferiblemente, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de próstata, cáncer de cuello uterino y similares. Las enfermedades adecuadas del sistema nervioso son, entre otras, trastornos neurodegenerativos como la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Alzheimer, la esclerosis múltiple, la enfermedad de Huntington o la esclerosis lateral amiotrófica.

Figuras y experimentos

Detalles adicionales, rasgos, características y ventajas del objeto de la invención se divulgan en las reivindicaciones dependientes, y la siguiente descripción de las Figuras y ejemplos respectivos, que, a manera de ejemplo, muestran ejemplos preferidos de la divulgación y realizaciones de la presente invención. Sin embargo, estos dibujos no deberían entenderse en modo alguno como que limitan el alcance de la invención.

En los experimentos descritos a continuación, las formulaciones de acuerdo con la presente divulgación, que incluyen la invención, experimentaron condiciones de estrés particulares que son adecuadas para promover la agregación. Los experimentos son por lo tanto relevantes para demostrar una prevención eficiente de la agregación efectuada por las formulaciones de acuerdo con la presente invención.

1. Breve descripción de las Figuras

Figura 1: Agregación inducida por esfuerzo cortante en condiciones "rigurosas" medidas mediante dispersión dinámica de la luz (DLS) y expresada como radio de proteína promedio (Z-Promedio. Fig. 1a) e índice de polidispersidad (PdI: Fig. 1b). El valor promedio respectivo de la formulación de control que comprende ácido cítrico y NaP denotados por la línea horizontal. El nivel de agregación es directamente proporcional al PdI y aumenta el radio de proteína promedio (Z-Promedio), lo que significa que las composiciones con Z-Promedio y/o PdI debajo de la línea horizontal muestran un comportamiento de agregación mejorado (es decir, reducido) que la formulación de control. Los datos subyacentes al gráfico en la Fig. 1 se muestran en la Tabla 6.

Figura 2: Agregación inducida por congelación-descongelación (FT) en condiciones "rigurosas" medidas por DLS y expresadas como Z-Promedio (Figura 2a) y PdI (Figura 2b). El valor promedio respectivo de la formulación de control se denota por la línea horizontal. El nivel de agregación es directamente proporcional al PdI y aumenta el radio de proteína promedio (Z-Promedio), lo que significa que las composiciones con Z-Promedio y/o PdI debajo de la línea horizontal muestran un comportamiento de agregación mejorado (es decir, reducido) que la formulación de control. Los datos subyacentes al gráfico en la Fig. 2 se muestran en la Tabla 6.

Figura 3: Se realizaron estudios de estabilidad con diferentes reguladores en una formulación que contenía NaCl 105 mM, Tween 80 al 0,1% y manitol 66 mM, el pH se mantuvo en 5,2. La concentración de anticuerpo fue de 50 mg/ml. Las muestras se almacenaron a diferentes temperaturas (5ºC, 25ºC y 40ºC) y se analizaron por cromatografía de exclusión por tamaño para determinar la pureza (Figura 3a) y los niveles agregados (AP = picos agregados, Figura 3b). Los datos subyacentes a los gráficos en la Fig. 3 se muestran en la Tabla 7.

Figura 4: Se realizaron estudios adicionales de estabilidad basados en Generación de Imágenes en Microflujo (MFI) para detectar partículas subvisibles, con las mismas condiciones que se delinean en la Figura 3. Se muestran cuatro ensayos diferentes, con diferentes tamaños de partículas (5-10 µm (Fig. 4a) vs.> 10 µm (Fig. 4b)). Los datos subyacentes a los gráficos en la Fig. 4 se muestran en la Tabla 8.

2. Experimentos

Antes de describir los experimentos y sus resultados en detalle, se menciona que dichos experimentos se realizaron con formulaciones farmacéuticas en las que el ingrediente activo era un anticuerpo anti-TNF-α (IgG humanizada, peso molecular de aproximadamente 150 kD). Debido a la similitud estructural de los anticuerpos que comparten el concepto de IgG, el experto comprenderá que los resultados obtenidos aquí pueden transferirse directamente a formulaciones farmacéuticas que comprenden anticuerpos basados en IgG murínicos, de conejo, quiméricos, humanizados y/o humanos, y/o anticuerpos dirigidos contra otros objetivos, por ejemplo, anti-EGFR, anti-ErbB2, anti-CD 20, anti-VEGF y otros (véase la lista de objetivos potenciales más arriba). Además, la persona experta también reconocerá que este concepto también puede transferirse a miméticos de anticuerpos, derivados de anticuerpos, formatos de anticuerpos modificados o proteínas de fusión recombinantes, como se definió anteriormente.

Además, aunque algunas de las combinaciones de regulador/estabilizador que son particularmente preferidas se describen explícitamente, y verbalmente, en el texto, el experto reconocerá que en las diferentes Figuras y tablas, se pueden encontrar combinaciones de regulador/estabilizador específicas que funcionan mejor, o igualmente, en comparación con el regulador de control respectivo. Estas combinaciones, aunque no se divulgan explícita y verbalmente en el texto, se consideran divulgadas de manera inequívoca como combinaciones específicas y, por lo tanto, pueden servir como posiciones secundarias durante el enjuiciamiento de la presente solicitud o las respectivas aplicaciones divisionales o de continuación.

3. Material

Para la selección de la formulación, se utilizó un anticuerpo monoclonal que tiene actividad anti-TNF-α como un anticuerpo de ejemplo. El anticuerpo se expresó en un clon derivado de la línea celular SSF3 (derivado de CHO) y se purificó mediante las etapas de purificación de cromatografía de afinidad de proteína A, cromatografía de intercambio catiónico (CEX) y cromatografía de intercambio aniónico (AEX). El anticuerpo se concentró a aproximadamente 50 mg/ml en el regulador deseado y se almacenó en alícuotas de 1 ml a una temperatura inferior a -60ºC.

4. Preparación de la formulación para los estudios de selección

En el estudio presentado, se probaron combinaciones de diferentes ácidos/sales carboxílicos y estabilizantes (Tablas 3a y 3b, respectivamente). En algunos casos, se utilizó una mezcla de dos ácidos carboxílicos diferentes o una mezcla de un ácido carboxílico y fosfato de sodio (NaP).

La mayoría de las formulaciones están de acuerdo con la divulgación, es decir, relacionadas con una composición que comprende al menos un ácido mono o dicarboxílico con un esqueleto de 2 - 6 átomos de C, o al menos una sal del mismo.

Algunas formulaciones comprenden ácido cítrico y, por lo tanto, representan la técnica anterior. Aquí, estas formulaciones sirven como controles y/o comparaciones.

Todas las formulaciones probadas contenían NaCl 105 mM, Tween 80 al 0,1% y se formularon a un pH de aproximadamente 5,2. Las formulaciones finales se prepararon a partir de soluciones madre. Los primeros 988 µL de formulación se prepararon mezclando 870 µL de ácido/sal 23 mM (Tabla 3a), 22 µL de NaCl 5M, 81 µL de estabilizador 817 mM (Tabla 3b) y 15 µL surfactante Tween 80 50 mM. En una ejecución se prepararon 42 formulaciones (7 estabilizadores de ácido/sal x 6) en una placa de pozos profundos. Se transfirieron 470 µL de mezcla de formulación a una placa de pozos profundos de dilución de proteínas, donde se añadieron 30 µL del anticuerpo a una concentración de aproximadamente 50 mg/ml en columnas de número par y se mezclaron. La concentración de proteína objetivo fue por lo tanto 3 mg/ml.

Las formulaciones de placebo (formulación sin proteína) se prepararon en columnas impares, mediante la adición de 30 µL de agua pura. Finalmente, se transfirieron 100 µl de cada formulación preparada a cuatro Placas Greiner de media área transparente a UV (placas MTP). La concentración de proteína y la dispersión debida a la agregación se evaluaron inmediatamente después de la preparación de la placa MTP midiendo la relación A280 y A340/A280 en un espectrofotómetro Tecan Infinite 200. Las placas MTP se sellaron y expusieron a ensayos de estrés apropiados. Cada placa MTP se preparó por duplicado.

Además de los estudios de estabilidad de estrés, se evaluó el efecto de la composición de formulación respectiva sobre la estabilidad termodinámica del anticuerpo anti-TNF-α. Para ese propósito, las formulaciones se prepararon como se describió anteriormente a una concentración de proteína de 1 mg/ml.

Tabla 3a: Lista de ácidos/sales probados para los experimentos en las Figuras 1 y 2 (Tabla 6). Todas las soluciones contenían NaCl 105 mM, Tween 80 al 0,1% y se formularon a un pH de aproximadamente 5,2.

Formulación reguladora No.	ácido/sal
1	Glutamato 20 mM
2	ácido Aconítico 20 mM
3	ácido ascórbico 20 mM
4	ácido málico 20 mM
5	ácido Tartárico 20 mM
6	ácido adípico 20 mM
7	Ácido cítrico 20 mM
8	Glutamato 5 mM + NaP 20 mM
9	ácido málico 5 mM + NaP 20 mM
10	ácido Tartárico 5 mM + NaP 20 mM
11	ácido adípico 5 mM + NaP 20 mM
12	Glutamato 20 mM + Ácido cítrico 5 mM
13	ácido málico 20 mM + Ácido cítrico 5 mM

Formulación reguladora No.	ácido/sal
14	ácido tartárico 20 mM + Ácido cítrico 5 mM
15	ácido adípico 20 mM + Ácido cítrico 5 mM

Tabla 3b: Lista de estabilizadores probados en combinaciones con los ácidos/sales de la Tabla 3a.

estabilizador No.	Estabilizador
1	Manitol
2	Glicina
3	Trehalosa
4	Sorbitol
5	Sacarosa
6	NInguno*
* se preparó un conjunto de formulaciones sin estabilizadores	

En una ejecución, se probaron 7 ácidos/sales orgánicos (B1 a B7) y 5 estabilizadores (Man = manitol, Gly = glicina, Thr = trehalosa, Sor = sorbitol y Suc = sacarosa). Las formulaciones de placebo (sin proteína, marcada con "B") se colocaron en columnas de numeración impar, mientras que las formulaciones que contenían proteína (marcada con "P") se colocaron en columnas pares.

Una formulación comercialmente disponible que comprende un anticuerpo anti-TNFα en una solución que comprende fosfato de sodio 14.1 mM, citrato 7.2 mM, NaCl 105.5 mM, Tween 80 al 0.1% y manitol 65.9 mM se usó como una formulación de control (CT = control). El diseño de la placa se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4: Diseño de placa para la selección de 42 formulaciones.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	B1	P1	B1 + Man	P1 + Man	B1 + Gly	P1 + Gly	B1 + Thr	P1 + Thr	B1 + Sor	P1 + Sor	B1 + Sue	P1 + Suc
B	B2	P2	B2 + Man	P2 + Man	B2 + Gly	P2 + Gly	B2 + Thr	P2 + Thr	B2 + Sor	P2 + Sor	B2 + Sue	P2 + Suc
C	B3	P3	B3 + Man	P3 + Man	B3 + Gly	P3 + Gly	B3 + Thr	P3 + Thr	B3 + Sor	P3 + Sor	B3 + Sue	P3 + Suc
D	B4	P4	B4 + Man	P4 + Man	B4 + Gly	P4 + Gly	B4 + Thr	P4 + Thr	B4 + Sor	P4 + Sor	B4 + Sue	P4 + Suc

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
E	B5	P5	B5 + Man	P5 + Man	B5 + Gly	P5 + Gly	B5 + Thr	P5 + Thr	B5 + Sor	P5 + Sor	B5 + Sue	P5 + Suc
F	B6	P6	B6 + Man	P6 + Man	B6 + Gly	P6 + Gly	B6 + Thr	P6 + Thr	B6 + Sor	P6 + Sor	B6 + Sue	P6 + Suc
G	B7	P7	B7 + Man	P7 + Man	B7 + Gly	P7 + Gly	B7 + Thr	P7 + Thr	B7 + Sor	P7 + Sor	B7 + Sue	P7 + Suc
H	CT	CT+P	CT	CT+P	CT	CT+P	CT	CT+P	CT	CT+P	CT	CT+P
	B		B+M		B+ Gly		B+ Thr		B+Sor		B+ Suc	

5. Métodos

5.1 Ensayos de estrés

La selección de la formulación se realizó exponiendo las formulaciones a dos ensayos de estrés (congelación/descongelación y agitación, respectivamente) en condiciones "suaves" y "rigurosas". Las condiciones "suaves" son las siguientes:

● 3 x FT (congelación a -20 ºC y descongelación a temperatura ambiente)

● agitación a 400 RPM, 40 ºC durante 5 días

Las condiciones "rigurosas" fueron las siguientes:

● 10 x FT (congelación a -20 ºC y descongelación a temperatura ambiente)

● agitación a 600 RPM, 40 ºC durante 7 días

5.2 Turbidez (opalescencia) - absorbancia a 340 nm

Las mediciones de claridad o turbidez (opalescencia) se basan en el hecho de que los haces incidentes se atenúan debido a la dispersión de la luz. La presencia de partículas suspendidas uniformemente como agregados de proteína insolubles y precipitados conduce a un aumento aparente en la absorbancia UV en todas las longitudes de onda debido a los efectos de dispersión. Por lo tanto, la turbidez de las formulaciones se midió como absorbancia fotométrica a 340 nm, donde ninguno de los cromóforos intrínsecos conocidos en la formulación de proteína se absorben, con un lector de placas Tecan Infinite 200.

Después de 30 s de placa de MTP que sacudía la absorbancia a 280 nm, se midieron 340 nm, 900 nm y 999 nm. La absorbancia A280 y A340 en cada pozo fue corregida por la longitud de la trayectoria multiplicando por factor (A999-A900) /0.147. Además, la absorbancia de las soluciones de proteínas se corrigió en el fondo restando la absorbancia respectiva de la muestra de placebo. La concentración de proteína se derivó de esta manera a medida que se corregía la longitud de la trayectoria y se restó el fondo A280 dividido por el factor 1,39 de absorbancia del anticuerpo anti-TNF-α y se expresó en mg/ml. La turbidez se expresó como la relación entre los valores de fondo restados A340 y A280.

5.3 Dispersión de luz dinámica (DLS)

El análisis DLS se realizó con el sistema Malvern APS a una temperatura de 25 ºC con un láser semiconductor con una longitud de onda de 830 nm en un ángulo de dispersión de 90 °. El método se basa en la medición de la intensidad total de la luz dispersada, que es proporcional a la concentración de proteína y al tamaño molecular de las partículas de dispersión. La escala de tiempo de las fluctuaciones de la intensidad de la luz dispersa se analizó por autocorrelación usando el software Malvern DLS. Antes de cada medición, la placa MTP se agitó suavemente para evitar la sedimentación de partículas insolubles. De acuerdo con el planificador de placas, 20 µL de la muestra se

transfirieron automáticamente a la celda de medición y se devolvieron a su estado después de la medición. Para cada medición, la fluctuación de la intensidad de dispersión se registró 13 veces durante un intervalo de tiempo de 5 s para determinar la función de autocorrelación de intensidad. Aplicando parámetros del modelo de distribución multimodal como el radio de proteína hidrodinámico promedio Z-Promedio (nm), se derivaron el índice de polidispersidad PdI, radio hidrodinámico de los tres primeros picos, área de intensidad de tres primeros picos, etc. La proteína no agregada se describe por una distribución de tamaño monodispersa. La agregación de proteínas da como resultado múltiples picos poli-dispersos en la distribución de tamaños. El nivel de agregación se evalúa tradicionalmente mediante el aumento del índice de polidispersidad (PdI) y el aumento del radio de proteína promedio (Z-Promedio).

5.4 Estabilidad termodinámica

Se realizaron mediciones de calorimetría diferencial de barrido (DSC) usando un calorímetro Auto Cap-DSC de MicroCal, LLC (Northampton, MA, EE.UU.). Para cada medición, 400 µl de la muestra (formulación que contiene proteína) y referencia (formulación de placebo) se transfirieron a una placa de microtitulación de 96 pozos. El instrumento Auto Cap-DSC se ejecutó con un tiempo de equilibrio de 15 minutos antes y entre los barridos a 60 ºC/h. Las muestras se escanearon de 30 a 95 ºC con enfriamiento rápido entre las exploraciones. Los datos de DSC se corrigieron para las líneas base de los instrumentos y se normalizaron para la tasa de exploración y la concentración de proteínas. La capacidad de calor en exceso (Cp) se expresó en kcal • $K^{-1}mol^{-1}$, en donde 1.000 cal = 4.184 J. La conversión de datos y el análisis se realizaron con el software Origin (OriginLab Corporation, Northampton, MA, EE.UU.). Como es común para las transiciones térmicas no reversibles de anticuerpos monoclonales, la estabilidad se evaluó mediante el desplazamiento de la temperatura de fusión del primer pico.

5.5 Generación de Imágenes en Microflujo

La Generación de Imágenes en Microflujo (MFI) es una tecnología de formación de imágenes que se utiliza para detectar y medir materia particulada subvisible y visible en soluciones. La tecnología captura imágenes digitales de partículas suspendidas en un fluido a medida que pasan por una zona de detección, que se analizan automáticamente para proporcionar un archivo digital de la relación de aspecto y la intensidad de los parámetros de partículas. Adicionalmente, los resultados se describen como el tamaño y el recuento de las partículas.

Antes del uso, el sistema de MFI se purgó con 0,9 ml de regulador de muestra. Posteriormente, se analizó 1 ml de solución de muestra con el sistema MFI. Los primeros 0.2 a 0.3 ml fueron descartados. Para evaluar la concentración de partículas, se analizaron al menos 25 imágenes. Después del análisis de 2000 partículas, la medición se detuvo. La evaluación adicional de los datos se realizó con el software de aplicación de MFI. Las muestras se pueden analizar con respecto a la distribución del tamaño o con el análisis de forma para obtener información adicional, por ejemplo, relación de aspecto.

5.6 Cromatografía de exclusión por tamaño

La cromatografía de exclusión por tamaño (SE-HPLC o SEQ) se usó para separar las variantes de masa molecular inferior y superior de la proteína, así como cualquier impureza e ingredientes de formulación.

Los resultados se describieron como la suma de los picos de agregación (AP) y la suma de los picos de degradación (DP). En SEQ, la identidad de las muestras de prueba se determinó comparando el tiempo de retención cromatográfica de los picos principales con el tiempo de retención del pico principal de un estándar de referencia.

SEQ se realizó utilizando una columna Tosoh Bioscience TSK-Gel G3000SWXL (5 µ m, 250 Å, 7.8 mm I.D. x 300 mm de longitud) (Tosoh Bioscience, Stuttgart, Alemania) y una fase móvil que contiene 150 mM de fosfato de potasio, pH 6,5. La tasa de flujo se ajustó a 0,4 ml/min y la temperatura de la columna a 30 ºC. Las muestras se diluyeron con la fase móvil a una concentración de 0,75 mg/ml y el volumen de inyección fue de 10 µl.

6. Estudios de confirmación

Para confirmar los resultados obtenidos mediante los estudios de selección de formulación descritos más arriba, se estableció un estudio de estabilidad. El anticuerpo se preparó como se especifica más arriba y adicionalmente se dializó en diferentes sistemas reguladores. Las formulaciones preparadas contenían NaCl 105 mM, Tween 80 al 0.1% y manitol 66 mM, el pH se mantuvo a 5.2. La concentración de anticuerpo fue de 50 mg/ml. Las muestras se almacenaron a diferentes temperaturas (5 ºC, 25 ºC y 40 ºC) y se analizaron mediante Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SE-HPLC) para determinar la pureza y los niveles de agregado, así como la Generación de Imágenes en Microflujo (MFI) para detectar partículas subvisibles. Mientras que con SE-HPLC, particularmente se pueden detectar agregados diméricos, triméricos, tetrámeros y pentámeros del anticuerpo respectivo (es decir, agregados con un peso molecular de hasta 800 kD), la Generación de Imágenes en Microflujo (MFI) sirve para detectar partículas subvisibles en un rango de tamaño de 5 - 30 µm, es decir, aproximadamente de 1000 x agregados más grandes que aquellos detectables por SE-HPLC.

7. Resultados

Con el fin de identificar las composiciones de formulación que protegen el anticuerpo anti-TNF-α de la agregación al mismo nivel que la formulación de control, se seleccionaron diversas formulaciones diferentes (Tabla 3) en dos rondas. En una primera ronda, las formulaciones que contenían anticuerpo anti-TNF-α se expusieron a dos ensayos de estrés en condiciones "suaves" (3 x FT) y agitación a 400 RPM, 40ºC durante 5 días. Después del primer experimento de estrés, el nivel de agregación en cada muestra se determinó midiendo la distribución del tamaño usando DLS.

Además de la evaluación del potencial de protección de la agregación, se midió el efecto de las formulaciones seleccionadas sobre la estabilidad termodinámica del anticuerpo anti-TNF-α para mostrar además la adecuabilidad de las formulaciones de la invención para mantener la integridad estructural del fármaco biofarmacéutico almacenado en el mismo. Los termogramas de DSC se escanearon a partir de 30-90 ºC. Las temperaturas de fusión (Tm, temperatura del primer pico) del anticuerpo anti-TNF-α dentro de las formulaciones seleccionadas de acuerdo con la divulgación estaban en el rango de aproximadamente 70 ºC a aproximadamente 72 ºC, que es comparable a la temperatura de fusión respectiva. dentro de la formulación de control (Tm = 71.46 ± 0.06 ºC (N = 11)). Los valores detallados de Tm se dan en la Tabla 5. En la Tabla 5, las formulaciones que comprenden solamente ácidos tricarboxílicos, ácido aconítico o ácido cítrico como ácido/sal carboxílico sirven como controles, y están impresas en cursiva y marcadas con un asterisco (*).

Con base en los datos DLS y DSC obtenidos con la condición "leve", se seleccionan las siguientes formulaciones que contienen Adípico, Adípico+Cítrico, Adípico+NaP, Málico, Málico+Cítrico, Tartárico o Tartárico+Cítrico en combinación con y sin estabilizador (glicina, manitol, sorbitol, sacarosa o trehalosa), respectivamente, se seleccionaron para una evaluación adicional, esta vez bajo condiciones "rigurosas".

La selección se basó en su similitud de PdI, Z-Promedio y Tm en comparación con los valores respectivos de la formulación de control (lo que indica por adelantado su adecuabilidad para el uso médico humano). Para detectar cualquier comportamiento superior de las formulaciones probadas en comparación con la formulación de control, las muestras se seleccionaron adicionalmente en condiciones "rigurosas" (10 x FT y agitación a 600 RPM, 40ºC durante 7 días). Los experimentos se realizaron por duplicado.

La agregación inducida fue detectada por DLS (Tabla 6, Figuras 1 y 2). Las mediciones de turbidez no mostraron ninguna agregación. Sorprendentemente, la agregación fue significativamente más pronunciada para el anticuerpo anti-TNF-α formulado en la formulación de control (Figuras 1 y 2) que en las formulaciones de acuerdo con la divulgación, por ejemplo, que comprende un ácido mono o dicarboxílico.

La agregación evaluada por Z-Promedio (Fig. 1a) y PdI (Fig. 1b) después de agitar a 600 RPM durante 7 días a 40 ºC mostró que todas las combinaciones de regulador/estabilizador de acuerdo con la invención (por ejemplo, ácido adípico + manitol) demostraron un mejor rendimiento, es decir, un Z-Promedio o PdI más pequeño que el regulador de control (ácido cítrico/NaP + manitol), con la excepción de algunas combinaciones que comprenden ácido tartárico (Z-Promedio: ácido tartárico + manitol o sorbitol; ácido tartárico/ácido cítrico + manitol o sorbitol o trehalosa; PdI: ácido tartárico + manitol o sorbitol, ácido tartárico/ácido cítrico + manitol o sorbitol).

Tengase en cuenta que las desviaciones estándar resultantes indicadas por las barras de error son usualmente bastante pequeñas, lo que indica la significación estadística de la diferencia de rendimiento entre el control (valor de Z-Promedio o PdI del que se indica mediante la barra horizontal, es decir, 9,58 nm o 0,31) y el regulador respectivo. En contraste a eso, para las combinaciones que comprenden ácido tartárico que tienen un rendimiento peor que el regulador de control, se han observado grandes desviaciones estándar, lo que indica que los experimentos respectivos podrían haber estado sujetos a artefactos particulares.

Con respecto a los experimentos de congelación/descongelación, los resultados se muestran en las Figs. 2a y 2b. Estos experimentos muestran que bajo las condiciones respectivas todas las formulaciones probadas demuestran un comportamiento similar (indicado por barras de error grandes en el experimento PdI en la Fig. 2b), mientras que algunas formulaciones reivindicadas (por ejemplo, ácido adípico + manitol, sorbitol o sacarosa) funcionan significativamente mejor que la formulación de control.

Los resultados de los estudios de confirmación en los que se formularon diferentes reguladores en solución que comprende manitol (véase arriba) se muestran en las tablas 8 y 9, y las Figuras 3 y 4. Experimentos de cromatografía de exclusión por tamaños (SE-HPLC) después de 3 meses de estudio de estabilidad a 5, 25 y 40 ºC (Tabla 7) revelaron que, debido a la agregación y degradación del compuesto activo (anticuerpo anti-TNF-α), la pureza disminuyó a algo entre aproximadamente 98% (almacenamiento a 5 ºC) y 87% (almacenamiento a 40 ºC). En este experimento, todos los reguladores comparados se realizaron de manera similar. Véase la Fig. 3a para representación gráfica. La pureza inicial al comienzo de los experimentos estaba entre 99.2 y 93% para todas las formulaciones probadas.

Sin embargo, la suma de los picos de agregación también detectados con SE-HPLC fueron, para el regulador fosfato/citrato (control) significativamente mayor (1,8% a 40ºC de almacenamiento) que para la mayoría de los reguladores divulgados aquí, por ejemplo, 1,2% (ácido succínico) o 1,5% (ácido acético). Véase la Fig. 3b para la representación gráfica.

Los experimentos de Generación de Imágenes en Microflujo (MFI), en los que se contaron partículas de un determinado rango de tamaño en un volumen de muestra dado, sirvieron para detectar la formación de macroaggregaciones en el rango de 5 - 30 µm después de 3 meses de almacenamiento a 40ºC. Es evidente que en el rango de tamaño de 5-10 µm, todos los reguladores reivindicados se comportaron mejor que el regulador de control (es decir, ácido cítrico + NaP). Véase Fig. 4a para representación gráfica. El ácido adípico + manitol y el ácido acético + manitol se comportan particularmente bien bajo estas condiciones.

En el rango de tamaño de > 10 µm, todos los reguladores funcionan de tal manera que el número de partículas ml^{-1} está por debajo de 260, que es aproximadamente 30 x por debajo de los límites establecidos por la Farmacopea Europea (6.0), de acuerdo con lo cual la contaminación por partículas de inyecciones e infusiones está restringida a 7500 partículas ml^{-1} para partículas > 10 µm. Véase la Fig. 4a para una representación gráfica. Debido al buen rendimiento de todos los reguladores, el recuento de partículas fue muy pequeño, lo que significa que, estadísticamente, los resultados están sujetos a grandes desviaciones estándar relativas debido al pequeño recuento de partículas, lo que sugiere que las diferencias aparentes en el recuento medio de partículas no son significativas, entre el control y el ácido adípico.

Tabla 5: Efecto de la composición ácido/sal y el estabilizador en la temperatura de fusión medida por DSC

	Ácido/sal	Estabilizador	Tm(°C)
1	Control (posfato de sodio + citrato)	Manitol	71,45
2	*Aconítico**	*Manitol*	*70,47*
3	*Aconítico**	*Ninguno*	*70,04*
4	Adípico	Glicina	71,03
5	Adípico	Manitol	70,95
6	Adípico	Ninguno	70,8
7	Adípico	Sorbitol	71,06
8	Adípico	Sacarosa	71,1
9	Adípico	Trehalosa	71,02
10	Adípico Cítrico	Glicina	71,21
11	Adípico Cítrico	Manitol	70,96
12	Adípico Cítrico	Sorbitol	71,12
13	Adípico Cítrico	Sacarosa	71,24
14	Adípico Cítrico	Trehalosa	71,23

	Ácido/sal	Estabilizador	Tm(°C)
15	Adípico NaP	Glicina	71,47
16	Adípico NaP	Manitol	71,56
17	Adípico NaP	Sorbitol	71,49
18	Adípico NaP	Sacarosa	71,58
19	Adípico NaP	Trehalosa	71,74
20	Ascórbico	Manitol	70,94
21	Ascórbico	Ninguno	70,56
22	*Cítrico**	*Manitol*	*70,53*
23	*Cítrico**	*Ninguno*	*70,49*
24	Glutámico	Glicina	71,92
25	Glutámico	Manitol	71,51
26	Glutámico	Ninguno	70,89
27	Glutámico	Sorbitol	71,92
28	Glutámico	Sacarosa	71,82
29	Glutámico	Trehalosa	71,91
30	Glutámico Cítrico	Glicina	71,88
31	Glutámico Cítrico	Manitol	71,86
32	Glutámico Cítrico	Sorbitol	71,88
33	Glutámico Cítrico	Sacarosa	71,9
34	Glutámico Cítrico	Trehalosa	71,9
35	Glutámico NaP	Glicina	71,82
36	Glutámico NaP	Manitol	71,76
37	Glutámico NaP	Sorbitol	71,71

	Ácido/sal	Estabilizador	Tm(°C)
38	Glutámico NaP	Sacarosa	72,01
39	Glutámico NaP	Trehalosa	71,9
40	Málico	Glicina	71,19
41	Málico	Manitol	70,79
42	Málico	Ninguno	70,99
43	Málico	Sorbitol	71,19
44	Málico	Sacarosa	71,19
45	Málico	Trehalosa	71,31
46	Málico Cítrico	Glicina	71,38
47	Málico Cítrico	Manitol	71,28
48	Málico Cítrico	Sorbitol	71,33
49	Málico Cítrico	Sacarosa	71,4
50	Málico Cítrico	Trehalosa	71,4
51	Málico NaP	Glicina	71,41
52	Málico NaP	Manitol	71,66
53	Málico NaP	Sorbitol	71,8
54	Málico NaP	Sacarosa	71,98
55	Málico NaP	Trehalosa	71,73
56	NaP	Manitol	71,28
57	NaP	Ninguno	70,89
58	Tartárico	Glicina	71,4
59	Tartárico	Manitol	71,1
60	Tartárico	Ninguno	70,94

	Ácido/sal	Estabilizador	Tm(°C)
61	Tartárico	Sorbitol	71,46
62	Tartárico	Sacarosa	71,29
63	Tartárico	Trehalosa	71,28
64	Tartárico Cítrico	Glicina	71,71
65	Tartárico Cítrico	Manitol	71,45
66	Tartárico Cítrico	Sorbitol	71,53
67	Tartárico Cítrico	Sacarosa	71,74
68	Tartárico Cítrico	Trehalosa	71,72
69	Tartárico NaP	Glicina	71,6
70	Tartárico NaP	Manitol	71,65
71	Tartárico NaP	Sorbitol	71,77
72	Tartárico NaP	Sacarosa	71,92
73	Tartárico NaP	Trehalosa	71,91

Tabla 6: Estrés por desgarre corte o agregación inducida por congelación/descongelación en condiciones "rigurosas" medidas por DLS (dispersión de PdI-poli, Z-Promedio - radio promedio, N = 2, excepto para la formulación de control, donde N = 12)

		10 x FT				*600 RPM de agitación 7 días 40°C*			
		Z-Promedio (nm)		*Pdl*		*Z-Promedio (nm)*		*Pdl*	
Acid/Sal	*Estabilizador*	*Media*	*Desv Est.*	*Media*	*Desv Est.*	*Media*	*Desv Est.*	*Media*	*Desv Est.*
Control (fosfato de sodio + citrato)	Manitol	7,26	0,96	0,27	0,04	9,58	3,87	0,31	0,15
Adípico	Glicina	7,13	0,25	0,29	0,02	6,00	0,17	0,18	0,01
Adípico	Manitol	6,22	0,32	0,17	0,09	5,82	0,12	0,09	0,01

		10 x FT				*600 RPM de agitación 7 días 40°C*			
		Z-Promedio (nm)		*Pdl*		*Z-Promedio (nm)*		*Pdl*	
Acid/Sal	*Estabilizador*	*Media*	*Desv Est.*	*Media*	*Desv Est.*	*Media*	*Desv Est.*	*Media*	*Desv Est.*
Adípico	Ninguno	6,74	0,40	0,31	0,06	5,85	0,17	0,10	0,04
Adípico	Sorbitol	6,12	0,09	0,17	0,03	6,09	0,02	0,19	0,02
Adípico	Sacarosa	5,98	0,17	0,14	0,03	6,06	0,23	0,16	0,04
Adípico	Trehalosa	6,37	0,22	0,23	0,01	7,61	2,33	0,17	0,00
Adípico+Cítrico	Glicina	6,37	0,02	0,27	0,03	6,03	0,01	0,21	0,02
Adípico+Cítrico	Manitol	6,14	0,07	0,18	0,02	5,87	0,13	0,09	0,02
Adípico+Cítrico	Ninguno	6,69	0,59	0,30	0,08	5,88	0,09	0,10	0,04
Adípico+Cítrico	Sorbitol	6,35	0,07	0,22	0,02	5,99	0,13	0,15	0,00
Adípico+Cítrico	Sacarosa	6,27	0,08	0,22	0,02	6,23	0,02	0,21	0,01
Adípico+Cítrico	Trehalosa	6,67	0,25	0,26	0,05	6,51	0,06	0,25	0,00
Adípico+NaP	Glicina	6,44	0,06	0,30	0,01	5,95	0,11	0,18	0,01
Adípico+NaP	Manitol	6,63	0,13	0,28	0,03	6,02	0,21	0,11	0,00
Adípico+NaP	Ninguno	6,07	0,01	0,21	0,00	6,01	0,48	0,13	0,11
Adípico+NaP	Sorbitol	6,74	0,15	0,30	0,04	5,80	0,20	0,08	0,03
Adípico+NaP	Sacarosa	7,72	2,26	0,30	0,15	5,85	0,20	0,10	0,04
Adípico+NaP	Trehalosa	8,59	2,47	0,30	0,02	5,81	0,04	0,10	0,03
Málico	Glicina	6,60	0,07	0,31	0,01	6,05	0,24	0,22	0,01
Málico	Manitol	6,48	0,21	0,26	0,06	6,16	0,24	0,17	0,06
Málico	Ninguno	5,95	0,16	0,18	0,03	5,90	0,19	0,15	0,04
Málico	Sorbitol	6,36	0,08	0,25	0,01	6,10	0,33	0,17	0,08

		10 x FT				*600 RPM de agitación 7 días 40°C*			
		Z-Promedio (nm)		*Pdl*		*Z-Promedio (nm)*		*Pdl*	
Acid/Sal	*Estabilizador*	*Media*	*Desv Est.*	*Media*	*Desv Est.*	*Media*	*Desv Est.*	*Media*	*Desv Est.*
Málico	Sacarosa	7,74	1,99	0,29	0,07	6,82	1,21	0,15	0,01
Málico	Trehalosa	6,93	0,02	0,32	0,00	6,20	0,19	0,24	0,06
Málico+Cítrico	Glicina	6,35	0,18	0,25	0,02	5,79	0,08	0,11	0,02
Málico+Cítrico	Manitol	6,49	0,28	0,26	0,04	7,68	1,72	0,31	0,12
Málico+Cítrico	Ninguno	6,12	0,38	0,20	0,09	5,75	0,23	0,09	0,06
Málico+Cítrico	Sorbitol	6,19	0,14	0,23	0,05	5,91	0,01	0,11	0,00
Málico+Cítrico	Sacarosa	6,16	0,33	0,19	0,07	5,94	0,01	0,14	0,05
Málico+Cítrico	Trehalosa	6,61	0,25	0,26	0,05	8,14	3,05	0,16	0,00
Tartárico	Glicina	6,39	0,46	0,24	0,06	5,95	0,16	0,15	0,04
Tartárico	Manitol	6,20	0,09	0,20	0,01	24,62	20,25	0,43	0,14
Tartárico	Ninguno	6,05	0,18	0,18	0,06	6,27	0,47	0,23	0,03
Tartárico	Sorbitol	6,39	0,08	0,24	0,01	32,57	12,48	0,39	0,08
Tartárico	Sacarosa	6,29	0,32	0,23	0,05	8,22	2,79	0,20	0,10
Tartárico	Trehalosa	6,55	0,25	0,26	0,05	6,57	0,01	0,27	0,01
Tartárico+Cítrico	Glicina	6,32	0,19	0,24	0,03	5,86	0,03	0,11	0,02
Tartárico+Cítrico	Manitol	6,36	0,31	0,24	0,06	12,89	0,96	0,45	0,33
Tartárico+Cítrico	Ninguno	6,17	0,07	0,22	0,01	6,71	1,18	0,20	0,04
Tartárico+Cítrico	Sorbitol	6,53	0,18	0,28	0,02	12,41	6,32	0,31	0,08
Tartárico+Cítrico	Sacarosa	6,22	0,16	0,21	0,05	5,98	0,10	0,16	0,01
Tartárico+Cítrico	Trehalosa	6,12	0,13	0,19	0,02	13,61	10,30	0,25	0,01

Tabla 7: Estudio de estabilidad, resultados de SE-HPLC: pureza y suma de picos de agregación (AP)

Regulador	Control (NaP/Citrato)	Ácido Adípico	Ácido Tartárico	Ácido Glutámico	Ácido acético	Ácido succínico
Parámetros de prueba	Pureza y sustancias relacionadas por SE-HPLC - Pureza - en [% de Área]					
Temp.	5°C	5°C	5°C	5°C	5°C	5°C
Inicial	99.3	99.2	99.3	99.3	99.3	99.2
6 semanas	99.2	99.2	99.2	99.0	99.1	99.0
3 meses	99.2	99.3	99.2	99.3	99.3	99.2
Temp.	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Inicial	99.3	99.2	99.3	99.3	99.3	99.2
6 semanas	97.7	97.7	97.7	97.8	97.8	97.8
3 meses	97.1	97.2	97.1	97.2	97.2	97.1
Temp.	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C
Inicial	99.3	99.2	99.3	99.3	99.3	99.2
3 semanas	95.9	96.2	95.7	96.0	95.9	95.9
6 semanas	93.6	94.3	93.5	93.9	93.7	93.8
3 meses	89.4	90.5	89.3	90.0	89.9	90.0
Parámetros de prueba	Pureza y sustancias relacionadas por SE-HPLC – Suma de AP's - agregados solubles detectados por SEQ - en [% de Área]					
Temp.	5°C	5°C	5°C	5°C	5°C	5°C
Inicial	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
6 semanas	0.6	0.6	0.6	0.7	0.5	0.5
3 meses	0.6	0.6	0.6	0.6	0.6	0.7

Temp.	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C	25°C
Inicial	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
6 semanas	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9	0.9
3 meses	0.8	0.7	0.8	0.8	0.8	0.8
Temp.	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C	40°C
Inicial	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
3 semanas	1.0	0.9	0.9	0.9	1.0	0.9
Parámetros de prueba	Pureza y sustancias relacionadas por SE-HPLC - Purity-en [% de Área]					
6 semanas	1.5	1.4	1.5	1.4	1.6	1.5
3 meses	1.8	1.6	1.8	1.6	1.5	1.2

Tabla 8: Estudio de estabilidad, resultados de MFI - Cantidad total de partículas de 5-10 µm y> 10 µm Datos tomados después de 3 meses de almacenamiento a 40 ºC

Control (NaP/Citrato)	Ácido Adípico	Ácido Tartárico	Ácido Glutámico	Ácido Acético	Ácido succínico
Partículas sub-visibles por Microscopía de Flujo (Micro Flow Imaging, MFI) - 5-10µm - en [recuentos/mL]					
2296	1874	1483	1507	1520	881
Partículas sub-visibles por Microscopía de Flujo (Micro Flow Imaging, MFI) - mayor que 10 µm - en [recuentos/mL]					
127	257	86	98	107	139

Tabla 9: dos ejemplos para una formulación preferida de acuerdo con la invención

Compuesto	[mg/mL]
quimérico, humanizado o IgG humano	50.00

Compuesto	[mg/mL]
NaCl	5.0 - 7.0
Manitol	10.0 - 14.0
Ácido Adípico	1.5 - 4.0
Tween 80	0.5 - 1.5
NaOH (para ajustar pH)	q.s.
pH	5.20
Compuesto	[mg/mL]
quimérico, IgG humano humanizado	50.00
NaCl	5.0 - 7.0
Manitol	10.0 - 14.0
Ácido acético	0,.5 - 1.5
Tween 80	0.5 - 1.5
NaOH (para ajustar pH)	q.s.
pH	5.20

La Tabla 10 muestra formulaciones particularmente preferidas que comprenden ácido adípico o ácido acético (acetato). Estas formulaciones se compararon con el regulador de control que comprende fosfato de sodio + citrato (fosfato de sodio 14,1 mM, citrato 7,2 mM, NaCl 105,5 mM, Tween 80 al 0,1% y manitol 65,9 mM, véanse más detalles más arriba). Todas las formulaciones mostradas fueron superiores al regulador de control en términos de comportamiento de agregación.

Tabla 10: formulaciones preferidas que comprenden ácido adípico o acetato.

No. de estudio	001		007		
	Formulación de ácido adípico	Formulación de ácido acético	Formulación de ácido adípico	Formulación Adípico/ Citrato	Formulación de ácido acético
NaCl [mM]	105	105	105	105	105

No. de estudio	001		007		
Manitol [mM]	66	66	66	66	66
Ácido Adípico [mM]	23	-	23	23	<0.2
Ácido acético [mM]	-	20	-	-	20
Tween 80 [mM]	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8
Ácido cítrico [mM]	1,4	2,4	-	1,4	2,4
Fosfato [mM]	2,8	2,8	-	-	-

Listado de secuencias

<110> Hexal AG

<120> Formulación farmacéutica que comprende un fármaco biofarmacéutico

<130> LD40322

<160> 10

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1413

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de cadena pesada IgG anti TNFalpha

<400> 1

atggcctggg tctggaccct gcctttcctg atggccgctg cccagtccgt gcaggccgag 60

gtgcagctgg tcgagtctgg cggcggactg gtgcagcctg gccggtccct gcggctgtcc 120

tgcgccgcct ccggcttcac cttcgacgac tacgccatgc actgggtccg ccaggccccc 180

ggcaaaggcc tcgagtgggt gtccgccatc acctggaact ccggccacat cgactacgcc 240

gactccgtgg agggccggtt caccatctcc cgggacaacg ccaagaactc cctgtacctg 300

cagatgaact ccctgcgggc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccaa ggtgtcctac 360

ctgtccaccg cctcctccct ggactactgg ggccagggca ccctggtcac cgtgtcctcc 420

gcctccacca agggcccctc cgtgttccct ctggcccctt cctccaagtc cacctccggc 480

ggcaccgccg ctctgggctg cctggtcaag gactacttcc ctgagcctgt gacagtgtcc 540

tggaactctg gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc ctgccgtgct gcagtcctcc 600

ggcctgtact ccctgtcctc cgtcgtcaca gtgccttcct ccagcctggg cacccagacc 660

tacatctgca acgtgaacca caagccttcc aacaccaagg tggacaagaa ggtggagcct 720

aagtcctgcg acaagaccca cacctgccct ccctgccctg cccctgagct gctgggcgga 780

ccttccgtgt tcctgttccc tcctaagcct aaggacaccc tgatgatctc ccggacccct 840

gaggtcacct gcgtggtggt ggacgtgtcc cacgaggatc ctgaggtcaa gttcaattgg 900

tacgtggacg gcgtggaggt gcacaacgct aagaccaagc ctcgggaaga gcagtacaac 960

tccacctacc gggtggtgtc cgtgctgacc gtgctgcacc aggactggct gaacggcaaa 1020

gaatacaagt gcaaggtctc caacaaggcc ctgcctgccc ccatcgagaa aaccatctcc 1080

aaggccaagg gccagcctcg cgagcctcag gtgtacaccc tgcctccctc ccgggacgag 1140

ctgaccaaga accaggtgtc cctgacctgt ctggtcaagg gcttctaccc ttccgatatc 1200

gccgtggagt gggagtccaa cggccagcct gagaacaact acaagaccac ccctcctgtg 1260

ctggactccg acggctcctt cttcctgtac tccaagctga ccgtggacaa gtcccggtgg 1320

cagcagggca acgtgttctc ctgctccgtg atgcacgagg ccctgcacaa ccactacacc 1380

cagaagtccc tgtccctgag ccctggcaag tga 1413

<210> 2

<211> 705

<212> ADN

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de codificación de cadena ligera IgG Anti TNFalpha

<400> 2

atgtccgtgc tgacccaggt gctggccctg ctgctgctgt ggctgaccgg caccagatgc 60

gacatccaga tgacccagtc cccctcctcc ctgtccgcct ccgtgggcga cagagtgacc 120

atcacctgcc gggcctccca gggcatccgg aactacctgg cctggtatca gcagaagcct 180

ggcaaggccc ctaagctgct gatctacgcc gcctccaccc tgcagtccgg cgtgccttcc 240

cggttctccg gctccggcag cggcaccgac ttcaccctga ccatctcctc cctgcagcct 300

gaggacgtgg ccacctacta ctgccagcgg tacaacagag ccccttacac cttcggccag 360

ggcaccaagg tggagatcaa gcgtacggtg gccgctcctt ccgtgttcat cttccctccc 420

tccgacgagc agctgaagtc cggcaccgcc agcgtcgtct gcctgctgaa caacttctac 480

cctcgggagg ccaaggtgca gtggaaggtg gacaacgccc tgcagagcgg caactcccag 540

gaatccgtca ccgagcagga ctccaaggac agcacctact ccctgtccag caccctgacc 600

ctgtccaagg ccgactacga gaagcacaag gtgtacgcct gcgaggtcac ccaccagggc 660

ctgtcctccc ccgtgaccaa gtccttcaac cggggcgagt gctga 705

<210> 3

<211> 470

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de cadena pesada IgG Anti TNFalpha

<400> 3

Met Ala Trp Val Trp Thr Leu Pro Phe Leu Met Ala Ala Ala Gln Ser
1 5 10 15

Val Gln Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

```
Asp Asp Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
    50                  55                  60

Glu Trp Val Ser Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala
65                  70                  75                  80

Asp Ser Val Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
                85                  90                  95

Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val
            100                 105                 110

Tyr Tyr Cys Ala Lys Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp
        115                 120                 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
    130                 135                 140

Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
145                 150                 155                 160

Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
                165                 170                 175

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
            180                 185                 190

Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
        195                 200                 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
    210                 215                 220

Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro
225                 230                 235                 240

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
                245                 250                 255

Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
            260                 265                 270

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
        275                 280                 285

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
    290                 295                 300
```

```
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
305                 310                 315                 320

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
                325                 330                 335

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
            340                 345                 350

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
        355                 360                 365

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn
    370                 375                 380

Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
385                 390                 395                 400

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
                405                 410                 415

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
            420                 425                 430

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
        435                 440                 445

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
    450                 455                 460

Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465                 470
```

<210> 4

<211> 234

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos de cadena ligera IgG Anti TNFalpha

```
<400>  4

Met Ser Val Leu Thr Gln Val Leu Ala Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1               5                   10                  15

Gly Thr Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
            20                  25                  30
```

```
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly
        35                  40                  45

Ile Arg Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
    50                  55                  60

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
65                  70                  75                  80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                85                  90                  95

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Arg Tyr Asn
            100                 105                 110

Arg Ala Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
        115                 120                 125

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
    130                 135                 140

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
145                 150                 155                 160

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
                165                 170                 175

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
            180                 185                 190

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
        195                 200                 205

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
    210                 215                 220

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225                 230
```

<210> 5

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos CDR 3 de cadena ligera IgG Anti TNFalpha

<220>

<221> característica_misc

<222> (9) .. (9)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 5

Gln Arg Tyr Asn Arg Ala Pro Tyr Xaa
1 5

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos CDR 3 de cadena pesada IgG Anti TNFalpha

<220>

<221> característica_misc

<222> (12)..(12)

<223> Xaa puede ser cualquier aminoácido de origen natural

<400> 6

Val Ser Tyr Leu Ser Thr Ala Ser Ser Leu Asp Xaa
1 5 10

<210> 7

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos CDR 2 de cadena ligera IgG Anti TNFalpha

<400> 7

Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser
1 5

<210> 8

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos CDR 2 de cadena pesada IgG Anti TNFalpha

<400> 8

Ala Ile Thr Trp Asn Ser Gly His Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Glu
1 5 10 15

Gly

<210> 9

<211> 11

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos CDR 1 de cadena ligera IgG Anti TNFalpha

<400> 9

Arg Ala Ser Gln Gly Ile Arg Asn Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Secuencia de aminoácidos CDR 1 de cadena pesada IgG Anti TNFalpha

<400> 10

Asp Tyr Ala Met His
1 5

REIVINDICACIONES

1. Una formulación farmacéutica para administración parenteral, comprendiendo la formulación un anticuerpo IgG monoclonal con capacidad de unión a objetivo retenida, comprendiendo dicha composición además ácido adípico o una sal de adipato,

en donde el ácido adípico o adipato actúa como un regulador, y

en donde la cadena pesada del anticuerpo IgG monoclonal está definida por una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, y la cadena ligera está definida por una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

2. La formulación de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el ácido adípico o adipato está presente en una forma acuosa de la formulación farmacéutica en una concentración de entre ≥ 2 y ≤ 50 mM.

3. La formulación de acuerdo con la reivindicación 2, en donde el ácido adípico o adipato está presente en una forma acuosa de la formulación farmacéutica en una concentración de entre ≥ 5 y ≤ 25 mM.

4. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la cadena pesada del anticuerpo IgG monoclonal está codificada por el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 1, y

en donde la cadena ligera de los mismos está codificada por el ácido nucleico de la SEQ ID NO: 2.

5. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones ya mencionadas, en donde la formulación comprende además ácido cítrico o citrato, y en donde el ácido cítrico o el citrato actúa como un regulador.

6. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones ya mencionadas, cuya formulación comprende además al menos un estabilizante seleccionado del grupo que consiste en un aminoácido, un poliol de azúcar, un disacárido y/o un polisacárido.

7. La formulación de acuerdo con la reivindicación 6, en donde dicho disacárido es un agente seleccionado del grupo que consiste en sacarosa y/o trehalosa.

8. La formulación de acuerdo con la reivindicación 6 o 7, en donde dicho poliol de azúcar es un agente seleccionado del grupo que consiste en manitol y/o sorbitol.

9. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación tiene un pH de entre ≥ 4 y ≤ 8.

10. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en donde la formulación tiene un pH de entre ≥ 5 y ≤ 8.

11. La formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones ya mencionadas, en donde dicho anticuerpo IgG monoclonal es:

• un anticuerpo derivado de hibridoma,

• un anticuerpo quimerizado,

• un anticuerpo humanizado, y/o

• un anticuerpo humano.

12. Una jeringa o lápiz precargado, un vial o una bolsa de infusión, dicha jeringa o lápiz, vial o bolsa de infusión que comprende una formulación de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11.

13. Una formulación farmacéutica de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 - 11 para uso en el tratamiento de una condición patológica, en la que la condición patológica es al menos una de:

• Enfermedades autoinmunes,

• enfermedades infecciosas,

• enfermedades neoplásicas y/o malignas (cáncer), y/o

• enfermedades del sistema nervioso,

y en donde el tratamiento implica administración parenteral.

14. La formulación para uso de acuerdo con la reivindicación 13, en donde el tratamiento implica la administración intravenosa, intramuscular y/o subcutánea.

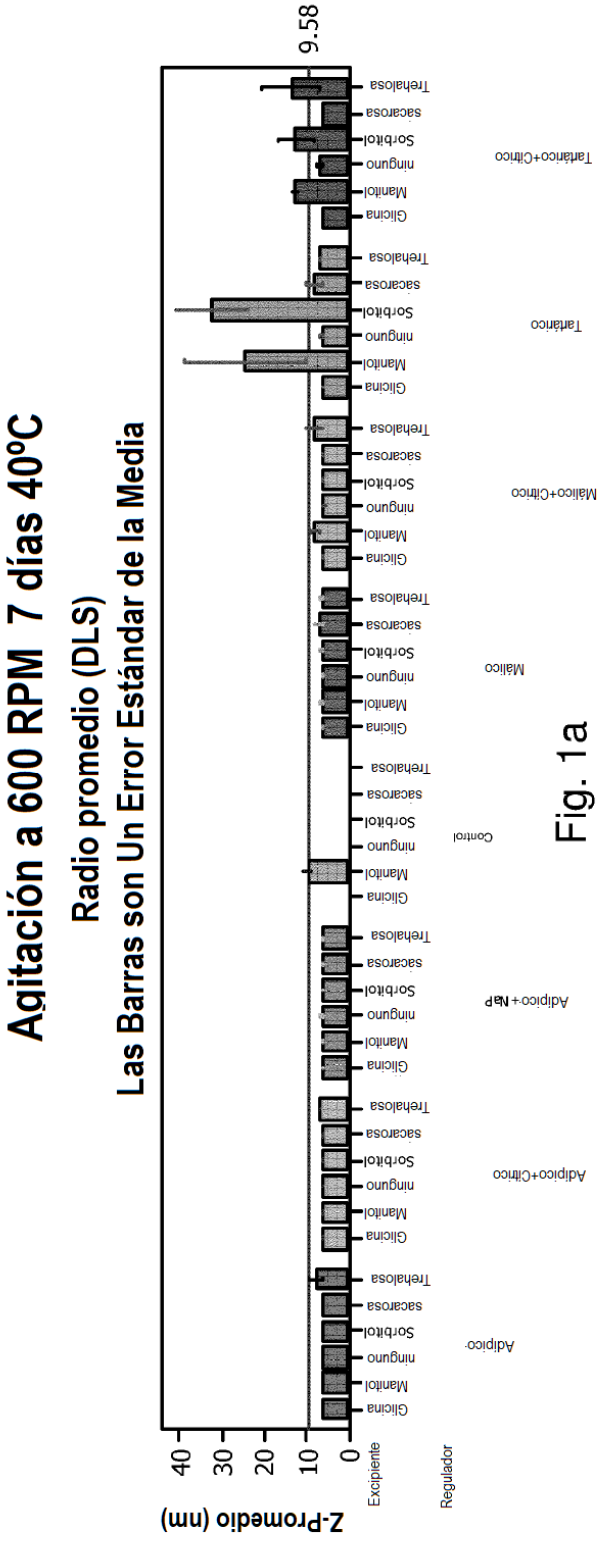
Agitación a 600 RPM 7 días 40ºC
Radio promedio (DLS)
Las Barras son Un Error Estándar de la Media
9.58
Z-Promedio (nm)
40
30
20
10
0
Excipiente
Regulador
Adípico
Adípico+Cítrico
Adípico+NaP
Control
Málico
Málico+Cítrico
Tartárico
Tartárico+Cítrico
Glicina
Manitol
ninguno
Sorbitol
sacarosa
Trehalosa

Fig. 1a

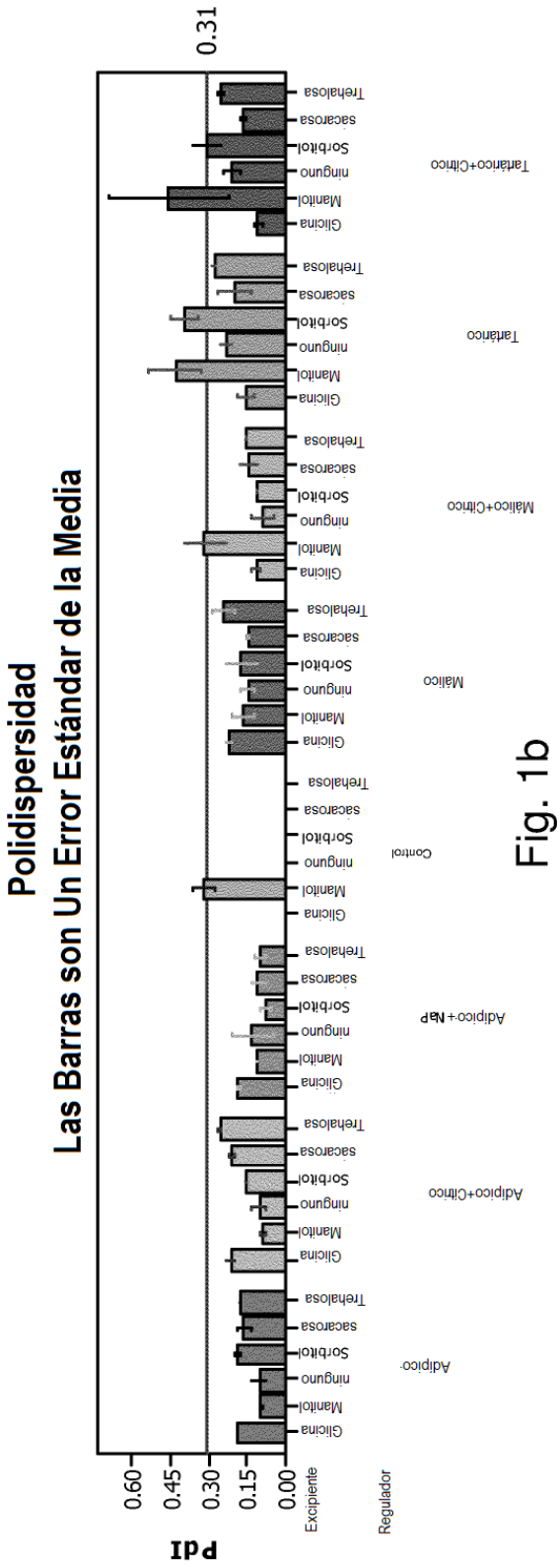
Polidispersidad
Las Barras son Un Error Estándar de la Media
PdI
0.60
0.45
0.30
0.15
0.00
0.31
Excipiente
Regulador
Glicina
Manitol
ninguno
Sorbitol
sacarosa
Trehalosa
Adípico
Adípico+Cítrico
Adípico+ NaP
Control
Málico
Málico+Cítrico
Tartárico
Tartárico+Cítrico

Fig. 1b

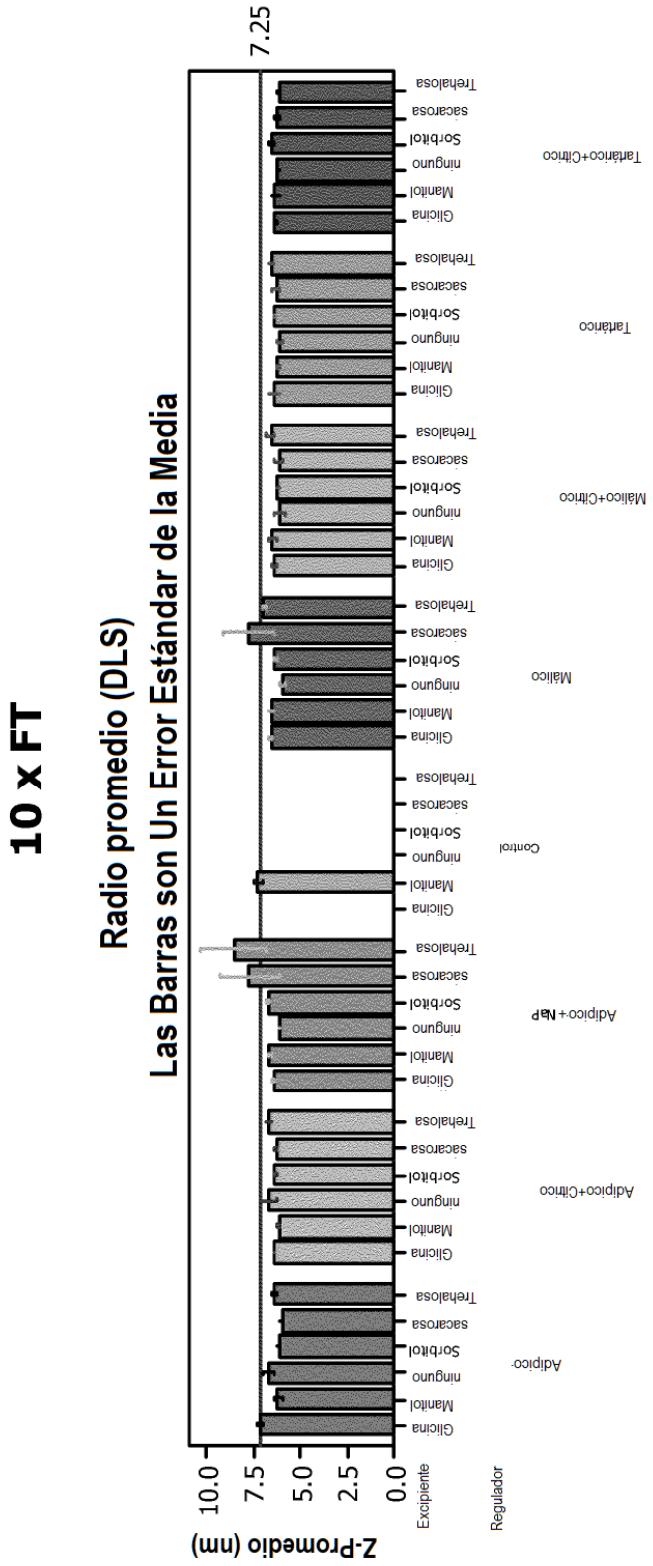
10 x FT
Radio promedio (DLS)
Las Barras son Un Error Estándar de la Media
7.25
Z-Promedio (nm)
10.0
7.5
5.0
2.5
0.0
Excipiente
Regulador
Glicina
Manitol
ninguno
Sorbitol
sacarosa
Trehalosa
Adípico
Adípico+Cítrico
Adípico+NaP
Control
Málico
Málico+Cítrico
Tartárico
Tartárico+Cítrico

Fig. 2a

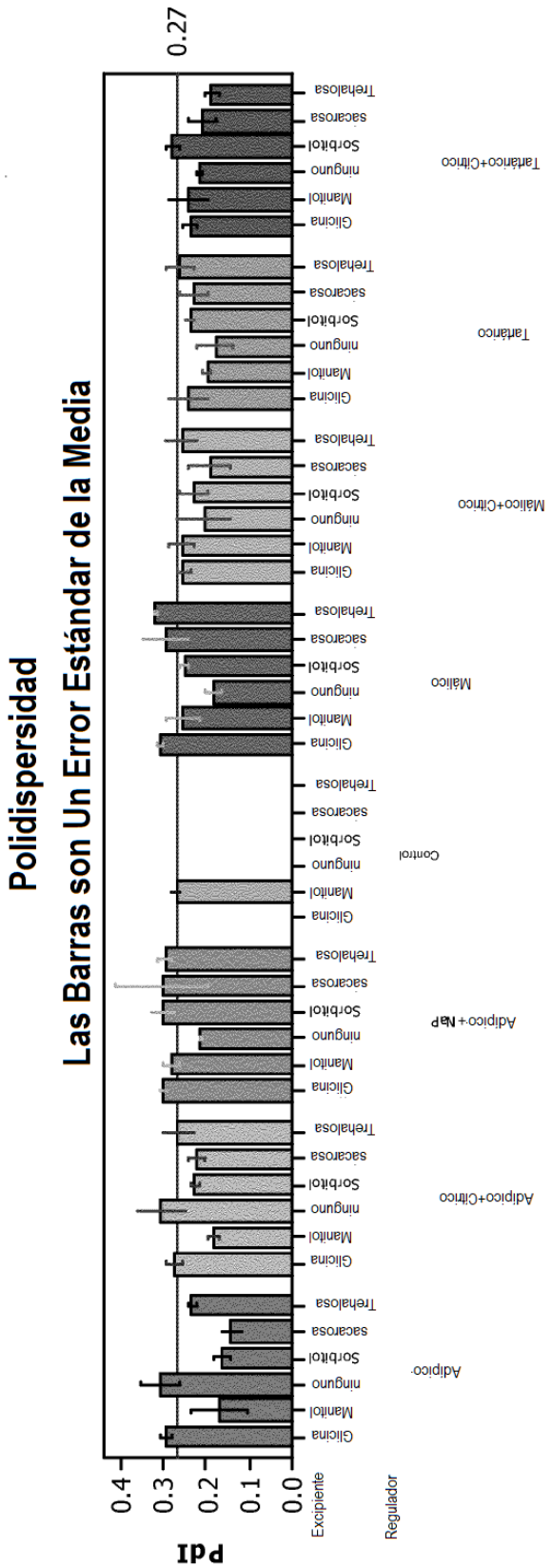
Polidispersidad
Las Barras son Un Error Estándar de la Media
PdI
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
0.27
Excipiente
Regulador
Glicina
Manitol
ninguno
Sorbitol
sacarosa
Trehalosa
Adípico
Adípico+Cítrico
Adípico+NaP
Control
Málico
Málico+Cítrico
Tartárico
Tartárico+Cítrico

Fig. 2b

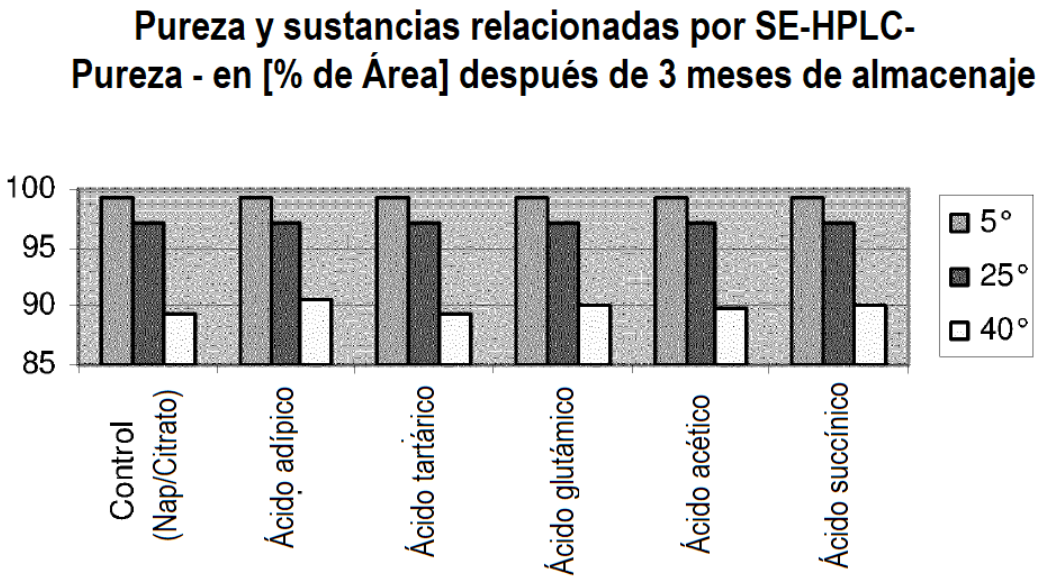
Pureza y sustancias relacionadas por SE-HPLC-
Pureza - en [% de Área] después de 3 meses de almacenaje
100
95
90
85
5°
25°
40°
Control (Nap/Citrato)
Ácido adípico
Ácido tartárico
Ácido glutámico
Ácido acético
Ácido succínico

Fig. 3a

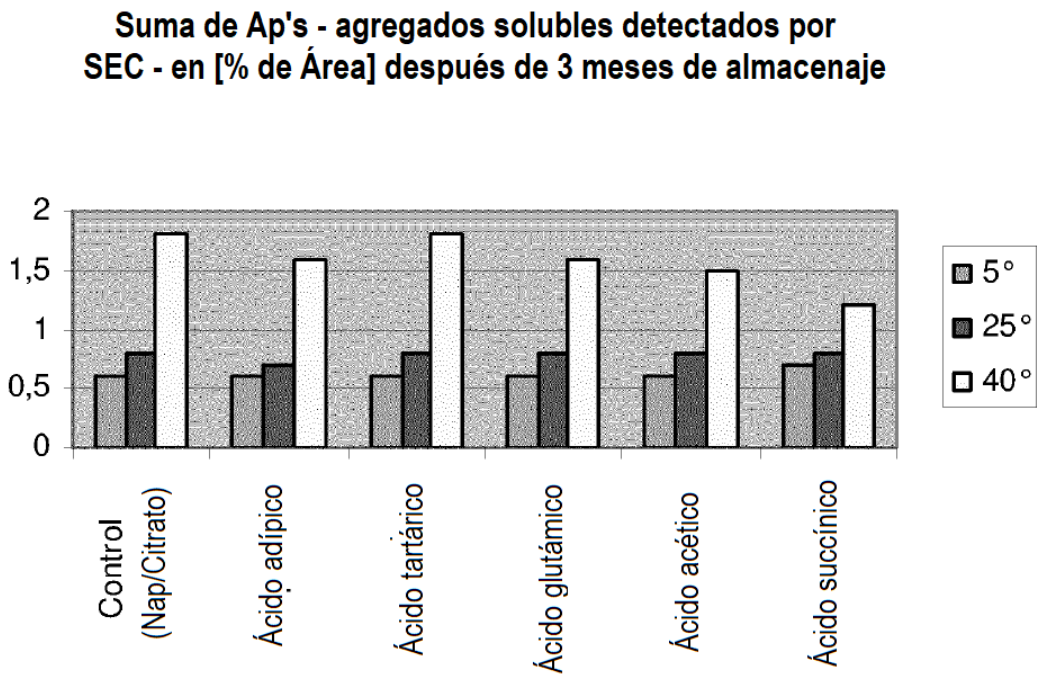
Suma de Ap's - agregados solubles detectados por
SEC - en [% de Área] después de 3 meses de almacenaje
2
1,5
1
0,5
0
5°
25°
40°
Control (Nap/Citrato)
Ácido adípico
Ácido tartárico
Ácido glutámico
Ácido acético
Ácido succínico

Fig. 3b

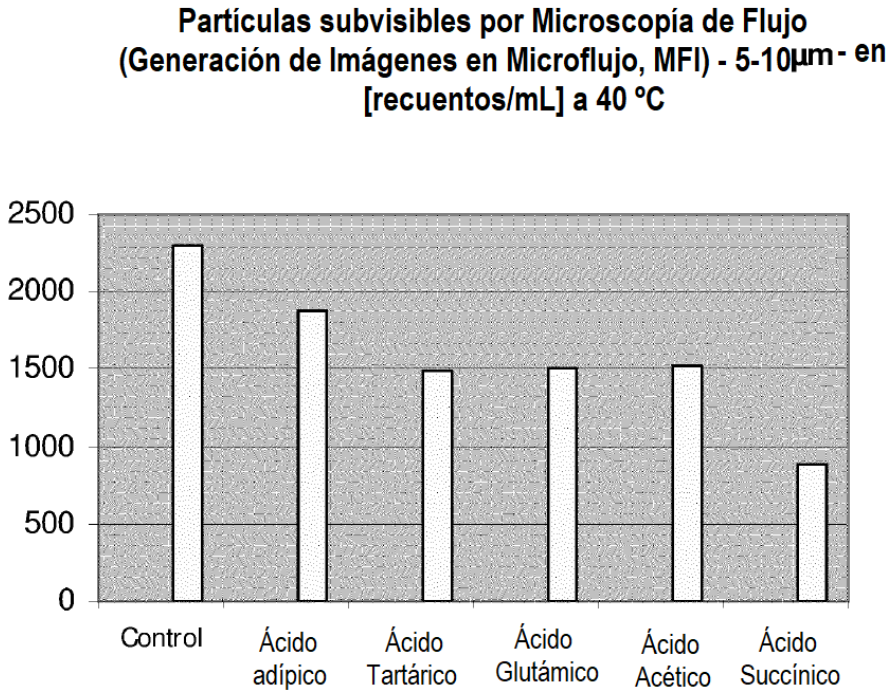
Partículas subvisibles por Microscopía de Flujo (Generación de Imágenes en Microflujo, MFI) - 5-10µm - en [recuentos/mL] a 40 °C
2500
2000
1500
1000
500
0
Control
Ácido adípico
Ácido Tartárico
Ácido Glutámico
Ácido Acético
Ácido Succínico

Fig. 4a

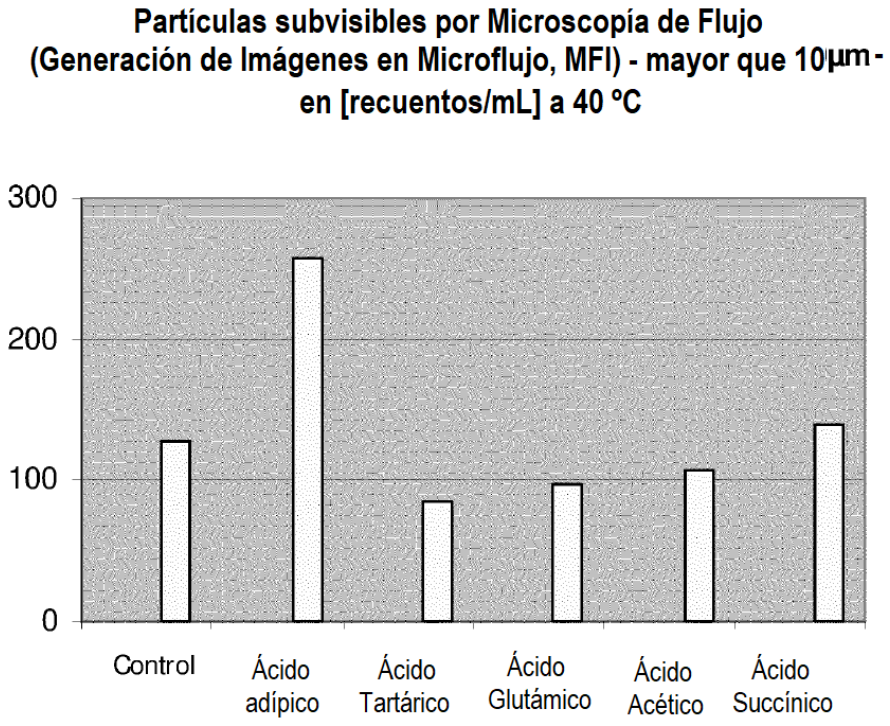
Partículas subvisibles por Microscopía de Flujo (Generación de Imágenes en Microflujo, MFI) - mayor que 10µm - en [recuentos/mL] a 40 °C
300
200
100
0
Control
Ácido adípico
Ácido Tartárico
Ácido Glutámico
Ácido Acético
Ácido Succínico

Fig. 4b